



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS
EN CEPAS CLÍNICAS DE *Klebsiella pneumoniae*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Camila Chavarría Torres



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS**

**Proyecto financiado por la DGAPA, UNAM, PAPIIT
IN225020.**

**Los Reyes Iztacala, Tlanepantla Edo. de México,
2021.**



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.

Índice

Resumen	2
Introducción	3
Características generales de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
Patología de <i>K. pneumoniae</i>	3
Factores de virulencia	4
Mecanismo de acción de los antibióticos	5
Mecanismos de resistencia a los antibióticos	9
Antecedentes	13
Justificación	14
Objetivos	15
General	15
Particulares	15
Material y Métodos	16
Origen de las cepas	16
Pruebas bioquímicas	16
Determinación del fenotipo de resistencia a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer	16
Extracción de DNA	17
Identificación de <i>Klebsiella pneumoniae</i> por PCR	17
Análisis de los amplicones por electroforesis en gel de agarosa	17
Identificación por PCR de los genes que codifican resistencia a los antibióticos en las cepas de <i>K. pneumoniae</i>	18
Análisis y Resultados	20
Discusión	31
Conclusiones	35
Referencias	36

Resumen

Klebsiella pneumoniae es considerada como uno de los patógenos oportunistas más frecuentes en el humano, ocasionando infecciones hospitalarias, principalmente en pacientes inmunodeprimidos. El tratamiento de las infecciones por *K. pneumoniae* se ha complicado recientemente debido a la selección de cepas multirresistentes a los antibióticos. El objetivo de este trabajo fue determinar el fenotipo y el genotipo de resistencia a los antibióticos en cepas de *K. pneumoniae* aisladas de un grupo de pacientes hospitalizados y ambulatorios del Hospital General Regional (HGR) No. 72 y de la clínica 64 de Tequesquihuac (Tlalnepantla de Baz). Las cepas fueron identificadas por pruebas bioquímicas y por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El fenotipo de resistencia a los antibióticos se determinó por el método de Kirby-Bauer y los genes de resistencia a los antibióticos por PCR de punto final. La mayoría de las cepas fueron aisladas de infecciones de vías urinarias (23.1%, n=28), faringitis (15.7%, n=19), septicemia (14.9%, n=18) e infecciones vaginales (6.6%, n=8). El 97.5% (n=118) de las cepas fue resistente a Ampicilina (AM), 96.7% (n=117) a Carbenicilina (CB), 50.4% (n=61) a Nitrofurantoina (NF) y 49.6% (n=60) a Cefalotina (CF). La resistencia a Ciprofloxacina (CPF) fue del 42.1% (n=51), 40.5% (n=49) a Cefotaxima (CFX) y Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT) del 40% (n=48). Gentamicina (GE) 36% (n=44) y Norfloxacina (NOF) 35% (n=42). Los menores porcentajes se encontraron para Netilmicina (NET) con 24% (n=29), Cloranfenicol (CL) con 21.5% (n=26) y Amikacina (AK) con 15% (n=18). La mayoría de las cepas presentó el gen *tet(A)* con un 71.1% (86/121), *blaSHV* con un 62.8% (76/121), *sul 1* con 60% (72/121), *CITM* con 57.9% (70/121), *aac(3)-IV* con 46.3% (56/121), y *aadA1* con 36.4% (44/121). Los genes menos frecuentes fueron *dfra1* con un 16.5% (20/121), *cmIA* con un 13.2% (16/121), *cat 1* con 12.4% (15/121), y *tet(B)* con un 8.3% (10/121).

Los resultados evidenciaron una elevada distribución del fenotipo y genotipo de resistencia a los antibióticos, lo que podría complicar el tratamiento médico de los pacientes hospitalizados.

Introducción

Características generales de *Klebsiella pneumoniae*

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por un grupo grande y heterogéneo de bacilos Gram negativos cuyo hábitat natural es el tracto intestinal de humanos y animales. Dentro de esta familia se encuentran géneros como *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Las bacterias del género *Klebsiella* son móviles, anaerobias facultativas, catalasa positiva, oxidasa negativa y generalmente capsuladas. Fermenta azúcares como lactosa y sacarosa. La mayoría de las cepas producen gas a partir de la fermentación de azúcares, que es una característica distintiva de estas bacterias. Existen hasta ahora registradas cuatro especies, las cuales son *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. planticola* y *K. pneumoniae*. En particular, *K. pneumoniae* forma una cúpula mucoide en agar BHI (Brain and Heart infusion) y forma colonias de color rosa ya que es fermentadora de lactosa en agar MacConkey. En cuanto a pruebas bioquímicas, es indol negativo, rojo metilo negativo, Vogé-Proskauer positivo, citrato positivo, oxidasa negativa y catalasa positiva. *Klebsiella* es considerada como parte de la microbiota natural y como un patógeno oportunista tanto para animales como humanos. Asimismo, habitan en aguas residuales, agua potable, suelos, aguas superficiales, efluentes industriales y vegetación (Bagley, 1985; Brooks *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2017).

Patología de *K. pneumoniae*

K. pneumoniae ocasiona infecciones del tracto urinario, neumonía, septicemia, infecciones en los recién nacidos y en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos debido a la rápida capacidad de propagarse en un entorno hospitalario, provocando así brotes nosocomiales (Podschun & Ullman, 1998).

Así mismo *K. pneumoniae* es considerada como un patógeno oportunista del tracto urinario en pacientes inmunosuprimidos y hospitalizados, el cual ha aumentado en las últimas décadas. *K. pneumoniae* es una de las principales causas de infecciones urinarias adquiridas nosocomialmente y con frecuencia prevalece como agente infeccioso en pacientes con catéteres urinarios. Estas infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres (CAUTI) pueden ocasionar bacteremias, con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Stamm, 1991; Ciobotaro *et al.*, 2011; Won, *et al.*, 2011).

La tasa de mortalidad de casos de infecciones del torrente sanguíneo (por sus siglas en inglés BSI; Bloodstream Infections) debido a *K. pneumoniae* es 20-30%, y la tasa de mortalidad de la población se estima en 1.3 por cada 100,000 personas en Estados Unidos

(Podschun y Ullmann, 1998; Meatherall *et al.*, 2009). *K. pneumoniae* es la segunda causa principal de BSI (bacteremias) causadas por bacterias Gramnegativas, después de *E. coli* (Podschun & Ullmann, 1998; Magill *et al.*, 2014). A su vez el cáncer es la principal enfermedad asociada con la bacteremia, la cual es adquirida en el hospital, mientras que la enfermedad hepática y la diabetes están más asociada con la bacteremia de *K. pneumoniae*, pero adquirida fuera de hospitales (Kang *et al.*, 2006). Por lo que las fuentes comunes de bacteremias incluyen el tracto urinario, tracto gastrointestinal, catéteres intravenosos o urinarios y sitios respiratorios (Montgomerie & Ota, 1980).

Factores de virulencia

Existen diferentes factores de virulencia en *K. pneumoniae* que facilitan la adherencia, la internalización, la multiplicación y la evasión del sistema inmune durante la infección al hospedero, algunos de estos factores son: cápsula, lipopolisacárido (LPS), factores de adherencia fimbrial, sideróforos (metabolitos secundarios fijadoras de hierro), toxinas, y la cadena lateral O (endotoxina) (Li *et al.*, 2014; Shakib *et al.*, 2018).

K. pneumoniae produce una cápsula que actúa como un factor determinante en su virulencia ya que estas tienen antígenos que se pueden clasificar en 77 serotipos diferentes. Esta cápsula protege a la bacteria de la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares y de los factores bactericidas séricos (Simoons-Smit *et al.*, 1986). Es desconocido el mecanismo de *K. pneumoniae* ante la resistencia a la inmunidad de los factores séricos, las cuales están relacionados con la activación del complemento, aunque hay una posible explicación la cual es el enmascaramiento del lipopolisacárido (LPS) de la bacteria gracias a la cápsula que genera, de tal forma que exhibe una estructura que no activa el complemento (Merino *et al.*, 1992).

La primera etapa en el proceso infeccioso es la adherencia de la bacteria a las células del hospedero por medio de unas proyecciones proteínicas filamentosas que están en la superficie de la bacteria llamadas pilis, de las cuales existen dos tipos que predominan en *Klebsiella*, estos son el tipo 1 y el tipo 3 (Przondo-Hessek & Pulveres, 1983; Old *et al.*, 1985). El tipo 1 está asociado en la infección del tracto urinario, ya que se unen a las células del túbulo proximal. A su vez son capaces de adherirse a las células del tracto respiratorio, lo cual puede conducir a una neumonía (Ayars *et al.*, 1982; Iwahi *et al.*, 1983; Virkola *et al.*, 1988). El pili tipo 3 interviene en la adherencia a las células endoteliales y los epitelios tanto del tracto respiratorio como el del urinario (Hornick *et al.*, 1992; Tarkkanen *et al.*, 1997).

Por otro lado, el hierro es un elemento vital para el desarrollo bacteriano, pero su disponibilidad en el ambiente del hospedero es muy limitada, aunque varias bacterias son capaces de obtenerlo produciendo agentes quelantes llamados sideróforos, los cuales son

capaces de tomarlo de las proteínas del propio hospedero. En caso de las enterobacterias, estas son capaces de sintetizar dos tipos de sideróforos: enterobactinas y aerobactinas. Otros factores de virulencia que se han descrito también son, la producción de citotoxinas, enterotoxinas y hemolisinas (Podschun *et al.*, 1992; Kingsley *et al.*, 1995).

A pesar de que *K. pneumoniae* es considerada una bacteria no móvil, Carabarin y colaboradores (2016) describieron la presencia de un flagelo polar en una cepa aislada de un paciente con sepsis neonatal. Este flagelo, que es codificado por los genes *fliC* (codifica la flagelina, la principal proteína estructural flagelar), *fliA* (codifica el factor de transcripción flagelar, σ^{28} , el cual es responsable del inicio de la transcripción de varios genes implicados en la motilidad y la síntesis flagelar) y *flgH*, es un nuevo factor de virulencia que incrementa la eficiencia de colonizar otros nichos anatómicos.

Mecanismo de acción de los antibióticos

Los agentes antimicrobianos se pueden dividir en grupos según el mecanismo de actividad antimicrobiana. Los principales grupos son:

Los que inhiben la síntesis de la pared celular, la síntesis de proteínas, la síntesis de ácidos nucleicos, y las vías metabólicas en las bacterias, además de los que despolarizan la membrana celular. (Cuadro1; Reygaert, 2018).

Cuadro 1. Tipos de antimicrobianos según el mecanismo de acción (Reygaert, 2018).

<i>Mecanismo de acción</i>	<i>Tipos de antimicrobianos</i>	<i>Mecanismo de resistencia</i>
Inhiben la síntesis de la pared celular	<p>β-lactamasas</p> <p>Carbapenémicos</p> <p>Cefalosporinas</p> <p>Monobactámicos</p> <p>Penicilinas</p> <p>Glucopéptidos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de b-lactamasas (<i>blaSHV</i>, <i>TEM</i>) • Mutación de PBPs (proteínas de unión a penicilina) • Baja penetración
Inhiben la síntesis de proteínas	<p>Unión a la subunidad ribosómica 30S</p> <p>Aminoglucósidos</p> <p>Tetraciclinas</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutación del sitio de unión en el ribosoma • Baja penetración • Modificación enzimática (acetilación, fosforilación) <i>aac(3)-iv</i> (gentamicina), <i>aada</i>

		(estreptomicina)
	Unión a la subunidad ribosómica 50S Cloranfenicol Lincosamidas Macrólidos Oxazolidinonas Estreptograminas	<ul style="list-style-type: none"> • Modificación enzimática (<i>cat1</i> y <i>cmla</i>) (acetiltransferasa) • Mutación del sitio de unión en el ribosoma
Inhiben la síntesis de ácidos nucleicos	Quinolonas Fluoroquinolonas	<ul style="list-style-type: none"> • Mutación de la subunidad alfa de la adn girasa (<i>qnr</i>) • Disminución de la captación
Inhiben las vías metabólicas	Sulfonamidas Trimetoprim	<ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de vía alterna no sensible al fármaco (<i>sul</i> y <i>dfrA</i>)
Despolarizan la membrana celular	Lipopéptidos	<ul style="list-style-type: none"> • Baja penetración • Mutación del polisacárido

Inhibición de la síntesis de la pared celular.

La pared celular de las bacterias está compuesta principalmente de peptidoglicano o mureína, que está formada de N-acetil-glucosamina y Ácido N-acetilmurámico, que son láminas compuestas de derivados de azúcares, aminoácidos como L-alanina, D-alanina, D-glutámico y lisina o ácido diaminopimérico (DAP) (Madigan *et al.* 2004).

