



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Caracterización molecular de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos de un Hospital pediátrico de tercer nivel de atención, mediante análisis multilocus de secuencias (MLST), en el periodo 2020-2021.

TESIS

Que para obtener el título de

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

AMANDA SANDOVAL FLORES

TUTOR

DR. SAMUEL PONCE DE LEÓN ROSALES



CDMX

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor: MALDONADO MANJARREZ LUIS ANGEL
VOCAL:	Profesor: DOMINGUEZ RAMIREZ LILA LUBIANKA
SECRETARIO:	Profesor: PONCE DE LEÓN ROSALES SAMUEL
1er. SUPLENTE:	Profesor: DIAZ GARCIA FRANCISCO JAVIER
2° SUPLENTE:	Profesor: BRITO ARELLANO HUGO ALFREDO

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de microbioma y resistencia antimicrobiana, 4to piso de la Torre de Investigación (Edificio H), Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, UNAM.

Protocolo aprobado por el Comité de Investigación y por el Comité de Ética de la Investigación, Facultad de Medicina, UNAM: "Caracterización molecular de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos recibidos a la red del Plan Universitario de Control a la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA), UNAM" con número de registro **FM/DI/067/2023**.

Protocolo aprobado por el Comité Local de Investigación en Salud No. 3603, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS: "Caracterización molecular de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas mediante tipificación de multilocus de secuencias", con número de registro institucional. **R-2022-3603-037**.

ASESOR DEL TEMA: _____

Dr. Samuel Ponce de León Rosales

SUPERVISOR TÉCNICO: _____

Dra. María Guadalupe Miranda Novales

SUSTENTANTE (S): _____

Amanda Sandoval Flores

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNAM, que desde la preparatoria me ha brindado todas las herramientas necesarias para ser una profesionista.

Al Programa Universitario para el Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) del Programa Universitario de Investigación sobre Riesgos Epidemiológicos y Emergentes (PUIREE) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por proporcionar las instalaciones, equipo y por el apoyo económico brindando para la realización del proyecto a través de la “BECA DE APOYO PARA EGRESADOS DEL ÁREA DE CIENCIAS DE LA SALUD”.

A la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund” del Centro Médico Nacional Siglo XXI y al Dr. Rafael Arias por la donación de los aislamientos con los que se trabajaron en este proyecto.

Al Dr. Samuel Ponce de León Rosales y la Dra. María Guadalupe Miranda Novales por permitirme ser parte de la Red PUCRA y por el apoyo y asesoría brindados para la realización de este proyecto.

A la M. en C. Karen Flores Moreno, por la confianza, el tiempo y su invaluable asesoría y capacitación que, sin lugar a duda, son parte fundamental de mi formación profesional y de la realización de este trabajo.

A Karla Gallegos y a Ricardo Millán, miembros de la Red PUCRA, por su incondicional apoyo a lo largo de este proyecto, pero sobre todo, por su valiosa amistad.

A la Dra. Kathia Constance Lüneberg Rodríguez del Instituto de Geología, por su asesoría en el análisis bioinformático.

A las responsables del Laboratorio Temático de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud del Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LaNaBio), Laura Márquez y Nelly López.

Asimismo, al Dr. Luis Ángel Maldonado y la Dra. Lila Lubianka Domínguez por su tiempo y comentarios para la mejora del presente trabajo.

DEDICATORIA

ÍNDICE TEMÁTICO

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
1.1.1. Importancia en infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS)	3
1.1.2. Factores de virulencia	6
1.1.2.1. Cápsula	6
1.1.2.2. Lipopolisacárido (LPS)	6
1.1.2.3. Fimbrias	7
1.1.2.4. Sideróforos	7
1.2. Resistencia a los antimicrobianos (RAM)	7
1.2.1. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos	8
1.2.2. Antibióticos β -lactámicos	9
1.2.2.1. Carbapenémicos	10
1.2.3. β -lactamasas	12
1.2.3.1. Clasificación de las β -lactamasas	13
1.2.4. <i>K. pneumoniae</i> y la RAM en México.	15
1.3. Tipificación multilocus de secuencias (MLST)	16
1.3.1. Herramientas bioinformáticas para el análisis de datos obtenidos por MLST.	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo general	20
2.2. Objetivos particulares	20
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	21
3.1. Origen y obtención de las cepas bacterianas	22
3.1.1. Conservación de cepas	22
3.1.2. Siembra de microorganismos	22
3.1.3. Extracción y cuantificación de ADN.....	22
3.2. Caracterización molecular mediante MLST	22
3.2.1. Estandarización de amplificación por PCR punto final.....	22
3.2.2. Amplificación de 7 genes altamente conservados por PCR punto final	24
3.2.3. Purificación y secuenciación	25
3.3. Análisis bioinformático	25
3.3.1. Curado y alineamiento de secuencias	25
3.3.2. Identificación de perfiles alélicos y Secuencias tipo (ST's)	25

3.3.3.	Identificación de Complejos Clonales (CC)	25
4.	RESULTADOS	26
4.1.	Análisis poblacional de las muestras recibidas	26
4.2.	Caracterización molecular mediante MLST	29
4.2.1.	Estandarización de amplificación por PCR punto final	29
4.2.2.	Amplificación de 7 genes altamente conservados por PCR punto final	29
4.3.	Análisis bioinformático	31
4.3.1.	Identificación de perfiles alélicos y Secuencias Tipo (ST's)	31
4.3.2.	Identificación de Complejos Clonales (CC)	33
5.	DISCUSIÓN	35
6.	CONCLUSIONES	40
7.	PERSPECTIVAS	41
8.	REFERENCIAS	42
9.	ANEXO	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Los 10 principales microorganismos aislados causantes de IAAS, notificadas a la plataforma de la RHOVE, México, del 1ro. de enero al 31 de diciembre de 2022.....	5
Figura 2. Representación de los factores de virulencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	6
Figura 3. Diagrama que muestra la relación de MDR, XDR y PDR entre sí.....	8
Figura 4. Estructura química de los β -lactámicos.	10
Figura 5. Procedimiento resumido del análisis por MLST.	17
Figura 6. Resumen del procedimiento experimental.....	21
Figura 7. Distribución porcentual respecto al origen biológico de las muestras analizadas.....	26
Figura 8. Distribución porcentual respecto a la edad de los pacientes con <i>K. pneumoniae</i> resistente a carbapenémicos.....	27
Figura 9. Distribución porcentual respecto al área de hospitalización de los pacientes con <i>K. pneumoniae</i> resistente a carbapenémicos.	28
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de la estandarización de 7 genes conservados de <i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-2146.	29
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones del gen <i>phoE</i> de cepas de <i>K. pneumoniae</i> de origen clínico.....	30
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones del gen <i>pgi</i> de cepas de <i>K. pneumoniae</i> de origen clínico.....	30
Figura 13. Distribución porcentual respecto a las ST's identificadas de <i>K. pneumoniae</i>	33
Figura 14. Representación gráfica del complejo clonal CC485 de <i>K. pneumoniae</i>	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas bioquímicas de identificación para <i>K. pneumoniae</i>	2
Tabla 2. Sistemas de clasificación de las β -lactamasas.....	14
Tabla 3. Componentes de la mezcla de reacción para la PCR punto final de <i>K. pneumoniae</i>	23
Tabla 4. Condiciones para las reacciones de amplificación de los 7 genes conservados de <i>K. pneumoniae</i>	24
Tabla 5. Asignación de la secuencia tipo a partir de los perfiles alélicos.....	32
Tabla 6. Origen, fecha de obtención y recepción de las cepas utilizadas.....	50
Tabla 7. Lista de cebadores para los genes a evaluar por MLST.....	51

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AmpC	Betalactamasa tipo AmpC
BLEE	Betalactamasa de espectro extendido
BIGSdb	Base de datos de secuencias del genoma de aislados bacterianos (por sus siglas en inglés, Bacterial isolate genome sequence database)
BURST	Análisis basado en secuencias tipo relacionadas (por sus siglas en inglés, Based upon related sequence types)
CA	Ácido clavulánico
CC	Complejo clonal
cbp	cantidad bastante para
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CPE	Enterobacterales productoras de carbapenemasas
CRKP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a carbapenémicos (por sus siglas en inglés, Carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i>)
DLV	Variante en dos locus (por sus siglas en inglés, double-locus variant)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
goeBURST	Análisis óptimo global basado en secuencias tipo relacionadas (por sus siglas en inglés, global optimal eBURST)
HGT	Transferencia horizontal de genes (por sus siglas en inglés, Horizontal gene transfer)
IAAS	Infecciones asociadas a la atención de la salud
INVIFAR	Red temática de investigación y vigilancia de la farmacorresistencia
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasa

LaNaBio	Laboratorio Nacional de Biodiversidad
LPS	Lipopolisacárido
MDR	Mutidrogo-resistente
MLEE	Electroforesis de enzimas multilocus (por sus siglas en inglés, Multilocus enzyme electrophoresis)
MLST	Tipificación multilocus de secuencias (por sus siglas en inglés, Multilocus sequence typing)
MST	Árbol de expansión mínima (por sus siglas en inglés, Minimum spanning tree)
NDM-1	Nueva Delhi beta-lactamasa tipo 1
nm	Nanómetros
OMP	Proteína de membrana externa (por sus siglas en inglés, Outer membrane protein)
OMS	Organización Mundial de la Salud.
pb	pares de bases
PBP	Proteínas de unión a penicilina (por sus siglas en inglés Penicillin-binding proteins)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés, Polymerase chain raction)
PDR	Pandrogo-resistente
PFGE	Electroforesis en gel de campos pulsados (por sus siglas en inglés, Pulse-field gel electrophoresis)
PUCRA	Plan universitario de control de la resistencia antimicrobiana
PUIREE	Programa universitario de investigación sobre riesgos epidemiológicos y emergentes
RAM	Resistencia antimicrobiana
RHOVE	Red hospitalaria de vigilancia epidemiológica

SLV	Variante en un locus (por sus siglás en inglés, single locus variant)
ST	Secuencia tipo
TLV	Variante en tres locus (por sus siglas en inglés, triple-locus variant)
TZB	Tazobactam
UCIN	Unidad de cuidados intensivos neonatales
UPGMA	Método de grupo de pares no ponderados con media aritmética (por sus siglas en inglés, Unweighted pair group method with arithmetic mean)
UTIP	Unidad de terapia intensiva pediátrica
WGS	Secuenciación del genoma completo (por sus siglas en inglés, Whole-genome sequencing)
XDR	Extensamente-resistente
µg	microgramos
µl	microlitros

RESUMEN

Klebsiella pneumoniae es un microorganismo oportunista relacionado con las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS), y en los últimos años su resistencia a los antimicrobianos se ha incrementado en diversas regiones del mundo. La biología molecular proporciona técnicas para discriminar entre distintas cepas de una misma especie. Entre las técnicas moleculares disponibles destaca la técnica de “*Tipificación Multilocus de Secuencias*” (por sus siglas en inglés, MLST).