Ciertos antibióticos, como los β -lactámicos, reaccionan con las PBPs (Penicillin binding proteins), un complejo enzimático que se sitúa en la superficie de los peptidoglucanos que tienen una alta afinidad por los β -lactámicos uniéndose a las proteínas de unión a la penicilina (PBPs) como sustrato. Estos fármacos son análogos estructurales de acil-D-alanil-

D-alanina que se une al sitio activo de las PBPs durante la reacción de transpeptidación. La reacción de transpeptidación es bloqueada por estos antibióticos que inactivan el dominio transpeptidasa de las PBPs. Los microorganismos mueren al inhibirse específicamente la biosíntesis de peptidoglicanos (Kirmusaoğlu *et al.*, 2019).

Inhibición de la síntesis de proteínas.

Los ribosomas de las bacterias están formados por dos subunidades: Subunidad menor 30S y Subunidad mayor 50S, que contienen ARN ribosómico (ARNr 16S en la subunidad menor 30S, y ARNr 5S y ARNr 23S en la subunidad mayor 50S) y varias proteínas llamadas S (*small*, en la subunidad 30S) o L (*large*, en la subunidad 50S). Debido a la estructura del ribosoma, existen diferentes componentes que pueden ser sitios de unión para los antimicrobianos, por ejemplo, los aminoglucósidos tienen su sitio de acción en la subunidad 30S, donde se unen a diferentes proteínas S y al ARN 16S, esto bloquea la actividad normal del complejo de iniciación e impiden el inicio de la síntesis de proteínas y provocan también una lectura errónea del ARNm (Calvo & Martínez-Martínez, 2009). También las tetraciclinas penetran el citoplasma bacteriano y se unen a la subunidad 30S e impiden la continuación de la síntesis proteica (Shlaes, 2006). El cloranfenicol impide el ensamblaje de los aminoacil-ARNt (Ácido Ribonucleico de Transferencia), un complejo que transporta los aminoácidos al ribosoma, inhibiendo la formación del enlace peptídico (Auerbach *et al.*, 2004).

Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.

El genoma bacteriano tiene información guardada para realizar la síntesis de proteínas. Los procesos implicados para la transmisión de la información genética se dividen en tres fases, comienza con la replicación, donde el ADN al ser una cadena de doble hélice, necesita ser separada y duplicada, produciendo así una nueva cadena complementaria a cada una de las cadenas molde. Posteriormente durante la transcripción la información se transmite a través del ARN mensajero (ARNm), que es producido a partir de la cadena molde de ADN y finalmente está la traducción en donde se necesita un codón (secuencia de tres nucleótidos del ARNm), para transportar un solo aminoácido. Una secuencia específica de aminoácidos se traduce en una proteína por medio de los ribosomas (Brooks, *et al.*, 2013). La replicación y la transcripción del ADN se realiza en varias fases con la participación de diferentes enzimas, sustratos y el ADN molde, que son dianas para la acción de diversos antibióticos. Dentro de este grupo incluimos las rifampicinas y las quinolonas que actúan en enzimas que participan en los procesos de transcripción y replicación, y los nitroimidazoles y nitrofuranos que actúan directamente sobre el ADN, dañándolo (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

Inhibición de las vías metabólicas

Las rutas metabólicas son catabolizadas por enzimas que son activadas por sustratos. Los fármacos pueden inhibir la síntesis de los compuestos metabólicos, por lo que los fármacos que son análogos estructurales de sustratos actúan como sustratos de las enzimas utilizadas durante el metabolismo. El ácido para-aminobenzoico (PABA) es un sustrato para la síntesis de ácido fólico que es una coenzima en las reacciones de síntesis de purinas, pirimidinas y aminoácidos. El sulfametoxazol es una sulfonamida que muestra una analogía estructural con PABA, la cual bloquea la reacción que sintetiza ácido dihidrofólico (DHF) a partir de PABA, mientras que la trimetoprima, que es una sulfonamida, muestra una analogía estructural con el ác. dihidrofólico (DHF) bloquea la reacción que sintetiza ácido tetrahidrofólico (THF) a partir del ác. dihidrofólico (DHF). También el trimetoprim junto con el sulfametoxazol bloquean distintos pasos de la síntesis de precursores de ADN y ARN y de proteínas (Tortora *et al.* 2015).

Despolarización de la membrana celular

La membrana plasmática de un microorganismo que tiene permeabilidad selectiva participa en los procesos de difusión y transporte activo de moléculas. El contenido citoplasmático y el gradiente, así como las micro y macromoléculas y los iones, se controlan mediante este transporte activo a través de proteínas transportadoras integrales, por lo que la membrana celular controla la composición del medio interno de la célula. Cuando los antimicrobianos alteran la permeabilidad selectiva de la membrana, los gradientes de iones celulares cambian, lo que provoca la salida de iones o la entrada en exceso de otros. Esto provoca alteraciones del metabolismo de la bacteria, por lo que el organismo sufre daño celular y muere (Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Brooks, *et al.*, 2013).

Las membranas plasmáticas de las bacterias están formadas por ácidos grasos que pueden sintetizarse en la célula o tomarse del medio ambiente. El sitio de objetivo de los antimicrobianos son los pasos metabólicos de la síntesis de ácidos grasos y los fosfolípidos, por ejemplo, la polimixina B que tiene péptidos de tipo anfipático que tienen grupos lipofílicos e hidrofílicos rompe la fosfatidiletanolamina de la membrana. La valinomicina, que es un ionóforo, altera el potencial de la membrana celular que contribuye a la fosforilación oxidativa al formar poros en la membrana celular. La daptomicina, anfotericina B, colistina, imidazoles y triazoles también actúan como inhibidores de la membrana celular (Tortora *et al.* 2015; Brooks, *et al.*, 2013)

Mecanismos de resistencia a los antibióticos

La aparición de bacterias que presentan el fenotipo de multirresistencia a diferentes grupos antibióticos ha dificultado su tratamiento (da Silva *et al.*, 2012). El uso indiscriminado de los antibióticos, tanto para humanos, como animales y plantas, ha ocasionado con el tiempo la selección de bacterias resistentes a los antimicrobianos, situación que se agudiza en los hospitales, donde las cepas multirresistentes a los antimicrobianos son consideradas a nivel mundial un serio problema de salud, que incrementa la mortalidad y morbilidad de los pacientes hospitalizados (van Dorp *et al.*, 2019; Organización Mundial de la Salud, 2018).

Debido a que la respuesta bacteriana ante los antibióticos es causada por la gran plasticidad genética que presentan, esto desencadena estrategias genéticas para adaptarse: mutaciones en genes asociados a menudo con el mecanismo de acción contra el antibiótico y la adquisición de ADN por la transferencia horizontal de genes (Munita & Arias, 2016).

Transferencia Horizontal de genes

A su vez, la adquisición de material de ADN extraño a través de la transferencia horizontal de genes es responsable del desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos, siendo así un caso importante de evolución bacteriana. Normalmente las bacterias adquieren material genético externo a través de tres estrategias: transformación, donde se incorpora ADN de bacterias muertas que se encuentra en el exterior; transducción, mediada por bacteriófagos y la conjugación, mecanismo por el cual se transfiere ADN entre bacterias a través del pili sexual (Manson *et al.*, 2010).

Mutaciones

Las bacterias susceptibles a un antibiótico o a varios, pueden seleccionarse como resistentes debido a mutaciones puntuales en genes diana, de esta manera el sitio mutado de unión para un antibiótico en particular impide la unión del fármaco, lo que resulta en la supervivencia bacteriana ante la presencia del antimicrobiano. Una vez que sobrevive una bacteria resistente, el antibiótico elimina la población susceptible y predominan las bacterias resistentes. Las mutaciones que producen resistencia a los antimicrobianos normalmente alteran la acción del antibiótico por medio de los siguientes mecanismos: modificaciones de los sitios diana antimicrobiano, disminución en la absorción del fármaco, activación de mecanismos para expulsar la molécula, o cambios en rutas metabólicas. (Munita & Arias, 2016).

Existen siete mecanismos de resistencia en bacterias Gramnegativas, estos mecanismos incluyen: 1) Pérdida de porinas, que reduce el movimiento del fármaco a través de la membrana celular; 2) Bombas de eflujo transmembrana, que expulsa el fármaco de la bacteria antes de que pueda tener efecto; 3) Presencia de enzimas modificadoras de antibióticos, que hacen que el antibiótico sea incapaz de interactuar con su objetivo; 4) Mutaciones del sitio objetivo, que evitan que el antibiótico se una a su sitio de acción; 5) Mutaciones o modificaciones ribosómicas, que evitan que el antibiótico se una e inhiba la síntesis de proteínas; 7) Mecanismos de derivación metabólica, que utilizan una enzima resistente alternativa para evitar el efecto inhibitor del antibiótico (Peleg & Hooper, 2010).

- *Perdida de porinas*

La membrana externa de las bacterias Gramnegativas, que está conformada por una bicapa asimétrica de fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS), desempeña el papel crucial de proporcionar una capa adicional de protección al organismo sin comprometer el intercambio de material necesario para mantener la vida. La membrana externa actúa como una barrera selectiva. Por lo que, tienen un gran impacto en la susceptibilidad del microorganismo a los antibióticos (Delcour, 2009). Las mutaciones que afectan la expresión y / o función de las porinas (conjunto de proteínas) tienen un impacto directo sobre la susceptibilidad de las bacterias a los antimicrobianos. Estas mutaciones pueden tener diferentes efectos, como la pérdida de porinas, estos cambios dan como resultado una difusión limitada y sustancialmente más lenta del antimicrobiano en la célula y, en consecuencia, una reducción de la destrucción de bacterias. En particular, las mutaciones relacionadas con las porinas pueden influir importantemente en la resistencia a β -lactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclina y cloranfenicol (Fernández & Hancock, 2012).

- *Bombas de eflujo*

Las bombas de eflujo son proteínas de membrana que mantienen las concentraciones intracelulares de la célula en equilibrio, a su vez son un método de resistencia bacteriana en donde las bombas de eflujo permiten que los microorganismos regulen su entorno interno mediante la eliminación de sustancias tóxicas, incluidos agentes antimicrobianos en la que exportan o bombean los antibióticos fuera de la bacteria (Pearson *et al.* 1999 & Džidic *et al.* 2008). Estas bombas están presentes en la membrana citoplásmica y a diferencia de las porinas, que están presentes en la membrana externa, los antibióticos de todas las clases, excepto la polimixina, son susceptibles a la activación de los sistemas de eflujo (Lambert, 2002). La mayoría de ellos son transportadores de múltiples fármacos que son capaces de

bombear una amplia gama de antibióticos (macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas) (Džidic *et al.*, 2008).

- *Enzimas modificadoras de antibióticos*

Existen tres enzimas principales que inactivan antibióticos: β -lactamasas, enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME) y cloranfenicol acetiltransferasa (AAC) (Dockrell *et al.*, 2004).

- β -lactamasas

Las β -lactamasas hidrolizan casi todas las β -lactamas que tienen enlaces éster y amida, por ejemplo, las penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenémicos (Aleksun & Levy, 2007). Hidrolizan la unión peptídica endocíclica del anillo betalactámico. Este es uno de los mecanismo más comunes y frecuentes de resistencia a los antibióticos y su vez presentan constantes mutaciones por lo que provoca la expresión de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Moreno *et al.*, 2009).

- Enzimas modificadoras de aminoglucósidos.

Estas enzimas modificadoras de aminoglucósidos se unen al radical fosfato, adenilo o acetilo de la molécula del antibiótico y, por lo tanto, disminuyen la afinidad del antibiótico y así impiden la unión a la subunidad menor ribosómica 30S (Llano-Sotelo *et al.*, 2002).

- Cloranfenicol-acetil-transferasas

La enzima acetila los grupos hidroxilo del cloranfenicol. El cloranfenicol modificado no puede unirse correctamente a la subunidad mayor 50S ribosomal (Tolmasky, 2000).

- *Modificación del sitio del objetivo*

Otra estrategia es evitar la acción del antibiótico con el sitio de objetivo, esto debido a alguna mutación espontánea de un gen en el cromosoma. Debido a que la interacción del antibiótico con la molécula diana es generalmente específica, una mínima alteración en el sitio de objetivo, puede afectar la unión del antibiótico. Por lo que las bacterias han desarrollado diferentes tácticas (Kapoor *et al.*, 2017).

La modificación del sitio activo es uno de los mecanismos más comunes de resistencia a los antibióticos en patógenos bacterianos que afectan a casi todas las familias de compuestos antimicrobianos. Estos cambios de diana pueden consistir en 1) mutaciones puntuales en los genes que codifican el sitio diana, 2) alteraciones enzimáticas del sitio de unión (por ejemplo, adición de grupos metilo), 3) reemplazo o desvío de la diana original (Munita & Arias, 2016).