El presente trabajo plantea la tipificación de una colección de cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en un hospital pediátrico de tercer nivel, que forma parte de la Red del Programa Universitario para el Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) del Programa Universitario de Investigación sobre Riesgos Epidemiológicos y Emergentes (PUIREE) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a través de la técnica MLST.

Se amplificaron y secuenciaron siete genes conservados de 20 aislamientos de origen clínico de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, recibidos entre los años 2020 y 2021 a la Red del PUCRA. Se obtuvieron 9 secuencias tipo (ST's), y con ello se logró determinar la relación clonal de estas a partir de su análisis bioinformático.

Se concluyó que los aislamientos identificados como *K. pneumoniae* del hospital mencionado, recibidos a la Red PUCRA, no pertenecen a una misma clona.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Klebsiella pneumoniae*

El género *Klebsiella* es un grupo de bacterias bacilares gram negativas, encapsuladas, inmóviles, anaerobias facultativas y oxidasa negativas (Brisse *et al.*, 2006), que pertenecen a la familia de las Enterobacterales. Cepas de este género se aislaron por primera vez a fines del siglo XIX y Trevisan (1885) las nombró en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs (1834-1913) (Paczosa y Meccas, 2016).

Algunos autores describen 5 especies del género *Klebsiella spp.* (Otman *et al.*, 2007), sin embargo, solo algunas de ellas son de importancia clínica como lo son: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes* y *Klebsiella variicola*. Por ello, sus características bioquímicas son importantes para identificar la especie (Tabla 1). La prueba que diferencia a *K. pneumoniae* de las otras especies mencionadas es la de indol; para *K. pneumoniae* el resultado es negativo y para las demás es positivo.

Tabla 1. Pruebas bioquímicas de identificación para *K. pneumoniae*.

Prueba	Indol	Fermentación de lactosa	Voges-Proskauer	Producción de gas	Movilidad	Lisina	Urea	Citrato	Rojo de metilo	KCN	Sacarosa
Resultado	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+

KCN: Cianuro de potasio. Adaptado de Patel *et al.*, 2017; Otman *et al.*, 2007.

Klebsiella pneumoniae es una especie de importancia nosocomial, ya que es un patógeno oportunista capaz de causar numerosas afecciones potencialmente mortales como neumonías, infecciones del tracto urinario, bacteriemias y abscesos hepáticos (Paczosa y Meccas, 2016).

El tracto gastrointestinal de los pacientes y las manos del personal hospitalario son los principales reservorios de esta bacteria. La capacidad de este organismo para propagarse rápidamente a menudo conduce a brotes nosocomiales, especialmente en unidades neonatales (Podschun y Ullmann, 1998). Además, el equipo médico (contaminado debido a procedimientos de higiene defectuosos) puede favorecer la transmisión y permanencia de *Klebsiella* en el ámbito hospitalario.

Varios estudios han demostrado que la tasa de mortalidad por patógenos gram negativos en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales oscila entre el 10 % y el 67,7 %, y aumenta en presencia de resistencia a carbapenémicos, bacteriemia,

uso inadecuado/retrasado de antibióticos empíricos y enfermedades subyacentes (Bor y Ilhan, 2021).

La aparición de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a los carbapenémicos (por sus siglas en inglés, CRKP) que también muestran resistencia a otros grupos de antibióticos y, sumado a las limitadas opciones terapéuticas disponibles, se han convertido en una amenaza urgente para la salud de la población inmunocomprometida. Las vacunas y los anticuerpos, especialmente los que se dirigen a los polisacáridos capsulares, pueden ser opciones de tratamiento y prevención novedosas y eficaces. Debido a la elevada mortalidad, es importante comprender la propagación de CRKP en poblaciones pediátricas.

Esta especie clasifica como uno de los organismos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter*), que son la principal causa de infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) en el mundo, y que se han agrupado bajo ese acrónimo debido a que escapan fácilmente a la acción de los antibióticos (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

Klebsiella pneumoniae emplea muchas estrategias para crecer y protegerse de la respuesta inmunitaria del huésped. Su patogenicidad está impulsada por una amplia gama de factores que interactúan y que están presentes en todas las cepas.

1.1.1. Importancia en infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS)

Las IAAS, se definen de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), como “*aquellas infecciones que afectan a un paciente durante el proceso de asistencia en un hospital o Centro Sanitario, que no estaba presente, ni en período de incubación al momento de su ingreso y que pueden inclusive llegar a manifestarse después del alta del paciente*” (RHOVE, 2023).

Para contraer una infección por *Klebsiella*, una persona debe estar expuesta a la bacteria. Por ejemplo, *Klebsiella* debe ingresar al tracto respiratorio para causar neumonía, o a la sangre para causar una infección en el torrente sanguíneo.

En entornos de atención médica, *Klebsiella* se puede propagar a través del contacto persona a persona (por ejemplo, de un paciente a otro paciente por medio de las manos contaminadas del personal de atención médica) o, con menos frecuencia, a través de la contaminación del medio ambiente, pues los pacientes también pueden estar expuestos a este microorganismo cuando están conectados a ventiladores (dispositivos que los asisten para respirar) o tienen catéteres intravenosos (en las venas) o heridas (causadas por lesiones o cirugía), que actúan como vía de entrada.

Desafortunadamente, los dispositivos médicos y condiciones intrahospitalarias pueden permitir que dicho patógeno ingrese al cuerpo y cause una infección o enfermedad.

La higiene de manos es la medida más importante para la prevención y control de las IAAS, las cuales pueden derivar en una respuesta inflamatoria mejor conocida como sepsis.

En 2005, la OMS lanzó el primer reto mundial por la seguridad del paciente llamado: “*Una atención limpia es una atención más segura*”. Éste se encuentra encaminado a que todos los profesionales de la salud realicen higiene de las manos durante los procesos de atención a la salud, como una medida primordial para disminuir las IAAS. (WHO, 2005)

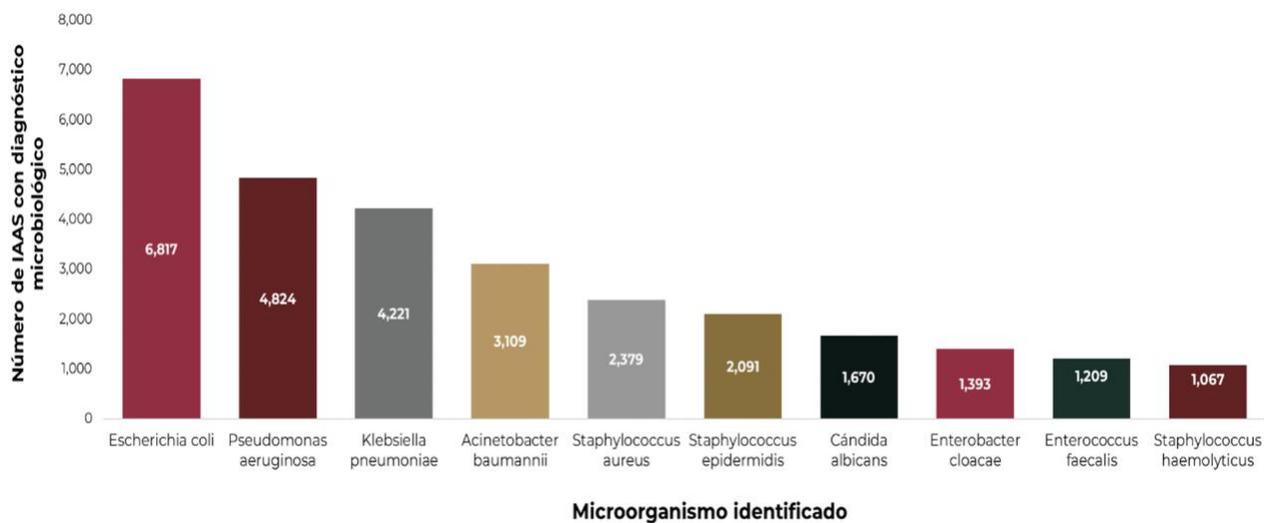
Según éste programa, durante el contacto con los pacientes hay que cumplir la exigencia de higiene de las manos en cinco momentos clave, preferiblemente mediante un desinfectante a base de alcohol o lavándoselas con agua y jabón si están claramente sucias. Esos cinco momentos son los siguientes:

- Antes de tocar al paciente;
- Antes de iniciar procedimientos que exigen limpieza y asepsia (por ejemplo la inserción de dispositivos tales como catéteres);
- Después de entrar en contacto con humores corporales;
- Después de tocar al paciente;
- Después de tocar objetos del entorno del paciente.

La Secretaria de Salud en México, a través de la Norma Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales; indica que “*la higiene de manos debe realizarse por todo el personal de salud al entrar en contacto con el ambiente hospitalario*”.

La Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) de la Secretaría de Salud, en su Boletín “Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud”, señaló que *K. pneumoniae* se encuentra en el tercer lugar de los 10 principales microorganismos causantes de IAAS notificadas a la plataforma RHOVE, en el periodo de enero a diciembre de 2022. (Figura 1). La RHOVE señala la presencia de la mayor parte de estos agentes como un indicador de falta de apego a acciones de prevención y control como la higiene de manos, la calidad del agua, la adecuada desinfección del ambiente, entre otros (RHOVE, 2023).

Figura 1. Los 10 principales microorganismos aislados causantes de IAAS, notificadas a la plataforma de la RHOVE, México, del 1ro. de enero al 31 de diciembre de 2022.

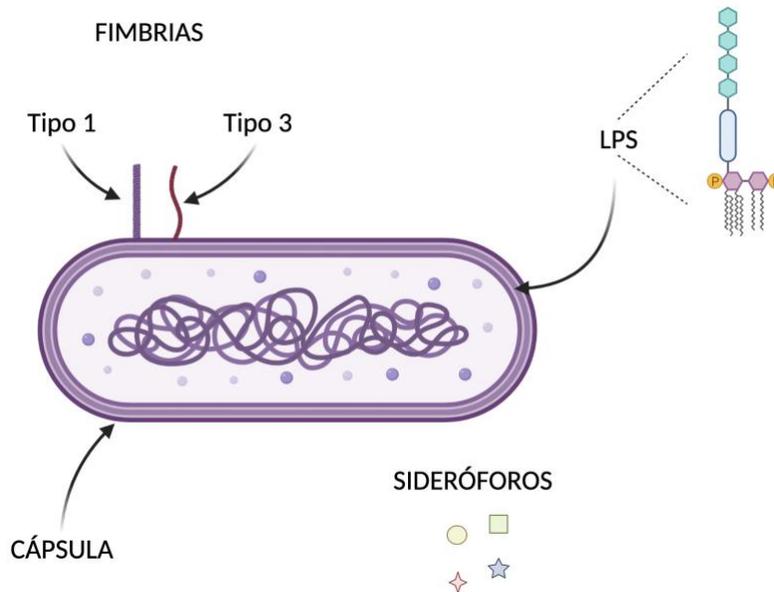


Dentro de los 10 principales se observa que están presentes aquellos del grupo ESKAPE, y K. pneumoniae se encuentra en el tercer lugar de esta lista. Tomado de Plataforma de la RHOVE/ con corte al 28 de febrero de 2023/SS/DGE/DIE.

1.1.2. Factores de virulencia

La patogenicidad de *K. pneumoniae* se encuentra asociada a varios factores de virulencia que le permiten evadir los mecanismos inmunitarios innatos del huésped. Estos factores incluyen a la cápsula, lipopolisacáridos (LPS), fimbrias y sideróforos. (Figura 2)

Figura 2. Representación de los factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae*.



Se representan los 4 factores de virulencia asociados a la patogenicidad de *K. pneumoniae*: cápsula, LPS, fimbrias y sideróforos. Adaptado de Paczosa y Mecsas, 2016.

1.1.2.1. Cápsula

La cápsula es una elaborada matriz de polisacáridos que recubre toda la superficie celular y brinda resistencia contra muchos mecanismos de defensa del huésped, ya que previene la fagocitosis al mismo tiempo que inhibe la lisis y la opsonización mediadas por el complemento (Riwu *et al.*, 2022). Se considera que la cápsula es la propiedad de virulencia dominante. En *K. pneumoniae*, se han informado al menos 77 polisacáridos distintos (designados como antígenos K) (Schembri *et al.*, 2005).

1.1.2.2. Lipopolisacárido (LPS)

El LPS, también conocido como endotoxina, es un componente importante y necesario de la capa externa de la membrana celular de todas las bacterias gram negativas. El polisacárido capsular (antígeno K) y el lipopolisacárido (antígeno O) de *Klebsiella pneumoniae* son importantes factores de virulencia que pueden activar

el sistema inmunitario innato. Además, estos dos antígenos se utilizan para diferenciar cepas de *K. pneumoniae* (Choi *et al.*, 2020).

1.1.2.3. Fimbrias

En *K. pneumoniae*, las fimbrias tipo 1 y 3 son las principales estructuras adhesivas que se han caracterizado como factores de patogenicidad. Ayudan con la adhesión a las superficies bióticas y abióticas, así como la irrupción de células epiteliales y la conformación de biopelículas.

La fimbria tipo 1 son proteínas fibrilares delgadas en forma de hilo en la superficie de la célula bacteriana y se expresan en el 90 % de los aislamientos clínicos y ambientales de *K. pneumoniae* (Klemm y Schembri, 2000), así como en casi todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Reconoce receptores de las superficies celulares que contienen manosa y está involucrado en la adherencia a las células del epitelio renal, considerándose indispensable para producir infección de vías urinarias.

Las fimbrias tipo 3 son filamentos en forma de hélice, que juegan un papel importante en su patogenicidad, confiriendo adherencia a células eucariotas y durante la formación de biopelículas. A diferencia de las fimbrias tipo 1, las fimbrias tipo 3 son "insensibles a la manosa" y, por lo tanto, no se unen a este monosacárido. Si bien aún no se ha identificado un receptor de superficie celular específico para las fimbrias tipo 3, se ha demostrado que se unen a las proteínas de la matriz extracelular, como los colágenos tipo IV y V (Paczosa y Mecsas, 2016).

1.1.2.4. Sideróforos

El mecanismo predominante de *K. pneumoniae* para adquirir hierro es a través de la secreción de sideróforos, que son moléculas que poseen una mayor afinidad por el hierro que las proteínas de transporte del huésped (Paczosa y Mecsas, 2016). Los sideróforos pueden robar hierro de las proteínas quelantes del hierro del huésped o eliminarlo del medio ambiente, ya que este mineral es un recurso limitado y *K. pneumoniae*, así como prácticamente todas las bacterias, lo necesitan para su crecimiento.

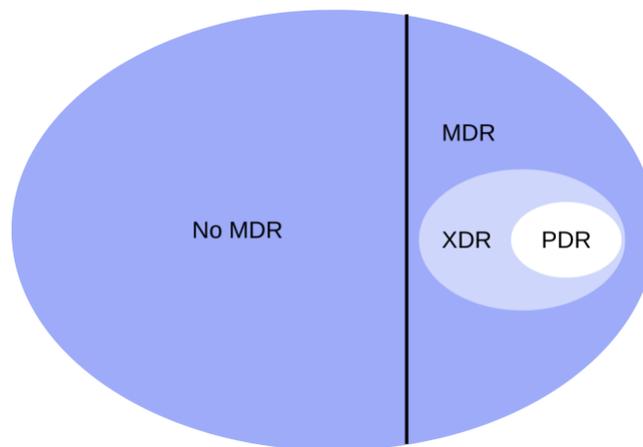
1.2. Resistencia a los antimicrobianos (RAM)

En la actualidad la resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa uno de los problemas más importantes de salud pública debido al uso incorrecto e indiscriminado de éstos. Por lo tanto, este problema se ha convertido en un motivo de preocupación a nivel mundial, pues la aparición y propagación de patógenos farmacorresistentes compromete la capacidad para tratar infecciones comunes (OMS, 2021).

Magiorakos *et al.* (2012) propusieron una clasificación para los microorganismos resistentes: multidrogo-resistente (MDR, “*multidrug-resistance*”), extensamente-resistente (XDR, “*extensively drug-resistance*”) y pandrogo-resistente (PDR, “*pandrug-resistance*”).

MDR se define como la resistencia de una bacteria a al menos un agente en tres o más categorías de antimicrobianos. XDR se define como la resistencia de una bacteria a al menos un agente en todas las categorías de antimicrobianos excepto dos o menos (es decir, la bacteria sigue siendo susceptible a solo una o dos categorías). PDR se define como la resistencia de una bacteria a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos (es decir, ningún agente probado como susceptible para ese organismo). Por lo tanto, la bacteria que se caracterice como XDR también se caracterizará como MDR; del mismo modo, una bacteria tendría que ser XDR para que se defina como PDR (Figura 3) (Magiorakos *et al.*, 2012).

Figura 3. Diagrama que muestra la relación de MDR, XDR y PDR entre sí.



XDR es un subconjunto de MDR y, PDR es un subconjunto de XDR. Tomado de Magiorakos et al., 2012.

1.2.1. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.

Existen dos tipos de resistencia bacteriana: la *intrínseca* y la *adquirida*. La *resistencia intrínseca* (o llamada también *natural*) es aquella que presentan los microorganismos desde su origen, por lo que el antibiótico nunca poseyó actividad contra el patógeno (Reygaert, 2018). Por su parte, la *resistencia adquirida* es el resultado de un proceso evolutivo por el cual los microorganismos se adaptan a los antibióticos a través de varios mecanismos que incluyen la alteración del sitio blanco

de éste por mutaciones y/o la transferencia horizontal de genes (por sus siglas en inglés, HGT) denominados *genes de resistencia* (Cloeckaert *et al.*, 2017).

El material genético se puede transferir entre células de dos maneras: *horizontal* o *vertical*. Los términos *horizontal* y *vertical* se refieren a la generación de las células involucradas, es decir, cuando un gen se transfiere entre individuos de esta o diferente especie, se dice que es una *transferencia horizontal*; y cuando el gen se transmite del organismo parental a su propia progenie, se dice que es *vertical* (Lorenzo-Diaz *et al.*, 2017).

Por su parte, la HGT puede tener lugar a través de uno de los siguientes mecanismos (Murray *et al.*, 2021).

- *Conjugación*, en la cual una secuencia completa de ADN, se transmite entre células bacterianas a través de una conexión directa de célula a célula (Lang *et al.*, 2012).
- *Transformación*, que es la captación activa de ADN libre en el medio por parte de las células bacterianas y la incorporación hereditaria de su información genética (Lorenz y Wackernagel, 1994) y
- *Transducción*, la cual se caracteriza por la transferencia de información genética por medio de los bacteriófagos (Emamalipour *et al.*, 2020).

Se han descrito 4 principales mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos (Pastor *et al.*, 2023), que son:

- Alteración de los sitios blanco
- Modificación de la permeabilidad de la membrana externa
- Expresión de bombas de expulsión
- Inhibición enzimática

El papel de las enzimas bacterianas en el desarrollo de resistencia es bastante versátil e involucra varios mecanismos clave. Estas moléculas juegan papeles vitales en muchos procesos. Por ejemplo, uno de los grupos de enzimas de resistencia a los antibióticos más relevantes y prevalentes desde el punto de vista clínico son las hidrolasas que inactivan los antibióticos β -lactámicos.

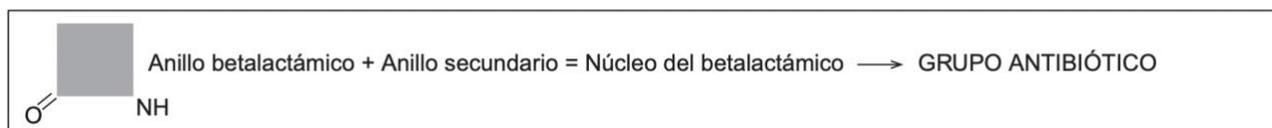
1.2.2. Antibióticos β -lactámicos

Una característica muy importante de *K. pneumoniae* es su alta resistencia a los antibióticos β -lactámicos, principalmente por la producción de β -lactamasas que son enzimas que hidrolizan dichos medicamentos. Entre éstas, las de mayor interés son las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y las carbapenemasas; lo importante de esta resistencia radica en que los β -lactámicos, potentes bactericidas,

son los antibióticos que se prescriben con mayor frecuencia en el mundo (Echeverri y Cataño, 2010).

Los antibióticos β -lactámicos son una de las clases de fármacos más recetados con numerosas indicaciones clínicas. Desde el punto de vista bioquímico, este grupo comparte un anillo betalactámico, es decir, un anillo de carbonos y un nitrógeno que además es altamente reactivo (Figura 4). Esta clase de antibióticos se divide en 5 principales grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de las β -lactamasas (Noel *et al.*, 2010).

Figura 4. Estructura química de los β -lactámicos.