- *Mutaciones o modificaciones ribosómicas*

El ribosoma es el eje central de la producción de proteínas dentro de la célula. Está formado por ARN ribosómico (ARNr) y proteínas, el ribosoma bacteriano está integrado por una subunidad grande 50S y una pequeña 30S (Lin *et al.*, 2018). La modificación del ribosoma es una de las formas más directas de resistencia a los antibióticos. Las bacterias a menudo emplean la metiltransferasa para metilar la subunidad grande 23S o la pequeña subunidad 16S del ARNr (Weisblum, 1995; Doi *et al.*, 2016). A través de esta metilación, se previenen las interacciones que los antibióticos producen con cualquiera de estos ARNr y se inhibe la actividad del fármaco. Aunque la modificación del ribosoma es eficaz para prevenir la unión de antibióticos, no necesariamente está exenta de limitaciones ya que algunas modificaciones ribosómicas alteran la traducción (Gupta *et al.*, 2013). Por ejemplo, las mutaciones en la proteína S12 de la subunidad ribosómica 30S inducen resistencia a antibióticos como la paromomicina y la estreptomicina, pero S12 juega un papel importante para asegurar que se forme el triplete correcto de codón-anticodón durante la codificación de la proteína (Traub & Nomura, 1968; Funatsu *et al.*, 1972).

- *Mecanismos de derivación metabólica.*

Las bacterias producen un mecanismo alternativo (generalmente una enzima) que es resistente a la inhibición del antibiótico. Al mismo tiempo, las bacterias también desarrollan un mecanismo nativo, que es sensible a los antibióticos. El mecanismo alternativo permite que las bacterias sobrevivan adoptando el papel de una proteína nativa. La resistencia a trimetoprim y sulfonamidas es causada por la reducción de la sensibilidad y afinidad de las enzimas alteradas dihidropteroato sintetasa (DHPS) y dihidropteroato reductasa (DHFR) al trimetoprim y sulfonamidas (Mayer *et al.*, 1995; Jacoby & Munoz-Price, 2005).

Antecedentes

Recientemente en Brasil se encontró que el 84% (21/25) de cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes del área de cuidados intensivos (UCI) entre enero de 2014 y mayo de 2015 se clasificaron como resistentes a múltiples fármacos (MDR) con elevada resistencia a beta-lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, tigeciclina y colistina. El origen de esas cepas se obtuvo con un hisopo rectal (n= 14), aspirado traqueal (n= 4), orina (n= 1), líquido cefalorraquídeo (n= 1), herida (n= 1), esputo (n= 1), absceso (n= 1), drenaje quirúrgico (n= 1) y punta del catéter (n= 1). (Ferreira, *et al.*, 2019).

Mientras que Dehshiri y colaboradores (2018) realizaron un estudio en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Ciencias Médicas de Yasuj en Irán, que se llevó a cabo entre octubre de 2014 y agosto de 2015 donde se obtuvieron muestras de orina de pacientes confirmados con Infección de vías urinarias provenientes de tres laboratorios de la ciudad. El objetivo del estudio fue investigar la frecuencia de genes que codifican *K. pneumoniae* para las enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Describieron que a partir de 198 cepas de *K. pneumoniae*, aisladas de urocultivos, el 27.5% (54/198) fue resistente a cotrimoxazol, 15.5% (31/198) a cefotaxima, y 12.5% (25/198) a ceftazidina y ceftriaxona, ácido nalidíxico 9% (18/199), amikacina, imipenem 1% (2/198) y meropenem 0% 0/198. Los genes encontrados fueron SHV-1 (betalactamasa) en 53/198 (85,5%), seguido del mayor al menor CTXM-3 (Cefotaxima betalactamasa 3) en 35/198 (56,5%), CTXM-1 (Cefotaxima betalactamasa 1) en 17/198 (27,4%), TEM-1 (Temoneira betalactamasa1) en 10/198 (16,1%) y CTXM-2 (Cefotaxima betalactamasa 2) en 8/198 (8,1%)

Mbelle y colaboradores (2020), realizaron un estudio con 42 cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes, aisladas de orina (n= 14), sangre (n= 13), pus/hisopo y otras fuentes (n= 7), esputo (n= 5) y de origen desconocido (n= 3) de pacientes ingresados en dos hospitales durante un período de cuatro meses de septiembre a diciembre de 2013 en Pretoria, Sudáfrica, describieron que varios genes de resistencia estaban presentes en las cepas. Muchas cepas tuvieron por lo menos dos genes de β -lactamasas, el gen *blaTEM* (Temoneira betalactamasa) estuvo presente en 41/42 (97.6%), *blaOXA* (Oxaxilina betalactamasa) en 36/42 (85.7%) cepas y *blaSHV* (Sulfihidrilo betalactamasa) en 35/42 (83.3%). Dentro de los genes de resistencia a quinolonas, el más frecuente fue *aac (6')-Ib-cr* (quinolona) en 38/42 (90%), seguido de *qnrB* (quinolona) en 20/42 (47.6%), *qnrA* (quinolona) en 6/42 (14,3%) y *qnrS* (quinolona) en 5/42 (11,9%).

Soge y colaboradores (2006) estudiaron 17 plásmidos de *Klebsiella pneumoniae* positivos para CTX-M (Cefotaxima betalactamasa) en pacientes de comunidades de Nigeria con

infecciones en el tracto urinario. Para detectar genes de resistencia realizaron la técnica de hibridación ADN-ADN y para verificar los genes encontrados en la anterior técnica utilizaron la hibridación de los productos de PCR utilizando sondas internas marcadas con ³²P. Encontraron que los plásmidos portaban los siguientes genes: *aac (6')-Ib* (resistencia a los aminoglucósidos) que incluía *aac (6')-Ib-cr* (resistencia a los aminoglucósidos-fluoroquinolonas), *aadA2* (resistencia a aminoglucósidos), *erm (B)* (resistencia a macrólido-lincosamida-estreptogramina B), *blaTEM-1* (resistencia a ampicilina), *tet(A)* (resistencia a tetraciclina), *sul1* (resistencia a sulfonamidas), *dhfr* (resistencia a trimetoprim), 11/17 (65%) plásmidos transportaron el gen *mph(A)* (resistencia a macrólidos), 7/17 (41%) plásmidos portaban el gen *qnrB1* (resistencia a quinolonas de bajo nivel) y 4/17 (24%) plásmidos portaban múltiples genes *cat* como *catA2*, y *catA3* (resistencia al cloranfenicol).

Justificación

Debido a la creciente aparición y propagación de cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes a los antibióticos en los hospitales, aunado a que no se ha estudiado el genotipo de resistencia a los antibióticos en *K. pneumoniae* en México, el presente estudio contribuirá a determinar la frecuencia de los genes de resistencia a los antibióticos en cepas clínicas de *K. pneumoniae*.

Objetivos

General

-Determinar la frecuencia de los genes de resistencia a los antibióticos Estreptomicina (*aadA1*), Gentamicina (*aac(3)-IV*), Sulfonamida (*sul1*), Betalactámicos (*blaSHV*, y *CITM*), Cloranfenicol (*cmIA*, y *cat1*), Tetraciclina (*tet(A)*, *tet(B)*), Trimetoprim (*dfra1*) y Quinolonas (*qnr*) en cepas clínicas de *K. pneumoniae*.

Particulares

- Identificar la frecuencia de *K. pneumoniae* en las infecciones de los pacientes
- Determinar el fenotipo de resistencia a los antibióticos por el método de difusión en placa (Kirby- Bauer) en las cepas de *K. pneumoniae*.

Material y Métodos.

Origen de las cepas

Las cepas fueron aisladas de un grupo de pacientes hospitalizados y ambulatorios del Hospital General Regional (HGR) No. 72 y de la clínica 64 de Tequesquahuac (Tlalnepantla de Baz) con diferentes infecciones (neumonía, heridas quirúrgicas, infecciones de vías urinarias, etc.). Adicionalmente se obtuvo información, como edad, género, folio, diagnóstico, origen de la muestra. Las cepas crecidas en agar MacConKey fueron transportadas al Laboratorio de Análisis Clínicos, CUSI, FES Iztacala, UNAM y se sembraron en agar Mueller Hinton (MH) con un asa estéril y se incubaron a 37 °C por 72 h.

Pruebas bioquímicas

A partir del crecimiento bacteriano, se tomó una colonia con morfología típica de *Klebsiella* spp. con un asa estéril para la identificación por las pruebas bacteriológicas estándar como: Kligler (glucosa y lactosa), sacarosa, manitol, SIM (ácido sulfhídrico, indol y movilidad), citrato y urea.

Determinación del fenotipo de resistencia a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer

Se tomaron 5 colonias de cada cepa mediante un hisopo estéril y se inocularon sobre toda la superficie de las placas de agar MH (Mueller Hinton). Al término con una pinza estéril se tomó un sensidisco que contiene los doce antibióticos (BIO-RAD); AM: ampicilina, CB: carbenicilina, CF: cefalotina, CFX: cefotaxima, CPF: ciprofloxacina, CL: cloranfenicol, NF: nitrofurantoina, AK: amikacina, GE: gentamicina, NET: netilmicina, NOF: norfloxacina, SXT: sulfametoxazol) y se colocaron sobre el tapiz bacteriano en el agar MH; se incubaron las cajas 24 horas a 37°C donde el antimicrobiano se difundió formando un gradiente de concentración, que inhibió o permitió el crecimiento de la bacteria. Dependiendo del diámetro del halo de inhibición (el cual se midió con un vernier) las cepas se clasificaron como susceptibles (S) o resistentes (R), conforme a las recomendaciones del fabricante respecto a los puntos de corte.

Extracción de DNA

Las cepas de *K. pneumoniae* se sembraron en agar Mueller Hinton (MH), y se tomaron varias colonias con un asa estéril y se depositaron en un tubo con tapón de rosca de 16x150 que contenía 2 mL de agua desionizada estéril. El inóculo se agitó en un vortex por 30 seg y se llevó a ebullición durante 20 min. Al término la muestra se colocó en hielo por 10 min. y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante que contiene el DNA se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se guardó a -20 °C hasta su utilización.

Identificación de *Klebsiella pneumoniae* por PCR

K. pneumoniae se identificó por PCR convencional basado en el espaciador interno transcrito 16S–23S (Liu *et al.*, 2008) utilizando los siguientes oligonucleótidos:

K. pneumoniae Pf ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT y *K. pneumoniae* Pr1 TTTCACTCTGAAGTTTTCTTGTGTTC. El tamaño del amplicón fue de 130 pb. Para lo cual en un tubo eppendorf de 200 microlitros se agregó 1 microlitro de cada oligonucleótido (Forward y Reverse; 10 pmol), 6 microlitros del kit Kapa Taq Ready Mix de PCR, 4 microlitros de agua libre de nucleasas y 3 microlitros de DNA molde, para un volumen final de 15 microlitros. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 5 min. a 95 °C, 40 ciclos (desnaturalización por 30 seg. a 94 °C, alineación por 30 seg. a 55 °C y extensión de 1 min. a 72 °C). Finalmente, la extensión se prolongó por 10 minutos a 72 °C. Posteriormente los productos de PCR se sometieron a una electroforesis en geles de agarosa al 2% para observar su presencia o ausencia.

Análisis de los amplicones por electroforesis en gel de agarosa

Se preparó una solución stock concentrada 10X de Tris-borato (TBE) que contenía: 108 gr. Tris base, 40 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0), 55 gr. de ácido bórico y se aforó a 1 L con agua destilada. Para llevar a cabo la electroforesis se necesitó de TBE 1X por lo que la solución stock se diluyó 1:10 hasta tener una concentración 10x. Posteriormente se preparó el gel de agarosa al 2%, por lo que se pesó 2 gr. de agarosa y se depositó en 100 mL de TBE 10X para ser fundida hasta quedar una solución transparente. Después se agregó 0.7 microlitros de Midori Green (reactivo fluorescente) por cada 100 mL de agarosa. La agarosa se depositó en un contenedor que contenía un peine para que se formaran los pozos. Una vez gelificada la agarosa se retiró el peine y el gel se introdujo a la cámara de electroforesis junto con el TBE 10X hasta cubrir el gel. Se colocaron 5 microlitros de los amplicones de

PCR en los pozos y 1 microlitro del marcador de peso molecular (100 pb). Las condiciones para correr el gel fueron: 120 volts, 94 mA durante 45 min.

Identificación por PCR de los genes que codifican resistencia a los antibióticos en las cepas de *K. pneumoniae*

Con el propósito de identificar los genes de resistencia a los antibióticos pertenecientes a los grupos de aminoglucósidos, sulfonamidas, betalactámicos, cloranfenicol, trimetoprim y quinolonas que se probaron por el método de Kirby-Bauer, dichos genes fueron seleccionados para su identificación, además de los genes de resistencia a las tetraciclinas dada la poca efectividad de estos antibióticos en la práctica médica de administración.