Se presenta de forma esquemática la estructura básica de los diferentes grupos betalactámicos. Tomado de Suárez y Gudíol, 2009.

Son antibióticos de actividad lenta que interrumpen la formación de la pared celular bacteriana, como resultado de la unión covalente a las proteínas esenciales de unión a penicilina (PBP). Éstas enzimas están involucradas en los pasos terminales del entrecruzamiento de peptidoglucano tanto en bacterias gram negativas, así como bacterias gram positivas.

Son bactericidas parciales ya que sólo actúan en fase de crecimiento celular, y su eficacia es tiempo dependiente. Su efecto bactericida máximo ocurre a concentraciones del antibiótico por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI), por lo que es muy importante respetar o acortar los intervalos entre las dosis (Gómez *et al.*, 2015). Su efecto se explica principalmente a través de 2 mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana.

1.2.2.1. Carbapenémicos

El aumento del uso de antibióticos en entornos clínicos y no clínicos se asocia con un mayor número de cepas resistentes a los medicamentos, incluida *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos (CRKP).

Los carbapenémicos poseen el espectro de actividad más amplio y la mayor potencia contra bacterias gram positivas y gram negativas, y se han utilizado durante mucho tiempo como primera opción para tratar infecciones causadas por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) y betalactamasas de tipo AmpC.

Han sido reconocidos como fármacos de último recurso, además de ser a menudo la opción de tratamiento para las infecciones causadas por Enterobacterales multidrogosresistentes. Sin embargo, el aumento del consumo de carbapenémicos, a su vez, aumentó y facilitó la propagación mundial de Enterobacterales resistentes a carbapenémicos (Al-Bayati y Samarasinghe, 2022).

En general, los carbapenémicos con diferente actividad antibacteriana, como imipenem y panipenem, fueron más efectivos contra bacterias gram positivas. Mientras que meropenem, biapenem, ertapenem y doripenem, fueron más efectivos contra organismos gram negativos (El-Gamal *et al.*, 2017).

Se ha sugerido un esquema de clasificación para los carbapenémicos: Grupo 1: carbapenémicos de amplio espectro, con actividad limitada frente a bacilos gram negativos no fermentadores que son especialmente adecuados para infecciones adquiridas en la comunidad (por ejemplo, *ertapenem*); Grupo 2: carbapenémicos de amplio espectro, con actividad frente a bacilos gram negativos no fermentadores, tienen menor sensibilidad a la hidrólisis de bases en solución, como *imipenem*, *meropenem* y *doripenem*; y Grupo 3: carbapenémicos con actividad frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) como el *tomopenem* y *razupenem* (Papp-Wallace *et al.*, 2011). En la práctica clínica actual, estos últimos no están en uso.

Al ser parte de los β -lactámicos, los carbapenémicos no se difunden fácilmente a través de la pared celular bacteriana (Martínez-Martínez, 2008). En términos generales, los carbapenémicos ingresan a las bacterias gram negativas a través de las proteínas de la membrana externa (OMP), también conocidas como porinas. Después de atravesar el espacio periplásmico, los carbapenémicos agregan un grupo acilo “permanentemente” a las PBP. Se conoce que en bacterias gram negativas los carbapenémicos muestran una elevada afinidad por PBP de alto peso molecular y la diferencia de esta afinidad es lo que determina la capacidad antimicrobiana de cada carbapenémico.

Las PBP son enzimas que catalizan la formación de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias. Los conocimientos actuales sobre este proceso sugieren que la columna vertebral de glicanos forma una hélice dextrógira con una periodicidad de tres por vuelta de la hélice (Meroueh *et al.*, 2006). Los

carbapenémicos actúan como inhibidores basados en mecanismos del dominio de peptidasa de las PBP y pueden inhibir el entrecruzamiento de péptidos, así como otras reacciones de peptidasa. Un factor clave de la eficacia de los carbapenémicos es su capacidad para unirse a múltiples PBP diferentes (Hashizume *et al.*, 1984). Dado que la formación de la pared celular es un “*proceso tridimensional*” dinámico en el que la formación y la autólisis ocurren al mismo tiempo, cuando se inhiben las PBP, la autólisis continúa (van Dam *et al.*, 2009). Finalmente, el peptidoglicano se debilita y la célula estalla debido a la presión osmótica.

Los mecanismos de resistencia contra los carbapenémicos incluyen la producción de β -lactamasas, bombas de expulsión y mutaciones que alteran la expresión y/o función de porinas y PBP (Papp-Wallace *et al.*, 2011).

La producción de carbapenemasas, que normalmente se adquieren por transferencia horizontal de genes, es el mecanismo predominante responsable de la resistencia a los carbapenémicos en *K. pneumoniae* (Galani *et al.*, 2018).

En 2001, en Carolina del Norte, se reportó por primera vez la presencia de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC). En la última década se ha diseminado a nivel mundial debido a la propagación clonal de KPC y, en algunos países, su diseminación nosocomial ha causado brotes (Martin *et al.*, 2017).

El primer reporte en nuestro país de un brote de Enterobacterales productoras de carbapenemasas por Rodríguez-Zulueta *et al.* (2013), en el cual describieron a 22 pacientes adultos con edad de 21 a 83 años, que cursaron con una infección asociada a los cuidados de la salud (11 de tracto respiratorio) por *K. pneumoniae* resistente a imipenem con expresión del gen KPC-3.

1.2.3. β -lactamasas

Las betalactamasas son un importante mecanismo de resistencia en bacterias gram negativas. Estas enzimas hidrolizan el anillo betalactámico de los antibióticos betalactámicos, haciéndolos ineficaces (Morrison y Zembower, 2020).

Las BLEEs son un grupo de β -lactamasas de rápida evolución que comparten la capacidad de hidrolizar las cefalosporinas desde primera a cuarta generación y el aztreonam, pero que son inhibidas por el ácido clavulánico (Paterson y Bonomo, 2005).

Actualmente se utilizan dos esquemas de clasificación para las β -lactamasas. La clasificación se ha basado tradicionalmente en las características funcionales de las enzimas o en su estructura primaria.

1.2.3.1. Clasificación de las β -lactamasas

Existen dos sistemas de clasificación para las β -lactamasas: la clasificación molecular de Ambler (1980) y la funcional de Bush *et al.* (2005). (*Tabla 2.*)

La clasificación de Ambler (1980) comprende cuatro clases de β -lactamasas, que son A, B, C y D.

Bush *et al.* (1995) propusieron un esquema de clasificación, el cual incluye cefalosporinasas del grupo 1 (clase C); grupo 2 (clases A y D) β -lactamasas y serina carbapenemasas de amplio espectro, resistentes a los inhibidores y de espectro extendido; y metalo- β -lactamasas del grupo 3.

Tabla 2. Sistemas de clasificación de las β -lactamasas.

Clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros	Clasificación de Ambler	Sustrato característico	Inhibido por		Enzimas representativas
			CA o TZB	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	No	No	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefalosporinas	No	No	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	Sí	No	PC1
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas de primera generación	Sí	No	TEM-1, TEM-1, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactámicos	Sí	No	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	No	No	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactámicos	No	No	TEM-50
2c	A	Carbencilinas	Sí	No	PSE-1, PSE-3, PSE-4, CARB-3, CARB-4
2ce	A	Carbencilinas, cefepime	Sí	No	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variable	No	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de amplio espectro	Variable	No	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenémicos	Variable	No	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de amplio espectro	Sí	No	CepA, FPM-1
2f	A	Carbapenémicos	Variable	No	KPC-2, IMI-1, SME-1
3 ^a	B (B1)	Carbapenémicos	No	Sí	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, NDM-1
	B (B3)				L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Carbapenémicos	No	Sí	CphA, Sfh-1
4	No clasificado				Chr

CA, ácido clavulánico; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; TZB, tazobactam. *Adaptado de Bush y Jacoby, 2010; Sawa et al., 2020*

El grupo más importante de carbapenemasas lo constituyen las metalo-beta-lactamasas pertenecientes a la clase B o grupo 3 de Bush-Jacoby-Medeiros (Walsh, 2010).

Estas clases incluyen enzimas hidrolizantes de carbapenémicos, que se clasifican como la clase principal de β -lactamasas pero su acción es inhibida por EDTA, un agente quelante de iones Zn^{2+} y cationes divalentes adicionales. La interacción de los fármacos β -lactámicos con los iones de Zinc se relaciona con el mecanismo de hidrólisis en el sitio activo de la β -lactamasa.

Actualmente, la emergencia de Enterobacterales productoras de carbapenemasas (CPE) en el ámbito hospitalario, representa un verdadero problema de salud pública mundial, especialmente cuando se hace referencia a la Nueva Delhi metalo-beta-lactamasa (NDM). El subtipo más frecuente de esta enzima es la NDM-1, codificada por el gen de origen plasmídico *bla*NDM-1 (García-Betancur *et al.*, 2021).

1.2.4. *Klebsiella pneumoniae* y la RAM en México.

La tasa global de resistencia a los antimicrobianos de *K. pneumoniae* ha llegado al 70%, y la tasa de mortalidad relacionada con la infección también ha alcanzado el 40%~70% (Iredell *et al.*, 2016). Además, en los últimos años, *K. pneumoniae* MDR y *K. pneumoniae* CRKP se han convertido en un importante problema de salud pública mundial (Li *et al.*, 2022).

A nivel nacional, la Red del Programa Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) opera desde el año 2017 una red de hospitales y laboratorios clínicos que proporcionan información sobre la resistencia antimicrobiana. Adicionalmente, los colaboradores reportan el consumo de antimicrobianos en sus instituciones y envían cepas para investigación al Laboratorio de esta red.

De acuerdo con el último reporte de los hospitales de la Red PUCRA: Resistencia Antimicrobiana y consumo de antibióticos, los carbapenémicos y la amikacina (que es un antibiótico de la familia los aminoglucósidos) serían las únicas opciones de tratamiento para las infecciones causadas por *K. pneumoniae* productoras de BLEEs en aislamientos de hemocultivo (PUCRA, 2022).

La Red Temática de Investigación y Vigilancia de la Farmacorresistencia (INVIFAR) fue creada como iniciativa en el 2018, y tiene como objetivo contribuir al mejoramiento en la vigilancia y control de la farmacorresistencia en México y el desempeño de los laboratorios de la Red (INVIFAR, s.f.). Según los resultados obtenidos de un estudio realizado por la Red INVIFAR, que tuvo como objetivo

evaluar los cambios en la resistencia a los antimicrobianos entre algunos microorganismos críticos y de alta prioridad recolectados previamente y durante la pandemia de COVID-19 en México (2019-2020), para *K. pneumoniae* se detectó una resistencia creciente en todas las muestras para los betalactámicos imipenem, y meropenem (López-Jacome *et al.*, 2022).

Desafortunadamente, *K. pneumoniae* CRKP y otras Enterobacterales multirresistentes, implican una gran limitación terapéutica para los profesionales de la salud al tratar las graves infecciones causadas por éstos patógenos, lo que causa una gran mortalidad en pacientes inmunocomprometidos.

1.3. Tipificación multilocus de secuencias (MLST)

La biología molecular proporciona técnicas para discriminar entre distintas cepas de una misma especie. Entre las técnicas moleculares disponibles destaca la técnica de tipificación multilocus de secuencias (por sus siglas en inglés, MLST) (de las Rivas *et al.*, 2007). Esta técnica de epidemiología molecular permite la tipificación bacteriana mediante la identificación de polimorfismos tras la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés, PCR) y secuenciación de fragmentos entre 450 y 500 pb de 7 genes conservados, diferentes para cada especie bacteriana; con lo que se puede identificar asociaciones clonales y establecer relaciones evolutivas (Enright y Spratt, 1999).

Se propuso por primera vez en 1998 como un método de tipificación que permite la caracterización inequívoca de bacterias de manera estandarizada, reproducible y portátil, utilizando el patógeno humano *Neisseria meningitidis* como organismo ejemplar (Maiden, 2006).

Entre las ventajas que distinguen esta técnica de otros métodos de tipificación con enfoques similares (electroforesis de enzimas multilocus o MLEE, electroforesis en gel de campos pulsados o PFGE, ensayos inmunológicos, etc.), se encuentran la reproducibilidad de la técnica, así como la generación de datos portátiles que se pueden comparar fácilmente con los de una base de datos central a través de internet (Vázquez y Berrón, 2004). Por ello, tiene una gran aplicación en salud pública y el análisis genético de poblaciones y su evolución.

El primer paso consiste en la amplificación y posterior secuenciación de los fragmentos variables de siete genes previamente seleccionados. La secuencia de cada uno de los *loci* se alinea con las ya existentes en una base de datos centralizada. Si la secuencia coincide, el programa asigna un alelo ya identificado. Si no es así, se asigna un nuevo número a ese alelo.

Una vez asignado un número a cada alelo, se genera un *perfil alélico* o *secuencia tipo* (por sus siglas en inglés, ST) que será producto de los siete alelos ya asignados y con ello, como último paso, se hace una comparación entre cepas.

La Figura 5 muestra el procedimiento resumido de esta técnica de análisis.

Figura 5. Procedimiento resumido del análisis por MLST.

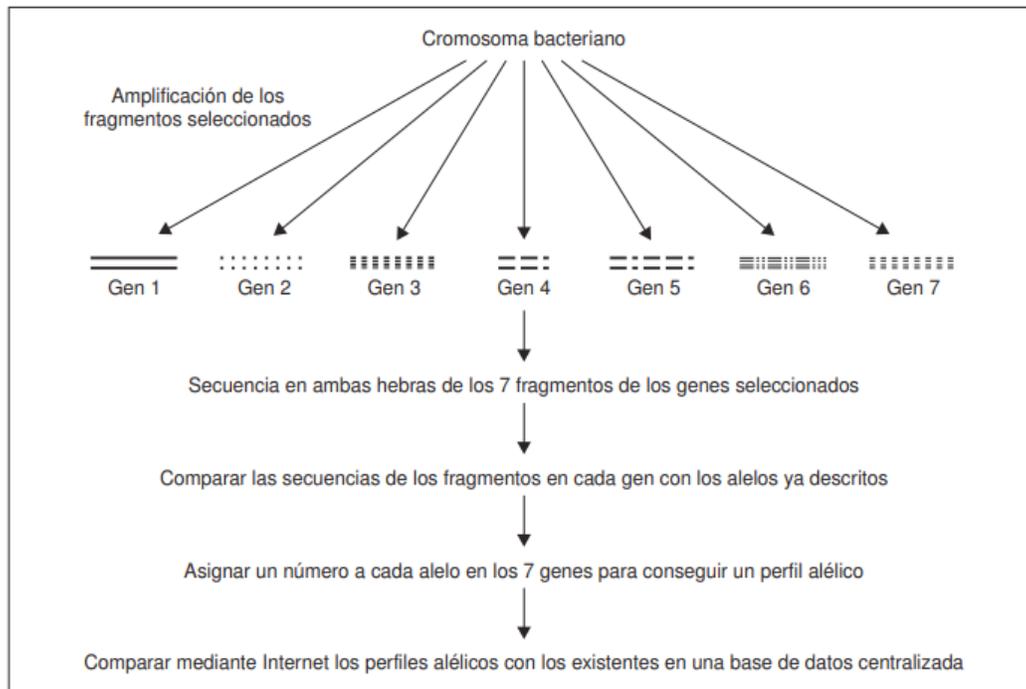


Diagrama general del procedimiento del análisis por MLST. Tomado de Vázquez y Berrón, 2004.

Las secuencias de alelos de MLST y las tablas de perfiles de ST se almacenan en bases de datos en línea alojadas en cinco sitios diferentes en todo el mundo. La Universidad de Oxford recopila datos de todas las bases de datos y los hace fácilmente accesibles en el sitio con dirección: <http://pubmlst.org> .

Combinado con información epidemiológica precisa y la caracterización de los mecanismos de resistencia a los antibióticos, el análisis MLST de conjuntos de muestras más grandes debería proporcionar una comprensión mucho mejor del origen evolutivo y la diseminación de las cepas multirresistentes de *K. pneumoniae*.

En un estudio reciente, se aplicó la secuenciación del genoma completo (por sus siglas en inglés, WGS) para investigar la filogenia y la relación genética e identificar

cepas de *K. pneumoniae*. Sin embargo, el uso de WGS o metagenómica para rastrear cualquier brote local es limitado debido al alto costo para realizar las pruebas y la falta de experiencia y/o recursos (Snitkin *et al.*, 2012; Founou *et al.*, 2019).

En consecuencia, los métodos convencionales como MLST, PFGE, junto con otros métodos de tipificación rentables, todavía se usan de forma más generalizada. Sin embargo, el esquema MLST es el principal método para estudiar las relaciones evolutivas y caracterizar los aislamientos nosocomiales de *K. pneumoniae*.

Diancourt *et al.* (2005) reportaron el primer trabajo sobre esta técnica en 67 cepas de *K. pneumoniae*. La selección de genes se basó en tres criterios:

- 1) Su ubicación en el cromosoma (lejanos entre sí)
- 2) En función de la disponibilidad de oligos de PCR
- 3) Para el gen transductor de energía periplásmica *tonB*, se basaron en la variación conocida de nucleótidos

Otros genes candidatos fueron eliminados por razones técnicas o para evitar el riesgo de sesgo selectivo debido al uso de agentes antimicrobianos.

El presente trabajo de investigación tiene como base el protocolo descrito en dicho artículo.

1.3.1. Herramientas bioinformáticas para el análisis de datos obtenidos por MLST.

El proyecto del genoma humano y los proyectos de secuenciación en otros organismos han generado una riqueza de datos biológicos. La enorme demanda de análisis e interpretación de estos datos está siendo gestionada por la ciencia con la evolución de la bioinformática. La bioinformática se define como la aplicación de herramientas de computación y análisis a la captura e interpretación de datos biológicos (Bayat, 2002). Es un campo interdisciplinario que aprovecha la informática, las matemáticas, la física y la biología; y es esencial para la gestión de datos en la biología y la medicina modernas.

La creciente cantidad de datos de los proyectos del genoma ha requerido bases de datos informáticas que presenten una rápida asimilación, formatos utilizables y programas de software con algoritmos para una gestión eficiente de los datos biológicos (Benton, 1996).

El primer enfoque para el análisis de datos MLST para la ilustración de las relaciones entre aislamientos, fue la construcción de dendogramas por medio del *método de grupo de pares no ponderados con media aritmética* (por sus siglas en

inglés, UPGMA) a partir de matrices de distancia que contienen las diferencias por pares de perfiles alélicos.

Este tipo de análisis de conglomerados presenta varias ventajas, como la facilidad de interpretación y la creación de una agrupación jerárquica de los aislados. Esto puede proporcionar una visión global de la relación de los aislados en estudio y cómo los grupos definidos están conectados entre sí. Sin embargo, la topología de tales dendrogramas con frecuencia no refleja los patrones de descendencia (Feil *et al.*, 2004).

Para un análisis más completo de los datos obtenidos a partir de los aislamientos, se encuentran herramientas muy útiles como eBURST.

Based Upon Related Sequence Types o BURST es un algoritmo de agrupamiento diseñado para su uso en datos MLST microbianos. Es un algoritmo rápido y eficaz que se puede utilizar para asignar el genotipo central de los *complejos clonales* (CC), ya que evalúa la distancia genética entre cepas utilizando una matriz de distancia por pares basada en perfiles alélicos.

Feil *et al.* (2004) presentaron una nueva implementación del algoritmo BURST: eBURST. Este software además de identificar los CC, agrupa las ST's de acuerdo con los criterios definidos por el usuario de una cantidad de alelos en común con al menos otro miembro del grupo.

Estas relaciones se pueden visualizar gráficamente a través de diagramas radiales. La versión anterior del algoritmo (BURST) colocaba los *Variante en un locus*, (por sus siglas en inglés, SLV) y *Variante en dos locus* (por sus siglas en inglés, DLV) del fundador principal dentro de anillos concéntricos, mientras que eBURST muestra un enlace radial desde el fundador principal a cada uno de sus SLV mediante una línea sólida. El resultado es un conjunto inconexo gráficos acíclicos, donde cada uno de ellos corresponde a un complejo clonal. Por lo tanto, al considerar solo los enlaces SLV, eBURST no pretende vincular a toda la población.

Por ello, dado que el algoritmo eBURST no está optimizado globalmente y puede resultar en enlaces dentro de los complejos clonales que violen las reglas propuestas, en 2009 se propuso la implementación de un algoritmo globalmente optimizado: goeBURST. Éste algoritmo identifica patrones alternativos de descenso para varias especies bacterianas (Francisco *et al.*, 2009) por lo que no solo se identifican los complejos clonales, si no que tiene como objetivo relacionar la población entera.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Establecer la relación genética de 21 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos, codificada por el gen NDM-1, recibidos entre los años 2020 y 2021 a la Red PUCRA, de un hospital pediátrico de tercer nivel de la Ciudad de México, mediante la técnica MLST.