Para la identificación de los genes de resistencia a tetraciclina [*tet (A)* y *tet(B)*], en un tubo eppendorf se agregó 1 microlitro de cada oligonucleótido (Forward y Reverse; 10 pmol, cuadro 2), 6 microlitros del kit Kapa Taq Ready Mix, 4 microlitros de agua libre de nucleasas y 3 microlitros de DNA molde, para un volumen final de 15 microlitros. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 7 min. a 95 °C, 30 ciclos (desnaturalización por 30 seg. a 95 °C, alineación por 30 seg. a 56 °C y extensión de 30 min. a 72 °C). Finalmente, la extensión se prolongó por 10 minutos a 72 °C (Randall *et al.*, 2004).

Para la identificación por separado de los genes de resistencia a trimetoprim [*dhfrA1*] y quinolonas [*qnr*], en un tubo eppendorf se agregó 1 microlitro de cada oligonucleótido (Forward y Reverse; 10 pmol, cuadro 2), 6 microlitros del kit Kapa Taq Ready Mix, 4 microlitros de agua libre de nucleasas y 3 microlitros de DNA molde, para un volumen final de 15 microlitros. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 5 min. a 95 °C, 30 ciclos (desnaturalización por 30 seg. a 92 °C, alineación por 30 seg. a 50 °C y extensión de 1 min. a 72 °C). Finalmente, la extensión se prolongó por 10 minutos a 72 °C (Toro *et al.*, 2005).

Para identificar el gen de resistencia a Gentamicina [*aac(3)-IV*], en un tubo eppendorf se agregó 1 microlitro de cada oligonucleótido (Forward y Reverse; 10 pmol, cuadro 2), 6 microlitros del kit Kapa Taq Ready Mix, 4 microlitros de agua libre de nucleasas y 3 microlitros de DNA molde, con un volumen final de 15 microlitros. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 5 min. a 94 °C, 30 ciclos (desnaturalización por 30 seg. a 94 °C, alineación por 30 seg. a 50 °C y extensión de 1 min. a 72 °C). Finalmente, la extensión se prolongó por 10 minutos a 72 °C (Mammeri *et al.*, 2005).

Para identificar por separado los genes de resistencia a Estreptomina [*aadA1*], Sulfonamida [*sul1*], Beta-lactamasas [*blaSHV*, *CITM*], y Cloranfenicol [*cmIA*, *cat1*], en un tubo eppendorf se agregó 1 microlitro de cada oligonucleótido (Forward y Reverse 10 pmol, cuadro 2), 6 microlitros del kit Kapa Taq Ready Mix, 4 microlitros de agua libre de nucleasas y 3 microlitros de DNA molde, para un volumen final de 15 microlitros. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 15 min. a 95 °C, 30 ciclos (desnaturalización por 30 seg. a 94 °C, alineación por 30 seg. a 58 °C y extensión de 1 min. a 72 °C). Finalmente, la extensión se prolongó por 10 minutos a 72 °C (Van *et al.*, 2008).

Los amplicones se visualizaron por electroforesis en agarosa al 2% con condiciones de corrimiento de 120 V, 94mA por 45 min.

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de resistencia a los antibióticos en las cepas de *K. pneumoniae*

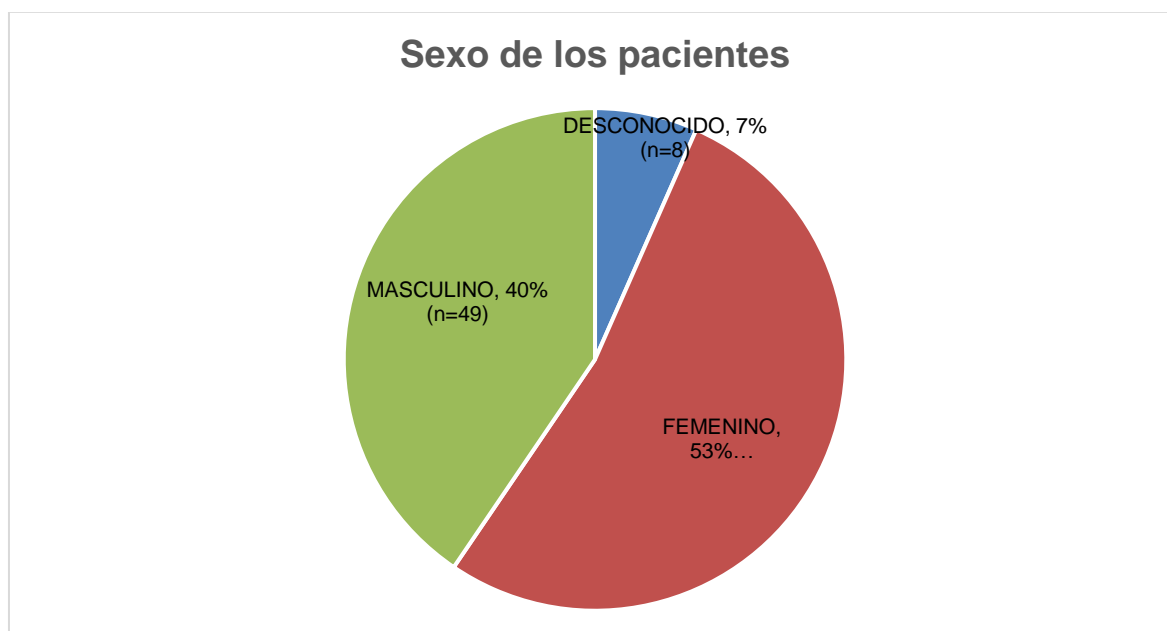
Antibiótico	Gen	Secuencia del oligonucleótido (5'-3')	Tamaños de los amplicones (pb)
Estreptomina	<i>aadA1</i>	(F) TATCCAGCTAAGCGGAACT	447
		(R) ATTTGCCGACTACCTTGGTC	
Gentamicina	<i>aac(3)IV</i>	(F) CTCAGGATGGCAAGTTGGT	286
		(R) TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	
Sulfonamida	<i>sul I</i>	(F) TTCGGCATTCTGAATCTCAC	822
		(R) ATGATCTAACCTCGGTCTC	
Beta-lactámico	<i>blaSHV</i>	(F) TCGCCTGTGTATTATCTCCC	768
		(R) CGCAGATAAATCACCACAATG	
	<i>CITM</i>	(F) TGGCCAGAAGTACAGGCAAA	462
		(R) TTTCTCTGAACGTGGCTGGC	
Cloranfenicol	<i>cat1</i>	(F) AGTTGCTCAATGTACCTATAACC	547
		(R) TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	
	<i>cmIA</i>	(F) CCGCCACGGTGTGTTGTTATC	698
		(R) CACCTTGCCCTGCCATCATTAG	

Tetraciclina	<i>tet(A)</i>	(F) GGTTCACTCGAACGACGTCA	577	
		(R) CTGTCCGACAAGTTGCATGA		
	<i>tet(B)</i>	(F) CCTCAGCTTCTCAACGCGTG		634
		(R) GCACCTTGCTGATGACTCTT		
Trimetoprim	<i>dfrA1</i>	(F) GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC	367	
		(R) GCACCTTGCTGATGACTCTT		
Quinolonas	<i>qnr</i>	(F) GGGTATGGATATTATTGATAAAG		670
		(R) CTAATCCGGCAGCACTATTTA		

Análisis y Resultados

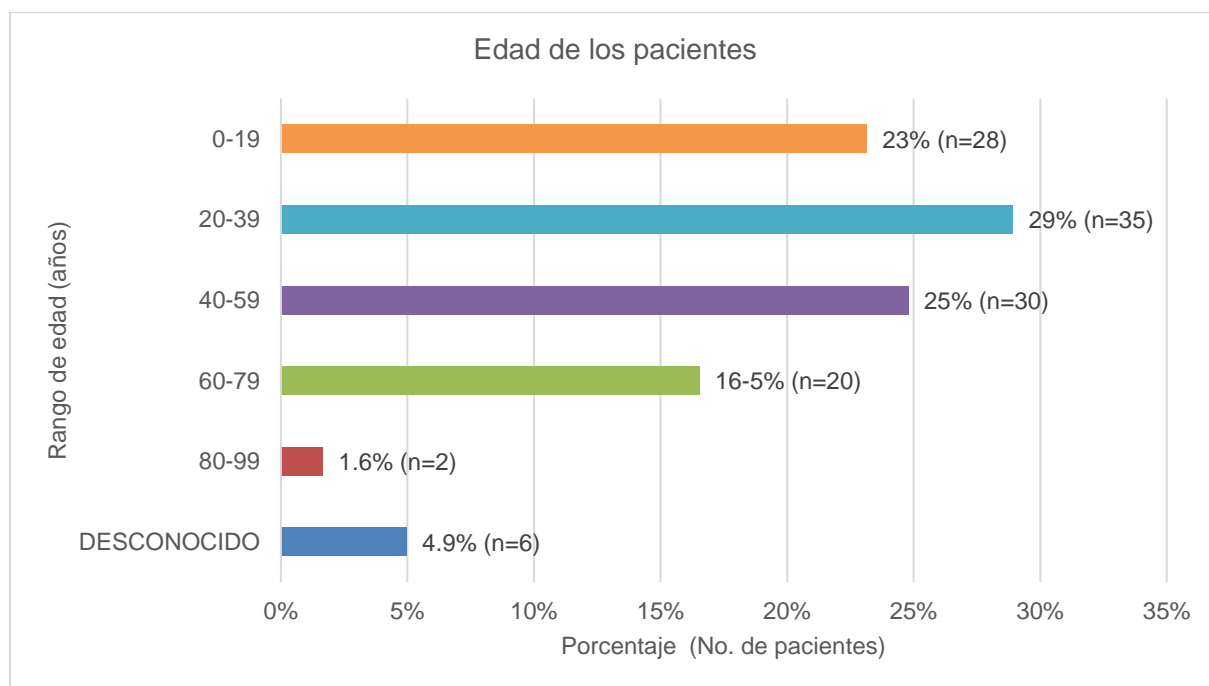
Pacientes estudiados

Se analizaron 121 pacientes infectados con *K. pneumoniae*. La mayoría de los pacientes fueron mujeres con el 53% (n=64), y el 40% (n=49) hombres. No fue posible establecer el sexo del 7% (n=8) restante de los pacientes (Gráfica 1).



Gráfica 1. Porcentaje del sexo de los pacientes estudiados. Rojo-Femenino, Verde-Masculino y Azul-Desconocido.

En la Gráfica 2 se observa la edad de los pacientes. El rango de edad más frecuente se encontró en el intervalo de 20-39 años con el 29% (n=35), seguido del rango de 40-59 años con el 25%(n=30), de 0-19 años con el 23% (n=28), de 60-79 años con el 16.5% (n=20), de 80-99 años con el 1.6% (n=2) y por último los pacientes con edad desconocida con 4.9% (n=6).



Gráfica 2. Porcentaje de los rangos de edad de los pacientes estudiados.

Origen de las muestras

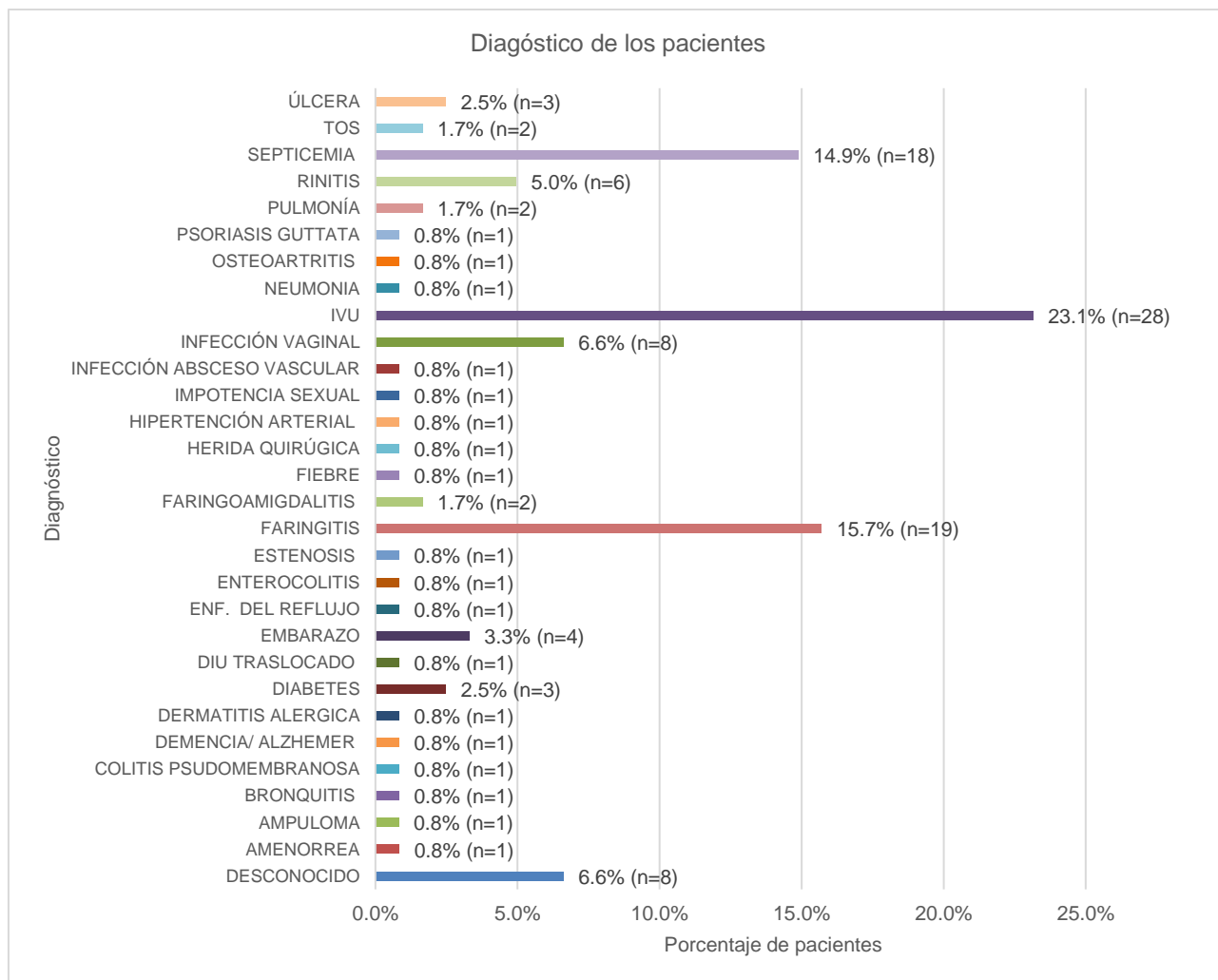
De los 121 pacientes infectados con *K. pneumoniae* el 29.8% (n= 36) de las muestras fue obtenida de exudados faríngeos y la misma cantidad (29.8%) para los urocultivos. El 12.4% (n=15) fue obtenida de hemocultivos, 9.1% (n= 11) de exudados vaginales, 2.5% (n=3) fue obtenido por exudado nasal, expectoración y catéter, el 1.6% (n=2) por exudado de herida y úlcera. Por último, con un 0.8% (n=1) se encuentran las muestras por coprocultivo, exudado uretral, lavado bronquial y cultivo de secreción. No fue posible identificar el origen del 5% (n=6) de las muestras (Cuadro 3.).

Cuadro 3. Origen de las muestras obtenidas de los pacientes.

Tipo de muestra	No. de pacientes N=121	Porcentaje %
Catéter	3	2.5
Coprocultivo	1	0.8
Expectoración	3	2.5
Exudado de herida	2	1.6
Exudado faríngeo	36	29.8
Exudado nasal	3	2.5
Exudado uretral	1	0.8
Exudado vaginal	11	9.1
Hemocultivo	15	12.4
Lavado bronquial	1	0.8
Secreción	1	0.8
Úlcera	2	1.6
Urocultivo	36	29.8
Desconocido	6	5.0

Diagnóstico de los pacientes

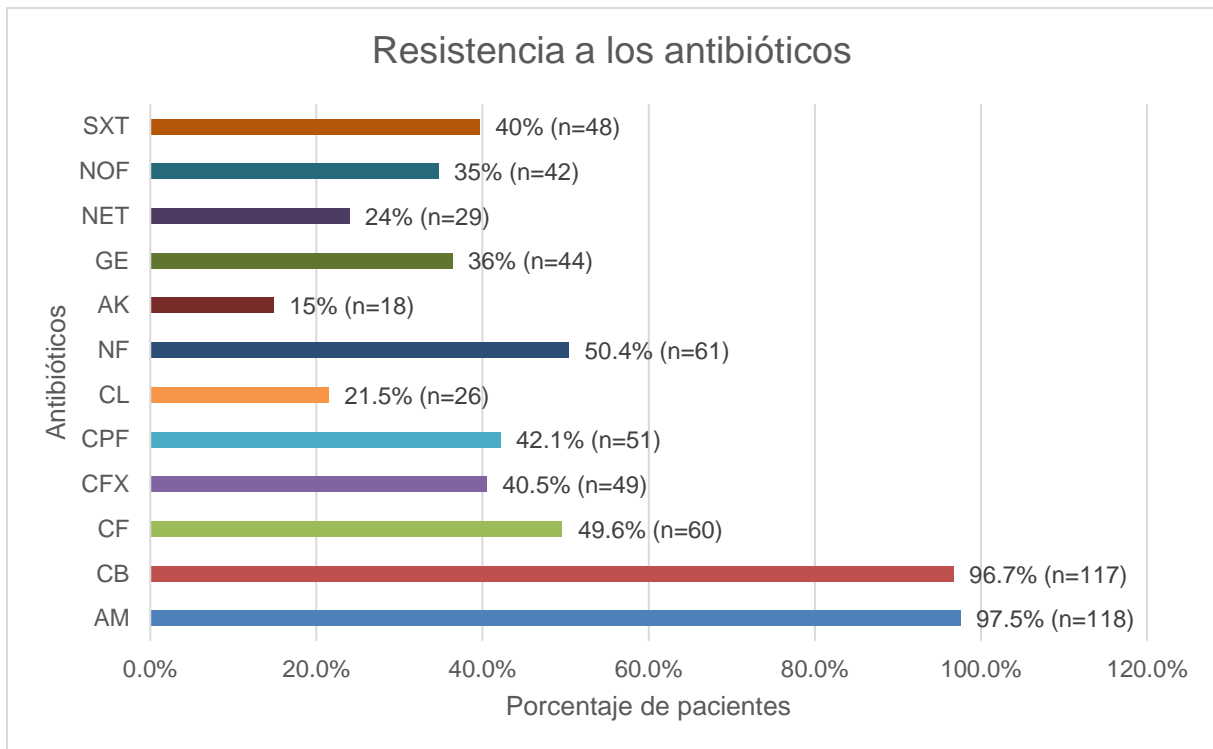
De acuerdo a los registros proporcionados (Gráfica 3) se obtuvo que, en su mayoría, los pacientes fueron diagnosticados con infección de vías urinarias (23.1%, n=28), faringitis (15.7%, n=19) y septicemia con un 14.9% (n=18), seguido de infección vaginal y diagnóstico desconocido con un 6.6% (n=8), ambas. Rinitis con un 5% (n=6), un 3.3% (n=4) de los pacientes fueron diagnosticado con embarazo, un 2.5% (n=3) con úlcera y diabetes y el 1.7% (n=2), tos, pulmonía, faringoamigdalitis. Por último, un 0.8% (n=1) presentó psoriasis guttata, osteoartritis, neumonía, infección de absceso vascular, impotencia sexual, hipertensión arterial, herida quirúrgica, fiebre, estenosis, enterocolitis, reflujo, DIU traslocado, dermatitis alérgica, demencia/Alzheimer, colitis pseudomembranosa, bronquitis, ampuloma y amenorrea.



Gráfica 3. Diagnósticos de los pacientes estudiados.

Fenotipo de resistencia a los antibióticos

Por el método de Kirby-Bauer se observó que el 97.5% (n=118) de las cepas fue resistente a Ampicilina (AM), 96.7% (n=117) a Carbenicilina (CB), 50.4% (n=61) a Nitrofurantoina (NF) y 49.6% (n=60) a Cefalotina (CF). La resistencia a Ciprofloxacina (CPF) fue del 42.1% (n=51), 40.5% (n=49) a Cefotaxima (CFX) y Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT) del 40%(n=48). Gentamicina (GE) 36% (n=44) y Norfloxacina (NOF) 35% (n=42). Los menores porcentajes se encontraron para Netilmicina (NET) con 24% (n=29), Cloranfenicol (CL) con 21.5%(n=26) y Amikacina (AK) con 15%(n=18). (Gráfica 4)



Gráfica 4. Porcentaje de pacientes que fueron resistentes a los antibióticos: (SXT) Sulfametoxazol y Trimetoprim, (NOF) Norfloxacin, (NET) Netilmicina, (GE) Gentamicina, (AK) Amikacina, (NF) Nitrofurantoína, (CL) Cloranfenicol, (CPF) Ciprofloxacina, (CFX) Cefotaxima, (CF) Cefalotina, (CB) Carbenicilina, y (AM) Ampicilina.

Identificación por PCR de los genes que codifican resistencia a los antibióticos en las cepas de *K. pneumoniae*.

Como se muestra en el Cuadro 4, la mayoría de las cepas presentó el gen *tet(A)* (tetraciclina) con un 71.1% (86/121), *blaSHV* (betalactámico) con un 62.8% (76/121), *sul 1* (sulfonamida) con 60% (72/121), *CITM* (betalactámico) con 57.9% (70/121), *aac(3)-IV* (gentamicina) con 46.3% (56/121), y *aadA1* (estreptomicina) con 36.4% (44/121). Los genes menos frecuentes fueron *dfra1* (trimetoprim) con un 16.5% (20/121), *cmIA* (cloranfenicol) con un 13.2% (16/121), *cat 1* (cloranfenicol) con 12.4% (15/121), y *tet(B)* (tetraciclina) con un 8.3% (10/121). El gen *qnr* (quinolona) no se identificó en ninguna de las cepas estudiadas.

Cuadro 4. Genes de resistencia a los antibióticos en cepas de *K. pneumoniae*.

Grupo de antibiótico	Gen	Número de cepas (n=121)	Porcentaje %
Aminoglucósidos -Gentamicina -Estreptomina	<i>aac(3)IV</i>	56	46.3
	<i>aadA1</i>	44	36.4
Tetraciclinas	<i>tetA</i>	86	71.1
	<i>teB</i>	10	8.3
Cloranfenicol	<i>cat1</i>	15	12.4
	<i>cmIA</i>	16	13.2
Beta-lactámico	<i>blaSHV</i>	76	62.8
	<i>CITM</i>	70	57.9
Trimetoprim	<i>dfrA1</i>	20	16.5
Sulfonamida	<i>sul1</i>	72	59.5
Quinolonas	<i>qnr</i>	0	0

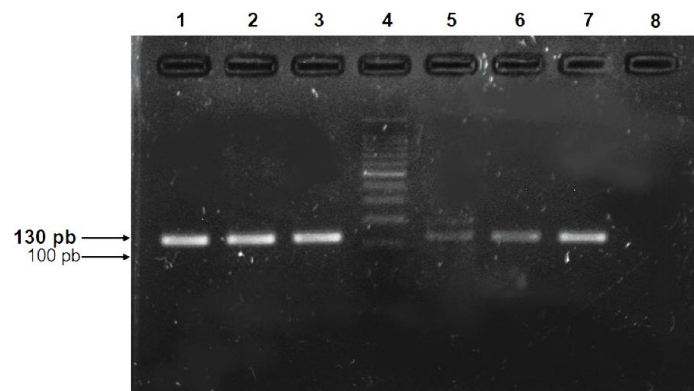


Figura 1. Detección por PCR del gen 16S-23S de *K. pneumoniae*. Carriles 2-3 y 5-7, cepas positivas; Carril 1, control positivo (*K. pneumoniae* ATCC 700721); Carril 4, marcador de peso molecular (MWM 100 bp-ladder); Carril 8, control negativo (sin DNA molde).

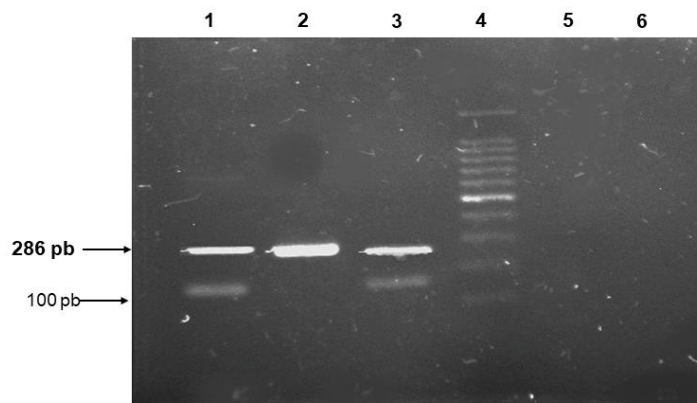


Figura 2. Detección por PCR de *aac(3)IV* en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Carriles 2 y 3, cepas positivas; Carril 1, control positivo (*K. pneumoniae* del cepario del Lab. clínico); Carril 4, marcador de peso molecular (MWM 100 bp-ladder); Carril 5, cepa negativa al gen; Carril 6, control negativo (sin DNA molde).