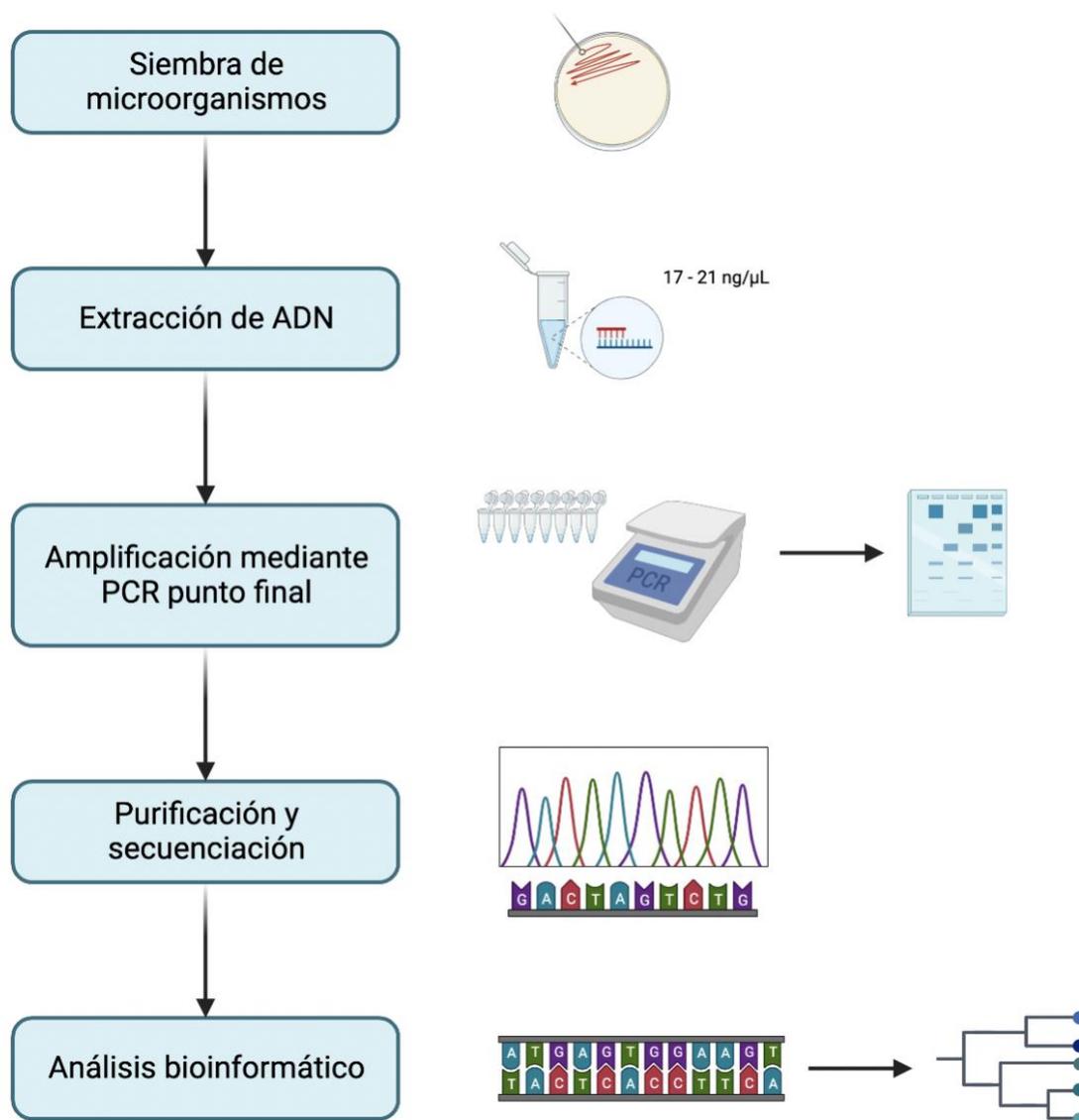
2.2. Objetivos particulares

- Estandarización de la amplificación de siete genes conservados (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* y *tonB*) de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos.
- Amplificación y secuenciación de siete genes conservados (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* y *tonB*) de aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos.
- Análisis de secuencias para su caracterización genotípica y establecimiento de asociaciones clonales.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La Figura 6 muestra un esquema general de la metodología empleada en el presente trabajo, con base en lo descrito por Diancourt *et al.* (2005).

Figura 6. Resumen del procedimiento experimental.



En la figura se muestra un diagrama, a manera de resumen, de las etapas del procedimiento experimental realizado con las cepas clínicas, posterior a la estandarización. La toma de muestras, almacenamiento, identificación por medio del equipo VITEK-2, identificación del mecanismo de resistencia y del gen que codifica para carbapenemasas; no se incluyen en la figura debido a que no fue realizado como parte del procedimiento experimental del presente trabajo. Adaptado de Diancourt *et al.* 2005.

3.1. Origen y obtención de las cepas bacterianas

Se utilizaron 21 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos proporcionadas a la Red PUCRA, las cuales proceden de un hospital pediátrico de tercer nivel de atención, de diferente origen clínico, recolectadas en el periodo 2020-2021. (ANEXO: *Tabla 6*)

Dichas muestras fueron aisladas e identificadas previamente por la Red PUCRA mediante métodos automatizados empleando el equipo VITEK-2. Además, se identificó el mecanismo de resistencia por producción de carbapenemasas y el gen que codificaba para dicha enzima, siendo para todas las cepas el gen NDM-1.

La cepa control utilizada en este estudio fue: *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-2146 (resistente a carbapenémicos, codificado por el gen NDM-1).

3.1.1. Conservación de cepas

Las cepas se sembraron en criotubos con medio Agar Trypticaseína (ATS) + 10% de glicerol y se conservaron a -80°C.

3.1.2. Siembra de microorganismos

A partir de sus respectivos respaldos en medio ATS, las cepas se sembraron en Agar Mueller Hinton y se incubaron a 35-37°C durante 24 h.

3.1.3. Extracción y cuantificación de ADN

En este paso se utilizó un Kit de extracción de ADN QIAamp de la marca QIAGEN®, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

Posteriormente, el ADN fue cuantificado por absorbancia en un espectrofotómetro Nanodrop® a 260 nm. Los valores obtenidos fueron utilizados para hacer diluciones del ADN genómico y se obtuvieron stocks de 100 µL de concentraciones de entre 17 y 21 ng/µl para todas las cepas.

3.2. Caracterización molecular mediante MLST

3.2.1. Estandarización de amplificación por PCR punto final

Los *oligos* o cebadores empleados, fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM y en Sigma Aldrich, conforme al protocolo descrito por Diancourt *et al.* (2005) (ANEXO: *Tabla 7*).

Los 7 genes descritos fueron:

- *gapA* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa)
- *infB*: (factor de iniciación de la traducción 2)
- *mdh* (malato deshidrogenasa)
- *pgi* (fosfoglucoasa isomerasa)
- *phoE* (fosforina E)
- *rpoB* (subunidad β de la ARN polimerasa), y
- *tonB* (transductor de energía periplásmica)

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L con las concentraciones finales mostradas en la Tabla 3.

Tabla 3. Componentes de la mezcla de reacción para la PCR punto final de *K. pneumoniae*.

Reactivo		Concentración	Volumen (μ L)
Amortiguador sin MgCl ₂ Sigma-Aldrich®		10x	2.5
MgCl ₂		50 mM	0.75
Cebadores	Directo	15 pmol/ μ L	0.5
	Reverso		
Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)		10 mM	0.5
ADN bacteriano		17 - 21 ng/ μ L	3.0
Taq polimerasa Accuris®		1U	0.2
Agua desionizada grado biología molecular		-	cbp 25 uL

MgCl₂: Cloruro de magnesio, cbp: cantidad bastante para

Las condiciones de amplificación para cada gen se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones para las reacciones de amplificación de los 7 genes conservados de *K. pneumoniae*.

Etapa / Gen		Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial		1	95	5
Desnaturalización		35	95	1
Alineamiento	<i>gapA</i>		60	1
	<i>infB</i>		50	
	<i>mdh</i>		50	
	<i>pgi</i>		50	
	<i>phoE</i>		50	
	<i>rpoB</i>		50	
	<i>tonB</i>		45	
Extensión			72	1
Extensión final		1	72	1
Conservación		NA	4	∞

NA: No aplica.

Después de la amplificación, los productos de la PCR se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) durante 1 hora a 100 Volts, empleando el marcador de peso molecular de 100 pb de la marca GoldBio®.

Posteriormente se tiñeron con Bromuro de etidio de concentración 0.5 µg/mL durante 15 minutos y se capturaron las imágenes con ayuda de un transiluminador y una cámara fotográfica.

3.2.2. Amplificación de 7 genes altamente conservados por PCR punto final
La amplificación de los 7 genes se realizó de manera individual para las 21 cepas.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25µL, con las concentraciones y condiciones descritas en las Tablas 3 y 4.

La electroforesis se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas en la estandarización.

3.2.3. Purificación y secuenciación

Los productos de PCR, previamente cuantificados con Nanodrop, y las alícuotas de oligos de secuenciación correspondientes fueron enviadas al Laboratorio Temático de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud del Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LaNaBio) del Instituto de Biología de la UNAM, en donde se realizó la purificación y secuenciación de tipo Sanger en ambos sentidos (Directo y Reverso).

3.3. Análisis bioinformático

3.3.1. Curado y alineamiento de secuencias

Para la visualización y curado de secuencias recibidas por el LaNaBio en formato ab1., se utilizó el programa 4peaks. Las bases nitrogenadas de las secuencias se corrigieron de acuerdo con la calidad del pico (A, C, T o G) que se mostraban en el electroferograma.

El alineamiento de ambas secuencias se llevó a cabo haciendo uso del programa Ugene de Unipro®.

3.3.2. Identificación de perfiles alélicos y Secuencias tipo (ST's)

El número de alelo para cada locus se obtuvo comparando la secuencia curada y alineada de cada gen con la base de datos para MLST de *K. pneumoniae* del Institut Pasteur, a (s.f.) : https://bigsdbs.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef .

En esta misma página, se obtuvieron las ST's identificadas hasta el momento en la Base de datos de secuencias del genoma de cepas bacterianas (por sus siglas en inglés, BIGSdb).

3.3.3. Identificación de Complejos Clonales (CC)

Para identificar los diferentes complejos clonales se empleó el análisis goeBURST mediante el software *PhyloViz 2.0*. El parámetro utilizado fue el de *Variante en un locus* (SLV).