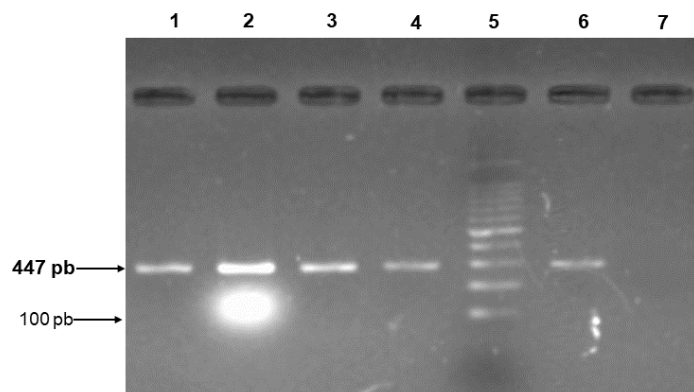


Figura 3. Detección por PCR de *aadA1* en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Carriles 2-4, y 6, cepas positivas; Carril 1, control positivo (*K. pneumoniae* del cepario); Carril 5, marcador de peso molecular (MWM 100 bp-ladder); Carril 7, control negativo (sin DNA molde).

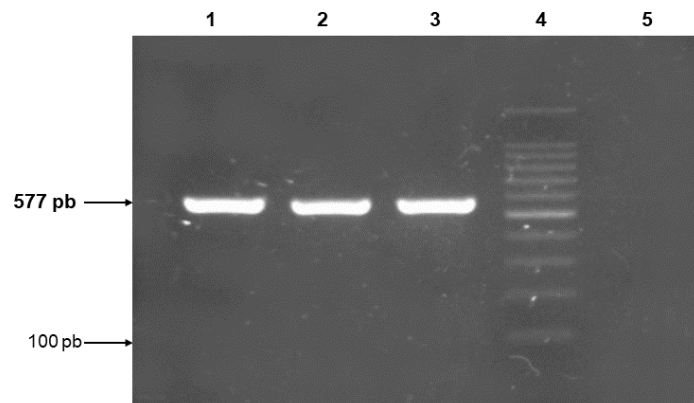


Figura 4. Detección por PCR de *tet(A)* en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Carriles 2 y 3, cepas positivas; Carril 1, control positivo (*K. pneumoniae* del cepario); Carril 4, marcador de peso molecular (MWM 100 bp-ladder); Carril 5, control negativo (sin DNA molde).

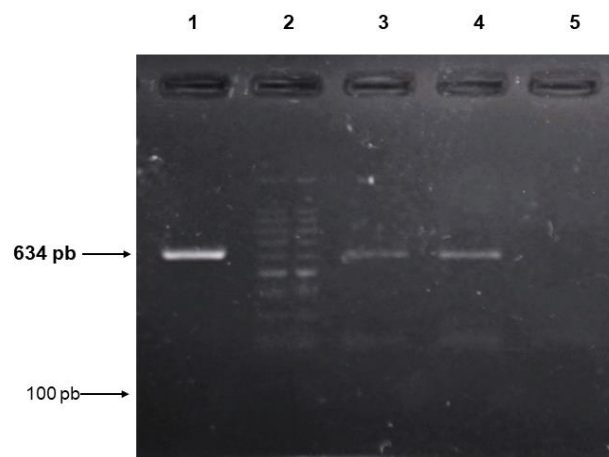


Figura 5. Detección por PCR de *tet(B)* en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Carriles 3 y 4, cepas positivas; Carril 1, control positivo (*K. pneumoniae* del cepario); Carril 2, marcador de peso molecular (MWM 100 bp-ladder); Carril 5, control negativo (sin DNA molde).

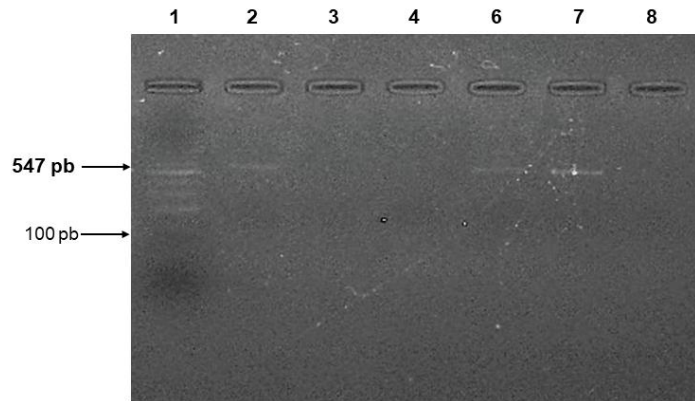


Figura 6. Detección por PCR de *cat 1* en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Carriles, 6 y 7, cepas positivas; Carril 2, control positivo (*K. pneumoniae* del cepario); Carriles 3 y 4, cepas negativas al gen; Carril 1, marcador de peso molecular (MWM 100 bp-ladder); Carril 8, control negativo (sin DNA molde).

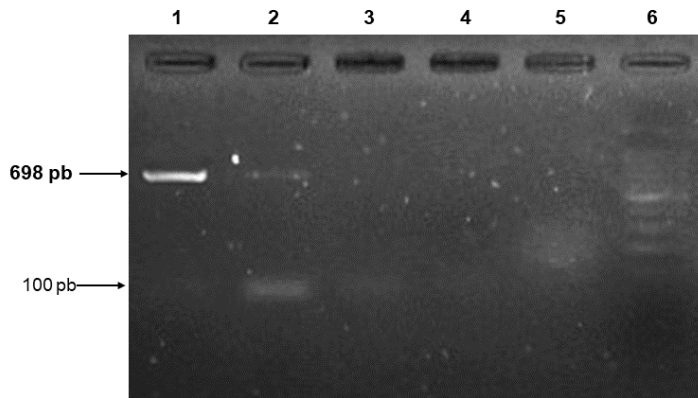


Figura 7. Detección por PCR de *cmIA* en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Carril 2, cepas positivas; Carril 1, control positivo (*K. pneumoniae* del cepario); Carril 6, marcador de peso molecular (MWM 100 bp-ladder); Carriles 3 y 4, cepas negativas al gen; Carril 5, control negativo (sin DNA molde).

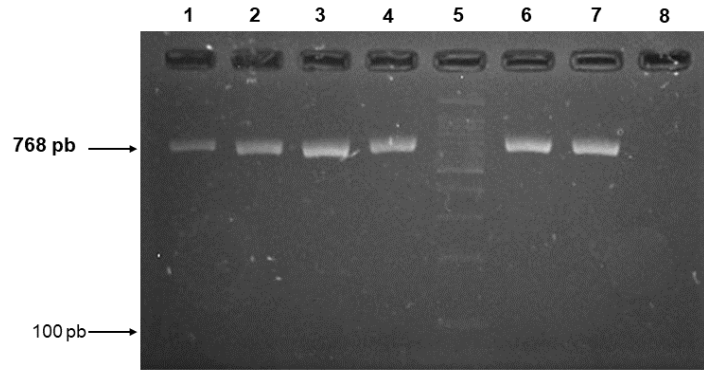


Figura 8. Detección por PCR de *blaSHV* en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Carriles 2-4, y 6-7, cepas positivas; Carril 1, control positivo (*K. pneumoniae* del cepario); Carril 5, marcador de peso molecular (MWM 100 bp-ladder); Carril 8, control negativo (sin DNA molde).

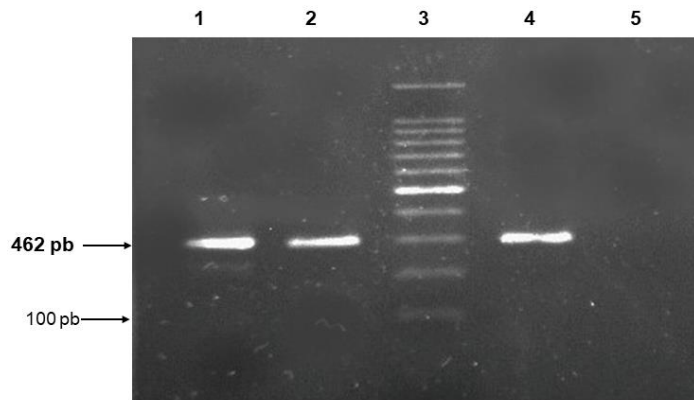


Figura 9. Detección por PCR de *CITM* en cepas de *Klebsiella pneumoniae*: Carriles 2 y 4, cepas positivas; Carril 1, control positivo (*K. pneumoniae* del cepario); Carril 3, marcador de peso molecular (MWM 100 bp-ladder); Carril 5, control negativo (sin DNA molde).

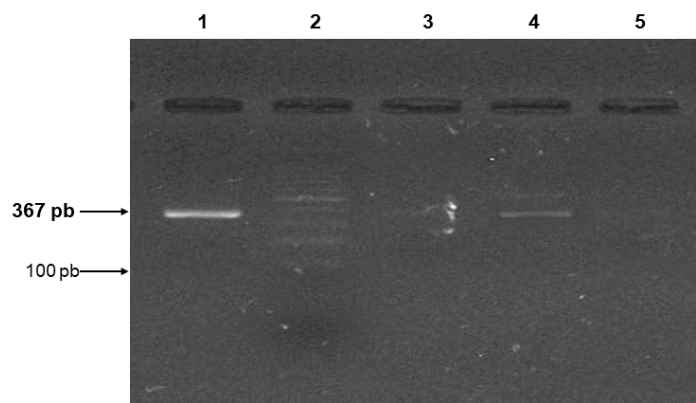


Figura 10. Detección por PCR de *dfrA1* en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Carriles 3 y 4, cepas positivas; Carril 1, control positivo (*K. pneumoniae* del cepario); Carril 2, marcador de peso molecular (MWM 100 bp-ladder); Carril 5, control negativo (sin DNA molde).

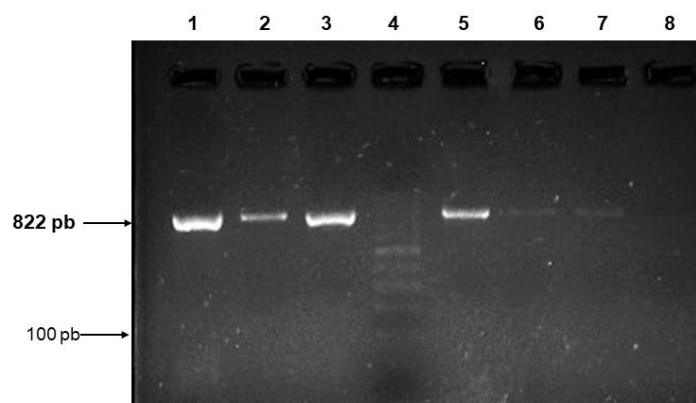


Figura 11. Detección por PCR de *sul 1* en cepas de *Klebsiella pneumoniae*: Carril 2-3 y 5-7, cepas positivas; Carril 1, control positivo (*K. pneumoniae* del cepario); Carril 4, marcador de peso molecular (MWM 100 bp-ladder); Carril 8, control negativo (sin DNA molde).

Discusión

Pacientes estudiados

En este trabajo se encontró que a partir de las 121 cepas de *K. pneumoniae* aisladas, el 53% (64/121) correspondió a hombres y el 40% (49/121) a mujeres (Gráfica 1). Estos datos contrastan con lo descrito por Vasaikar *et al.*, (2017), en donde aislaron un total de 169 cepas de *K. pneumoniae*, las cuales en su mayoría fueron de mujeres con un 52.5% (169/202), y en hombres del 47.5% (96/202). Asimismo, Dehghan *et al.* (2017) menciona que de un total de 58 aislamientos de *K. pneumoniae*, 22 de ellos (37.9%) fueron en su mayoría de mujeres y 18 (31%) de hombres.

En este estudio se describió que la edad de los pacientes infectados por *K. pneumoniae* comprendió desde recién nacidos hasta 83 años, en donde el rango de edad de 20-39 fue el más abundante con el 29%, seguido del rango de 40-59 años (25%) (Gráfica 2). Estos datos son semejantes a lo reportado por Ferreira *et al.*, (2019), donde describieron que las edades de los pacientes del área de cuidados intensivos oscilaron entre 1 día a 75 años de edad, dentro de los cuales el rango de edad más abundante fue el de 19-59 años (36%).

Origen de las muestras y Diagnóstico de los pacientes

Klebsiella pneumoniae se ha asociado con diversas enfermedades, como infecciones del tracto urinario, septicemia, y diarrea, además de ser la causa principal de infecciones del tracto respiratorio (Podschun & Ullmann, 1998). En este estudio se encontró que la mayoría de las cepas fueron aisladas de pacientes con infecciones de vías urinarias (urocultivos; 29.8%) y de infecciones respiratorias (exudados faríngeos; 29.8%) (Cuadro 3). Estos porcentajes contrastan con los encontrados en un estudio realizado en 50 cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), entre el 1 de enero al 31 de diciembre del 2009 (Cruz-Cordoba y *et al.*, 2014). Estos autores describieron que la mayoría de las cepas fueron aisladas de cultivos de orina 48% (24/50), de sangre 24% (12/50), de catéteres 18% (9/50), y de líquido cefalorraquídeo con 10% (5/50).