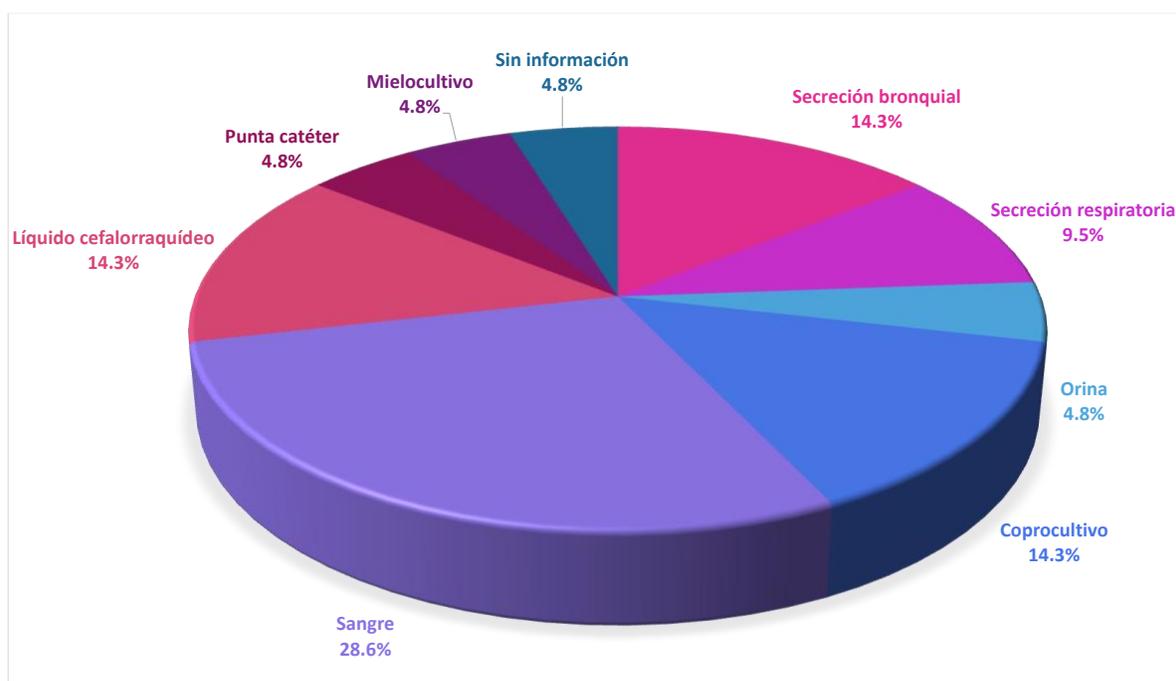
4. RESULTADOS

4.1. Análisis poblacional de las muestras recibidas

En este estudio se analizaron 21 muestras procedentes de un hospital de tercer nivel de atención de la Ciudad de México, recolectados en dos diferentes años. Sin embargo, solo 20 de ellas se identificaron como *K. pneumoniae* mientras que una se confirmó como *K. oxytoca*. Por ello, ésta última no se consideró puesto que no pertenece a la especie de estudio del presente trabajo.

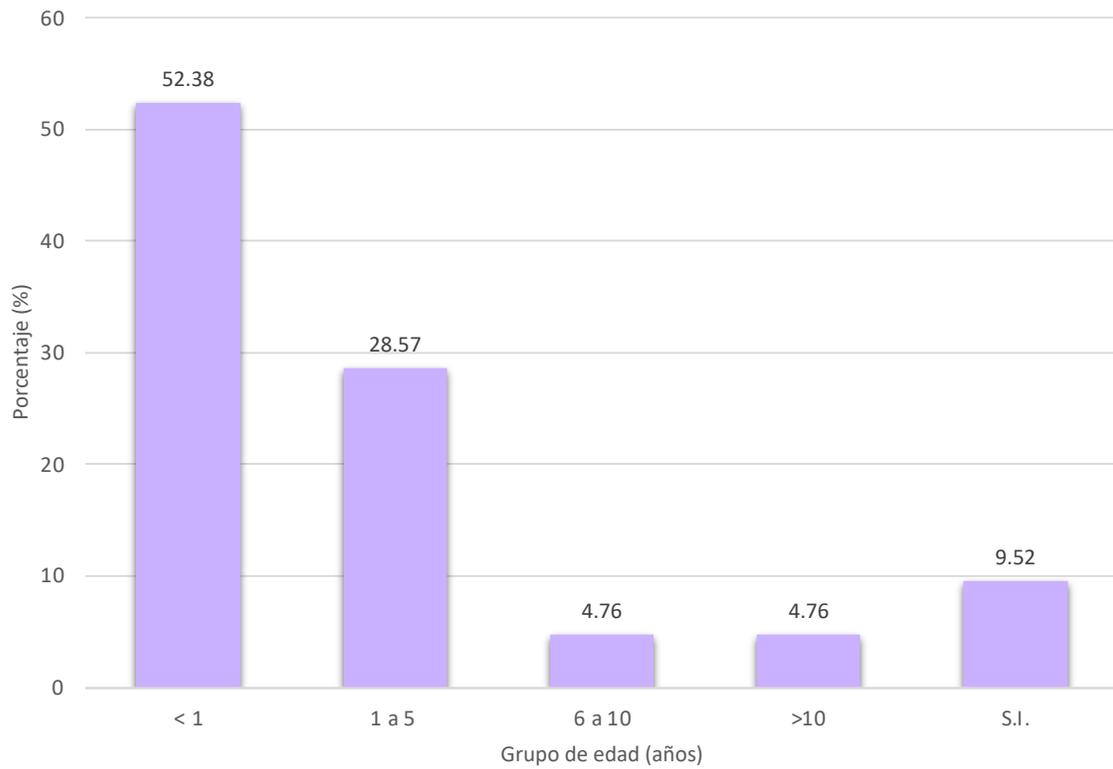
La mayor parte de los aislamientos recibidos proceden de sangre (28.6%), seguido de líquido cefalorraquídeo (14.3%), coprocultivo (14.3%) y secreción bronquial (14.3%), como se muestra en la Figura 7.

Figura 7. Distribución porcentual respecto al origen biológico de las muestras analizadas.



En cuanto a las edades de los pacientes, la mayoría de las muestras son de infantes menores a 1 año, con un 52.4% del total de la población del estudio (Figura 8).

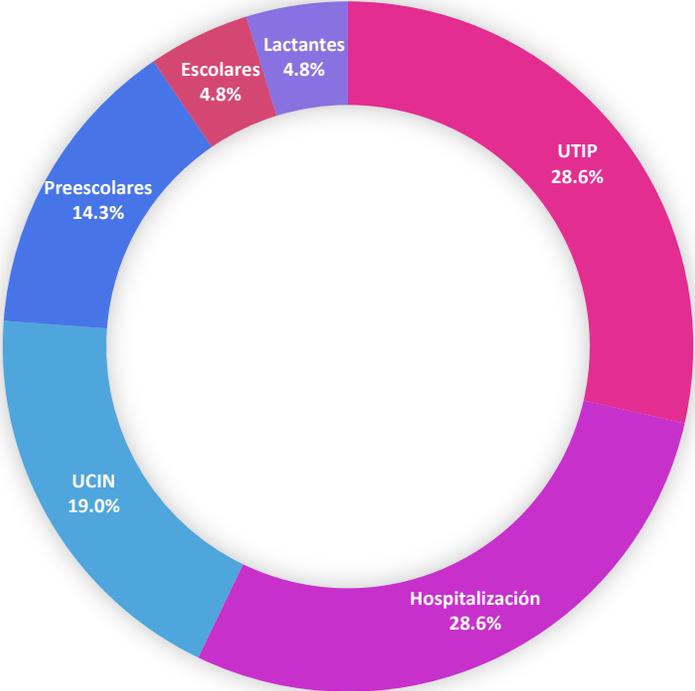
Figura 8. Distribución porcentual respecto a la edad de los pacientes con *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos.



S.I.: Sin información

Finalmente, como se puede ver en la Figura 9, las áreas del hospital con el mayor número de pacientes fueron la unidad de cuidados intensivos pediátricos (UTIP) y la hospitalización con el 28.6%.

Figura 9. Distribución porcentual respecto al área de hospitalización de los pacientes con *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos.



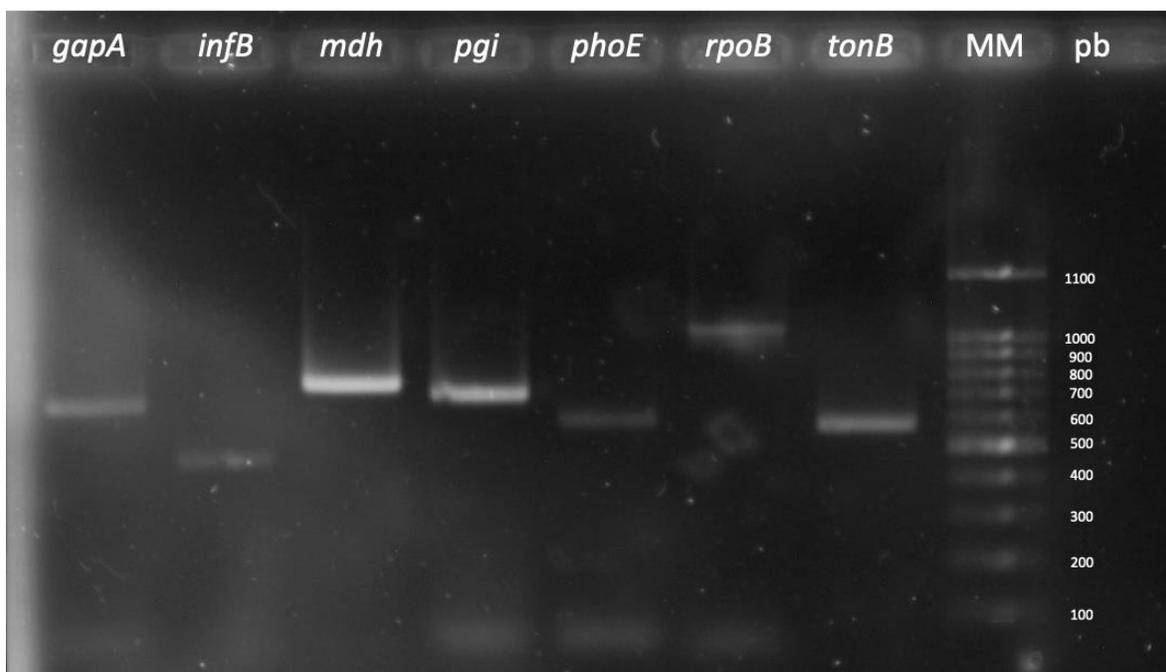
UCIN: Unidad de cuidados intensivos neonatales, UTIP: Unidad de terapia intensiva pediátrica.