Las infecciones del tracto urinario se encuentran entre las más comunes de todas las infecciones bacterianas, dentro de las cuales *Escherichia coli* y *K. pneumoniae* son las principales bacterias responsables de las infecciones urinarias, lo cual coincide con lo descrito recientemente en un estudio realizado en 161 urocultivos positivos de pacientes hospitalizados, donde *E. coli* fue aislada en el 52.2% y *K.pneumoniae* en el 13.7% (Kot *et al.*, 2021).

En este estudio se encontró que el 29.8% (n=36) de las cepas de *K. pneumoniae* fueron aisladas de exudados faríngeos de los pacientes (Cuadro 3). Este porcentaje es semejante al reportado en un estudio realizado en India, durante el periodo de enero a diciembre de 2012 en 158 exudados faríngeos de pacientes, de los cuales 67 de ellos (42.4%) fueron cultivos positivos para patógenos. Estos autores describieron que los patógenos aislados con más frecuencia fueron *Staphylococcus aureus* con el 34.3%, seguido de *Streptococcus pyogenes* 25.3% y *Klebsiella pneumoniae* con el 23.8% (Mokkapati & Yalamanchili, 2013).

La inmunosupresión de los pacientes hospitalizados es un gran riesgo para adquirir septicemia por *K. pneumoniae*. En este trabajo se encontró que *K. pneumoniae* fue aislada del 12.4% (n=15) de los hemocultivos de los pacientes diagnosticados con septicemia (19.9%, n= 18). Se ha descrito que *K. pneumoniae* es una de las principales causas de sepsis neonatal (SN) (Camacho-Gonzales & Spearman, 2013; Verma *et al.* 2015). Este microorganismo representa la SN del 4 al 9% de los casos en países desarrollados y del 16 a 28% en países en desarrollo (Stoll, *et al.* 2002; Zea-Vera & Ochoa, 2015).

Resistencia a los antibióticos

En este trabajo se encontró que los porcentajes más altos de resistencia bacteriana a los antibióticos fue para ampicilina (97.5%), carbenicilina (96.7%), nitrofurantoína (50.4%) cefalotina (49.6%) y trimetoprim con sulfametoxazol (40%; Gráfica 4). La elevada resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos (ampicilina, carbenicilina, y cefalotina), y trimetoprim con sulfametoxazol puede deberse a que estos antibióticos son utilizados con relativa frecuencia en nuestro país para tratar las infecciones bacterianas, originando con el tiempo la selección de cepas resistentes a estos agentes. Estos porcentajes coinciden con los descritos en un estudio realizado en el Hospital General Regional No. 1 del IMSS en Chihuahua, México, en el cual se aislaron 31 especies bacterianas a partir de 1079 infecciones nosocomiales, entre ellas *E. coli* (19.3%), *S. aureus* (20%), *P. aeruginosa* (15.3%) y *K. pneumoniae* (5.3%). Estos autores describieron que el 100% (n=6) de las cepas de *K. pneumoniae* fue resistente a ampicilina y cefotaxima, 89.5% al trimetoprim-sulfametoxazol, y 73.7 % a cefuroxima y ciprofloxacina (Salazar-Holguín *et al.*, 2016).

La elevada resistencia a carbenicilina, ampicilina, y cefalotina (Gráfica 4) coincide con la descrita en otro estudio realizado en India en 20 cepas de *K. pneumoniae* recuperadas de casos de pus, infecciones del tracto urinario y respiratorias, en el que se reportó que el 100 % de las cepas fue resistente a carbenicilina, 76% a ampicilina y cefotaxima, en cada caso

y 62% para cloranfenicol, mientras que los menores porcentajes de resistencia fueron para gentamicina (15%) y ciprofloxacina 12% (Sikarwar & Batra, 2011).

La elevada multiresistencia a los antibióticos en las cepas de *K. pneumoniae* a los antibióticos encontrada en este trabajo representa un problema de salud no solo en México, sino también en otras partes del mundo, que disminuye las alternativas de tratamiento para los pacientes hospitalizados, por ejemplo en un estudio realizado en 115 cepas Gramnegativas (40% fueron *K. pneumoniae*) aisladas de sangre, orina, y aspirados traqueales/esputo en el laboratorio de microbiología del Hospital Shahid Bahonar, Teherán, se describió que el 100% de las cepas fue resistente a ampicilina, el 76.5% a ciprofloxacina y norfloxacina, en cada caso, 68.7% a gentamicina, y 42.6% para nitrofurantoina. (Alipourfard & Nili, 2011).

Identificación de los genes de resistencia a los antibióticos

En este trabajo se encontró que la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* analizadas fue portadora del gen de resistencia a tetraciclina (*tet(A)*; 71.1%), seguido del gen de betalactamasas *blaSHV* con un 62.8%, Sulfonamidas gen *sul 1* con 60%, el gen de betalactamasas *CITM* con 57.9%, y los genes de resistencia a los aminoglucósidos *aac(3)-IV* con 46.3%, y *aadA1* con 36.4% (Cuadro 4). Los genes menos frecuentes fueron el del trimetoprim *dfra1* con un 16.5%, los genes de cloranfenicol *cmIA* con un 13.2%, y *cat 1* con 12.4%, y *tet(B)* con un 8.3%). La elevada distribución de los genes de resistencia a los antibióticos encontrada en las cepas de *K. pneumoniae* refleja que la diseminación de estos marcadores genéticos mediante plásmidos a través del mecanismo de conjugación es un gran problema de salud que se agudiza en los hospitales, principalmente entre los pacientes inmunocomprometidos, por ejemplo en un estudio realizado en 17 plásmidos CTX-M aislados de cepas uropatógenas de *K. pneumoniae* (Soge *et al.*, 2006), se encontró que todos los plásmidos portaron los siguientes genes: *aac (60)-Ib* (resistencia a los aminoglucósidos) que incluía *aac(60)-Ib-cr* (resistencia a los aminoglucósidos-fluoroquinolonas), *aadA2* (resistencia a los aminoglucósidos A2), *erm (B)* (resistencia a macrólido-lincosamida-estreptogramina B), *blaTEM-1* (resistencia a ampicilina), *tet (A)* (resistencia a tetraciclina), *sul1* (resistencia a sulfonamidas), *dfra* (resistencia a trimetoprim) *int11*, una integrasa asociada con integrones de clase 1. Once (65%) plásmidos portaron un gen *mph(A)* (resistencia a macrólidos), siete (41%) plásmidos portaron un gen *qnrB1* (resistencia a quinolonas) y cuatro (24%) plásmidos portaron múltiples genes *cat* (resistencia al cloranfenicol).

La elevada distribución del genotipo de resistencia a los antibióticos encontrada en las cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Cuadro 4) es un factor de riesgo importante que incrementa la

morbilidad y mortalidad (Choi *et al.*, 2019; Cha *et al.*, 2018), principalmente en pacientes inmunocomprometidos (Liu *et al.*, 2019; Balkhair *et al.*, 2017). En México recientemente el PUCRA (Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana) reportó durante el 2017 el aislamiento de 699 cepas de *K. pneumoniae* a partir de hemocultivos de 14 centros hospitalarios (segundo y tercer nivel de atención), distribuidos en cinco estados de la república y en la ciudad de México, la mayoría de estas cepas fue resistente a los antibióticos betalactámicos por la producción de betalactamasas de espectro extendido (ESBLs) (Ponce de León, 2018). Recientemente en nuestro país se realizó un estudio para establecer la resistencia bacteriana a los antibióticos y el consumo de los mismos en los hospitales, describiendo que durante el periodo de 2016-2017, en el que se realizaron 4382 aislamientos en sangre y orina se encontró con mayor frecuencia a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, las cuales presentaron más del 30% de resistencia a los antibióticos probados, mientras que la resistencia para amikacina y carbapenémicos fue menor al 20% (Miranda *et al.*, 2020).

Conclusiones

1. Se demostró que *K. pneumoniae* es uno de los principales patógenos responsables de las infecciones nosocomiales.
2. Los principales diagnósticos asociados a las infecciones por *K. pneumoniae* fueron las infecciones de vías urinarias, faringitis, septicemia e infecciones vaginales.
3. La mayoría de las cepas fue resistente a los antibióticos betalactámicos (ampicilina, carbenicilina, cefalotina y ciprofloxacina), así como también se encontró un elevado porcentaje de resistencia a nitrofurantoína, y trimetoprim con sulfametoxazol.
4. Se encontró una elevada frecuencia de cepas de *K. pneumoniae* portadora de los genes de resistencia a los betalactámicos, tetraciclina, aminoglucósidos, y sulfonamidas, lo que podría complicar el tratamiento médico de los pacientes hospitalizados.

Referencias

1. Alekshun, M. N., & Levy, S. B. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037-1050.
2. Alipourfard, I., & Nili, N. Y. 2011. Antibiogram of Extended Spectrum Beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Hospital Samples. *Bangladesh Journal of Medical Microbiology*, 4(1), 32–36.
3. Auerbach, T., Bashan A., Yonath A. 2004. Ribosomal antibiotics: structural basis for resistance, synergism and selectivity. *Trends in Biotechnology*. 22(11), 570-577.
4. Ayars, H., Altman, L., Fretwell, M. 1982 Effect of decreased salivation and pH on the adherence of *Klebsiella* species to human buccal epithelial cells. *Infection and Immunity*. 38: 179-182.
5. Bagley, S. 1985. Habitat Association of *Klebsiella* Species. *Infection Control*. 6(2), 52-58.
6. Balkhair A, Al-Muharrmi Z, Al'Adawi B, Al Busaidi I, Taher HB, Al-Siyabi T, Al Amin M, Hassan KS. Prevalence and 30-day all-cause mortality of carbapenem-and colistin-resistant bacteraemia caused by *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*: Description of a decade-long trend. *Int J Infect Dis*. 2019;85:10-15.
7. Brooks, G., Carroll K., Butel J., Morse S., Mietzner T. 2013. Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 26th ed. New York: McGraw Hill Education.
8. Brooks, G., Carroll, K. C., Butel, J., Morse, S., Jawetz, M. & Adelbergs. 2017. *Medical Microbiology*. 27th edition. McGraw Hill Professional. 231–244.
9. Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 27(1), 44-52.
10. Camacho-Gonzalez, A., Spearman, P. W., & Stoll, B. J. 2013. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. *Pediatric Clinics*, 60(2), 367-389.
11. Carabarin, L.A, León-Izurieta, L., Rocha-Gracia, C., Castañeda-Lucio, M., Torres, C., Gutiérrez-Cazarez, Z., González-Posos, S., Martínez de la Peña, C., Martinez-Laguna, Y., Lozano-Zarain, P. 2016. First evidence of polar flagella in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient with neonatal sepsis. *Journal of Medical Microbiology*. 65(8), 729-737.

12. Cha, M., Kang, C., Kim, S., Chung, D., Peck, K., Lee, N., Song, J. 2018. High Prevalence of CTX-M-15-Type Extended-Spectrum β -Lactamase Among AmpC β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates Causing Bacteremia in Korea. *Microbial Drug Resistance*. 24(7):1002-1005.
13. Choi, M., Tennant, S. M., Simon, R., Cross, A.S. 2019. Progress towards the development of *Klebsiella* vaccines. *Expert Rev Vaccines*.28:1-11.
14. Ciobotaro, P., Oved, M., Nadir, E., Bardenstein, R., & Zimhony, O. 2011. An effective intervention to limit the spread of an epidemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an acute care setting: from theory to practice. *American journal of infection control*, 39(8), 671-677.
15. Cruz-Córdova, A., Esteban-Kenel, V., Espinosa-Mazariego, K., Ochoa, S. A., Moreno, S., de la Garza Elhain, A., Fernández, E., López, E. O., & Xicohtencatl-Cortes, J. 2014. Pathogenic determinants of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains associated with their persistence in the hospital environment. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*. 71(1), 15-24
16. da Silva, R. M., Traebert, J., & Galato, D. 2012. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*: a review of epidemiological and clinical aspects. *Expert opinion on biological therapy*, 12(6), 663-671.
17. Dehghan, F., Zolghadri, N., & Karmostaji, A. 2017. Genetic determinants of antibiotic resistance in hospital and community isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Jundishapur J Microbiol*. 10(5).
18. Dehshiri, M., Khoramrooz, S. S., Zoladl, M., Khosravani, S. A., Parhizgari, N., Motazedian, M. H., Jahedi, S. & Sharifi, A. 2018. The frequency of *Klebsiella pneumoniae* encoding genes for CTX-M, TEM-1 and SHV-1 extended-spectrum beta lactamases enzymes isolated from urinary tract infection. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 17(1), 4.
19. Delcour A. H. 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et biophysica acta*, 1794(5), 808–816.
20. Dockrell, H.M., Goering, R.V., Roitt, I., Wakelin, D. & Zuckerman, M. 2004. En: Attacking the enemy: Antimicrobial agents and chemotherapy. *Medical Microbiology*. Netherlands. Elsevier Mosby, 473-507.
21. Doi, Y., Wachino, J. & Arakawa, Y. 2016. Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infectious Disease Clinics of North America*. 30, 523-537.

22. Džidic, S., Šuškovic, J., Kos, B. 2008. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotechnol.* 46:11–21
23. Fernández, L. & Hancock, R. E. 2012. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical microbiology reviews*, 25(4), 661-681.
24. Ferreira, R.L., da Silva, B. C. M., Rezende, G. S., Nakamura-Silva, R., Pitondo-Silva, A., Campanini, E. B., Brito, M. C. A., da Silva, E. M. L., Freire, C. C. M., Cunha, A. F. & Pranchevicius, M.C. 2019. High Prevalence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Harboring Several Virulence and B-Lactamase Encoding Genes in a Brazilian Intensive Care Unit. *Frontiers in Microbiology.* 9:3198.
25. Funatsu, G., Nierhaus, K., & Wittmann, H. G. 1972. Ribosomal proteins. XXXVII. Determination of allele types and amino acid exchanges in protein S12 of three streptomycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 287(2), 282-291.
26. Gupta, P., Sothiselvam, S., Vázquez-Laslop, N. & Mankin, A. 2013. Deregulation of translation due to post-transcriptional modification of rRNA explains why erm genes are inducible. *Nature Communications.* 4, 1984.
27. Hornick, B., Allen, B., Horn, M., Clegg, S. 1992. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infection and Immunity.* 60: 1577-1588.
28. Iwahi, T., Abe, Y., Nakao, M., Imada, A., Tsuchiya, K. 1983. Role of type 1 fimbriae in the pathogenesis of ascending urinary tract infection induced by *Escherichia coli*. *Infection and Immunity.* 39: 1307-1315.
29. Jacoby, G., Munoz-Price, L. 2005. The new β -lactamases. *The New England Journal of Medicine.* 352:380-91.
30. Kang, C. I., Kim, S. H., Bang, J. W., Kim, H. B., Kim, N. J., Kim, E. C. & Choe, K. W. 2006. Community-acquired versus nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: clinical features, treatment outcomes, and clinical implication of antimicrobial resistance. *Journal of Korean medical science*, 21(5), 816-822.
31. Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, 33(3), 300–305.
32. Kingsley, R., Rabsch, W., Stephens, P., Roberts, M., Reissbrodt, R., & Williams, P. H. 1995. Iron supplying systems of *Salmonella* in diagnostics,

- epidemiology and infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 11(4), 257-264.
33. Kirmusaoğlu, S., Gareayaghi, N., & Kocazeybek, B. S. 2019. Introductory Chapter: The Action Mechanisms of Antibiotics and Antibiotic Resistance. *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*, 3.
 34. Kot, B., Grużewska, A., Szweda, P., Wicha, J., & Parulska, U. 2021. Antibiotic Resistance of Uropathogens Isolated from Patients Hospitalized in District Hospital in Central Poland in 2020. *Antibiotics*, 10(4), 447.
 35. Lambert, P.A. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med*. 95(41), 22–6.
 36. Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., and Zhou, D. 2014. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.* 9, 1071–1081.
 37. Lin, J., Zhou, D., Steitz, T., Polikanov, Y. & Gagnon, M. 2018. Ribosome-targeting antibiotics: modes of action, mechanisms of resistance, and implications for drug design. *Annual Review of Biochemistry*. 87, 451-478
 38. Liu B, Yi H, Fang J, Han L, Zhou M, Guo Y. 2019. Antimicrobial resistance and riskfactors for mortality of pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* among diabetics: a retrospective study conducted in Shanghai, China. *Infect Drug Resist.*12:1089-1098
 39. Liu, Y., Liu, C., Zheng, W., Zhang, X., Yu, J., Gao, Q., Hou, Y. & Huang, X. 2008. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S–23S internal transcribed spacer. *International Journal of Food Microbiology* 125, 230–235.
 40. Llano-Sotelo, B., Azucena Jr, E. F., Kotra, L. P., Mobashery, S., & Chow, C. S. 2002. Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chemistry & biology*, 9(4), 455-463.
 41. Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª edición. Madrid: Pearson Prentice Hall.
 42. Magill, S. S., Edwards, J. R., Bamberg, W., Beldavs, Z. G., Dumyati, G., Kainer, M. A., & Ray, S. M. 2014. Multistate point-prevalence survey of health care–associated infections. *New England Journal of Medicine*, 370(13), 1198-1208.
 43. Mammeri, H., Van De Loo, M., Poirel, L., Martinez-Martinez, L., & Nordmann, P. 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(1), 71-76.

44. Manson, J. M., Hancock, L. E., & Gilmore, M. S. 2010. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(27), 12269-12274.
45. Mayer, K., Opal, S., Medeiros, A. 1995. Mechanisms of antibiotic resistance. In: Mandell G., Bennett, J., Dolin. R. Basic principles in the diagnosis and management of infectious diseases. Philadelphia : Elsevier. p. 212-25.
46. Mbelle, N. M., Feldman, C., Sekyere, J. O., Maningi, N. E., Modipane, L., & Essack, S. Y. 2020. Pathogenomics and Evolutionary Epidemiology of Multi-Drug Resistant Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Pretoria, South Africa. *Scientific Reports*, 10(1), 1-17.
47. Meatherall, B. L., Gregson, D., Ross, T., Pitout, J. D., & Laupland, K. B. 2009. Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *The American journal of medicine*, 122(9), 866-873.
48. Merino, S., Camprubí, S., Albertý, S., Benedí, V.J., Tomás, J.M. 1992. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infection and Immunity*. 60: 2529-2535.
49. Miranda-Novales MG, Flores-Moreno K, López-Vidal Y, Rodríguez-Álvarez M, Solórzano-Santos F, Soto-Hernández JL, Ponce de León-Rosales S; UNCAR Network*. Antimicrobial resistance and antibiotic consumption in Mexican hospitals *Salud Publica Mex*. 2020;62(1):42-49.
50. Mokkupati, A., & Yalamanchili, M. 2013. Bacterial Isolates Causing Pharyngitis. *International Journal of Biological & Medical Research*. 4(2), 3118-3120
51. Montgomerie, J. Z., & Ota, J. K. 1980. *Klebsiella* bacteremia. *Archives of internal medicine*, 140(4), 525-527.
52. Moreno, C., González, R., & Beltrán, C. 2009. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 69(2), 185-192.
53. Munita, J. M., & Arias, C. A. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.
54. Old, D., Tavendale, A., Senior, B. 1985. A comparative study of the type-3 fimbriae of *Klebsiella* species. *Journal of Medical Microbiology*. 20: 203-214.
55. Organización Mundial de la Salud. 2018. *Resistencia a los antimicrobianos*. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>.

56. Patel, S.S., Chauhan, H.C., Patel, A.C., Shrimali M.D., Patel, K.B., Prajapati, B.I., Kala, J.K., Patel M.G., Manish R., Patel, M.A. 2017. Isolation and identification of *Klebsiella pneumoniae* from sheep-case report. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*. 6(5):331–4
57. Pearson, J.P., Van Delden, C. & Iglewski, B.H. 1998. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol*. 181:1203–10.
58. Peleg, A. Y., & Hooper, D. C. 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England journal of medicine*. 362(19), 1804–1813.
59. Podschun, R., & Ullmann, U. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*. 11(4), 589–603.
60. Podschun, R., Fischer, A., Ullmann, U. 1992. Siderophore production of *Klebsiella* species isolated from different sources. *Zentbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Ser*. 276: 481-486.
61. Ponce de León. Programa Universitario de Investigación en Salud. Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y Consumo de antibióticos. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2018.
62. Przondo–Hessek A, Pulverer G. 1983. Hemagglutinins of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *Zentbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Ser*. 255: 472– 478.
63. Randall, L. P., Cooles, S. W., Osborn, M. K., Piddock, L. J. V., & Woodward, M. J. 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), 208-216.
64. Reygaert, W. C. 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482.
65. Salazar-Holguín, H., & Cisneros-Robledo, M. 2016. Resistencia a los antimicrobianos de agentes causales de las principales infecciones nosocomiales. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 54(4), 462-471.
66. Shakib, P., Kalani, M. T., Ramazanzadeh, R., Ahmadi, A., & Rouhi, S. 2018. Molecular detection of virulence genes in *Klebsiella Pneumoniae* clinical

- isolates from Kurdistan Province, Iran. *Biomedical Research and Therapy*. 5(8), 2581-2589.
67. Shlaes, D. 2006 An update on tetracyclines. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 7(2),167-71.
68. Sikarwar, A. S., & Batra, H. V. 2011. Prevalence of antimicrobial drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* in India. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 1(3), 211.
69. Simoons-Smit A, Verweij-van Vught A, McLaren D. 1986. The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. *Journal of Clinical Microbiology*. 21: 133-137.
70. Soge, O., Adeniyi, B., & Roberts, M. 2006. New antibiotic resistance genes associated with CTX-M plasmids from uropathogenic Nigerian *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(5), 1048-1053.
71. Stamm, W. E. 1991. Catheter-associated urinary tract infections: epidemiology, pathogenesis, and prevention. *The American journal of medicine*, 91(3), S65-S71.
72. Stoll, B. J., Hansen, N., Fanaroff, A. A., Wright, L. L., Carlo, W. A., Ehrenkranz, R. A. & Poole, W. K. 2002. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, 110(2), 285-291.
73. Tarkkanen, A., Virkola, R., Clegg, S., Korhonen, T. 1997. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. *Infection and Immunity*. 65: 1546-1549.
74. Tolmasky, M. E. 2000. Bacterial resistance to aminoglycosides and beta-lactams: the Tn1331 transposon paradigm. *Frontiers in Bioscience*, 5(10), 11.
75. Toro, C. S., Farfán, M., Contreras, I., Flores, O., Navarro, N., Mora, G. C., & Prado, V. 2005. Genetic analysis of antibiotic-resistance determinants in multidrug-resistant *Shigella* strains isolated from Chilean children. *Epidemiology & Infection*, 133(1), 81-86.
76. Tortora, G., Funke B., Case C. 2015. *Microbiology: An Introduction*. 12th ed. London: Pearson Education.
77. Traub, P., Nomura, M. 1968. Streptomycin resistance mutation in *Escherichia coli*: altered ribosomal protein. *Science*. 160, 198-199.
78. Van Dorp, L., Wang, Q., Shaw, L. P., Acman, M., Brynildsrud, O. B., Eldholm, V., Wang, R., Gao, H., Yin, Y., Chen, H., Ding, D., Farrer, R., Didelot, X., Balloux, F. & Ding, C. 2019. Rapid phenotypic evolution in multidrug-resistant

- Klebsiella pneumoniae hospital outbreak strains. *Microbial genomics*, 5(4), 1-11.
79. Van, T. T. H., Chin, J., Chapman, T., Tran, L. T., & Coloe, P. J. 2008. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of Escherichia coli isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *International journal of food microbiology*, 124(3), 217-223.
80. Vasaikar, S., Obi, L., Morobe, I., & Bisi-Johnson, M. 2017. Molecular characteristics and antibiotic resistance profiles of Klebsiella isolates in Mthatha, Eastern Cape province, South Africa. *International journal of microbiology*, 2017.
81. Verma, P., Berwal, P. K., Nagaraj, N., Swami, S., Jivaji, P., & Narayan, S. 2015. Neonatal sepsis: epidemiology, clinical spectrum, recent antimicrobial agents and their antibiotic susceptibility pattern. *International Journal of Contemporary Pediatrics*, 2(3), 176-180.
82. Virkola, R., Westerlund, B., Holthöfer, H., Parkkinen, J., Kekomäki, M., Korhonen, T. 1988. Binding characteristics of Escherichia coli adhesins in human urinary bladder. *Infection and Immunity*. 56: 2615-2622.
83. Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39, 577-585.
84. Won, S. Y., Munoz-Price, L. S., Lolans, K., Hota, B., Weinstein, R. A., Hayden, M. K., & Centers for Disease Control and Prevention Epicenter Program. 2011. Emergence and rapid regional spread of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical infectious diseases*, 53(6), 532-540.
85. Zea-Vera, A., & Ochoa, T. J. 2015. Challenges in the diagnosis and management of neonatal sepsis. *Journal of tropical pediatrics*, 61(1), 1-13.