4.2. Caracterización molecular mediante MLST

4.2.1. Estandarización de amplificación por PCR punto final

Los siete genes (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* y *tonB*) se amplificaron en la cepa control usando las concentraciones y condiciones de amplificación ya descritas en el procedimiento experimental.

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de la estandarización de 7 genes conservados de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146.



Fotografía tomada del gel de electroforesis, resultado de la estandarización de la amplificación de 7 genes conservados de *K. pneumoniae*. La cepa control utilizada fue CRKP, codificada por el gen NDM-1. MM: Marcador de peso molecular.

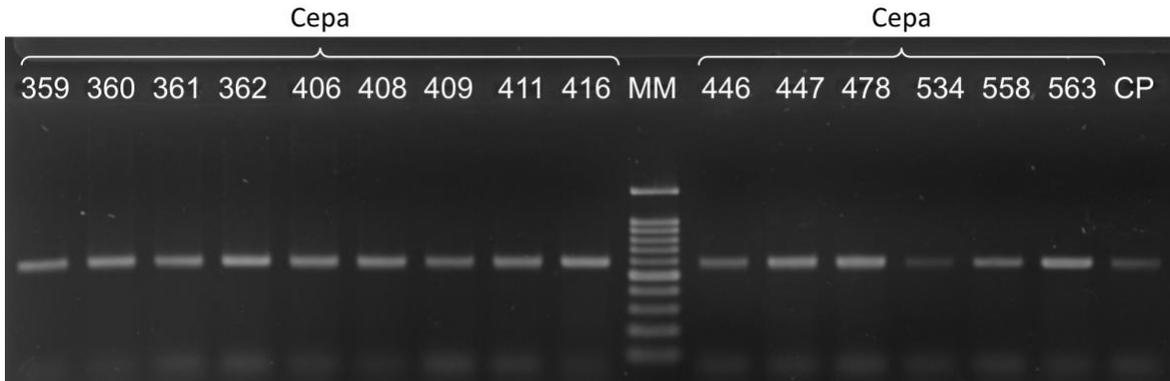
Los amplicones obtenidos por gen fueron de los siguientes pesos moleculares: *gapA*: 600-700 pb, *infB*: 400-500 pb, *mdh*: 700-800 pb, *pgi*: 700 pb, *phoE*: 500-600 pb, *rpoB*: 1000 pb y *tonB*: 500-600 pb (Figura 10).

4.2.2. Amplificación de 7 genes altamente conservados por PCR punto final

Los siete genes (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* y *tonB*) se amplificaron en las 21 cepas problema usando las concentraciones y condiciones de amplificación ya descritas en el procedimiento experimental.

Se presentan dos geles representativos: del gen *phoE* (Figura 11) y del gen *pgi* (Figura 12).

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones del gen *phoE* de cepas de *K. pneumoniae* de origen clínico.



Fotografía tomada del gel de electroforesis con 15 de las 21 cepas, donde MM: Marcador de peso molecular y CP: Control positivo. Los amplicones obtenidos son de un peso molecular:de 600 pb.

Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones del gen *pgi* de cepas de *K. pneumoniae* de origen clínico.



Fotografía tomada del gel de electroforesis con 14 de las 21 cepas, donde MM: Marcador de peso molecular y CP: Control positivo. Los amplicones obtenidos son de un peso molecular de 500-600 pb.

4.3. Análisis bioinformático

4.3.1. Identificación de perfiles alélicos y Secuencias Tipo (ST's)

En la Tabla 5 se puede observar el registro de los resultados obtenidos: el alelo asignado para cada gen, el perfil alélico de cada cepa, así como su *secuencia tipo* (ST).

Se identificaron 9 ST's de las 20 cepas clínicas utilizadas en este estudio. En la Tabla 5 se muestran los resultados de los alelos obtenidos para cada gen, así como las ST's para cada cepa.

Tabla 5. Asignación de la secuencia tipo a partir de los perfiles alélicos.

Año	Cepa	Perfil alélico							ST
		<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>	
2020	359	2	1	1	1	10	4	13	25
	360	2	1	1	1	10	4	13	25
	361	2	1	1	1	10	4	13	25
	362	2	6	1	1	147	1	31	870
	406	2	1	1	1	10	4	13	25
	408	3	3	1	1	1	1	4	11
	409	3	3	1	1	1	1	4	11
	411	2	1	1	1	10	4	13	25
	416	1	1	1	1	147	1	31	SR
	446	2	1	1	1	10	4	13	25
	447	2	1	1	1	10	4	13	25
	476	2	1	2	1	7	1	81	268
	480	2	1	2	1	7	1	81	268
	481	2	1	2	1	7	1	81	268
	486	2	60	11	1	4	8	24	628
487	2	60	11	1	4	8	24	628	
2021	534	2	1	1	6	7	1	12	45
	541	2	1	1	1	9	1	12	163
	558	2	1	1	1	9	1	93	323
	563	2	1	1	1	7	1	12	485

ST's obtenidas con ayuda de la base de datos de Institut Pasteur, a (s.f.)

**SR: Sin reportar.*

Debido a que el perfil alélico de la cepa 416 no había sido reportado anteriormente, no cuenta con una ST asignada. Por lo tanto, ésta no se consideró para los siguientes pasos del análisis bioinformático.

En la Figura 13 se muestra una gráfica circular del porcentaje de las 9 ST's identificadas en las 19 cepas que sí tuvieron una ST asignada, siendo la ST25 la que predomina.

Figura 13. Distribución porcentual respecto a las ST's identificadas de *K. pneumoniae*.

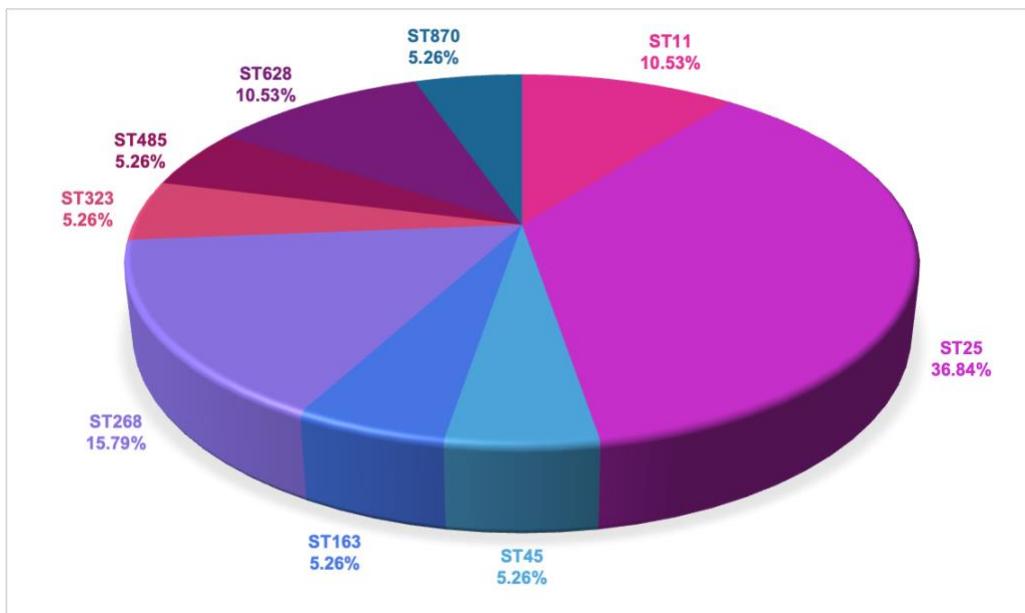


Gráfico circular que muestra el porcentaje correspondiente de las ST's identificadas en las 19 cepas clínicas de *K. pneumoniae*.

4.3.2. Identificación de Complejos Clonales (CC)

La Figura 14 muestra el árbol de expansión mínima (MST) completo de todos los perfiles alélicos de *K. pneumoniae* presentes en la base de datos *Klebsiella* PasteurMLST, superpuestos por los datos de las 19 cepas, el cual se generó utilizando el método goeBURST Full MST y se visualizó con PHYLOViZ 2.0.

Para identificar los CC, se consideró a dos o más ST's independientes que comparten alelos idénticos. Por ello, se utilizó como parámetro que las ST's en el mismo grupo compartan al menos 6 de los 7 genes con al menos otro miembro de ese grupo.

Como resultado solo se generó un complejo clonal, mientras que las ST's individuales o *singletons* fueron aquellas que no se agruparon, por lo tanto no corresponden a un CC.

El complejo clonal identificado fue el CC485 conformado por 4 ST's: 485, 45, 163 y 323 (*Figura 14*). Las 5 ST's restantes sin agruparse (*singleton*) fueron: 628, 268, 870, 25, 11.

Figura 14. Representación gráfica del complejo clonal CC485 de *K. pneumoniae*.

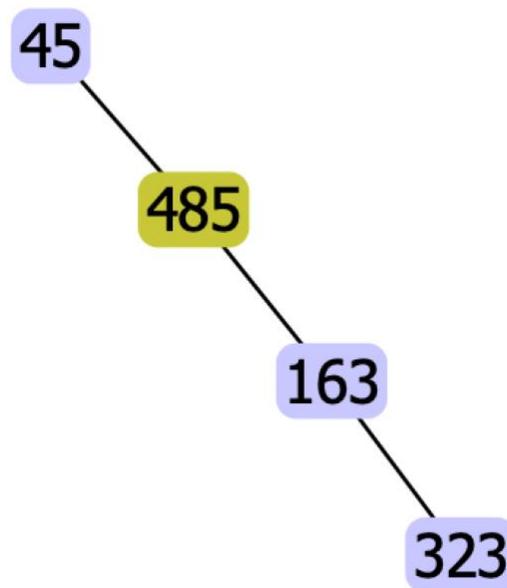


Diagrama generado con PHYLOViZ del CC485 mediante el algoritmo goeBURST con el parámetro SLV.

Se denominó CC485 debido a que la ST485 resaltada en color verde representa el genotipo ancestral hipotético del complejo clonal.

5. DISCUSIÓN

Klebsiella pneumoniae es un patógeno de importancia nosocomial relacionado con IAAS, que en los últimos años han constituido un problema de salud importante en nuestro país. Además, está incluida en la lista de prioridad mundial de bacterias resistentes a los antibióticos, y es necesario mejorar su vigilancia para identificar y monitorear rápidamente las cepas o plásmidos convergentes.

Las IAAS se encuentran entre las complicaciones prevenibles más graves en las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN) (Kumar *et al.*, 2018). Estas infecciones son complicaciones frecuentes que ocurren durante la hospitalización de los recién nacidos en las UCIN y están asociadas a condiciones de susceptibilidad de los pacientes como: prematuridad y estado inmunitario, uso de dispositivos invasivos como cateterismo vascular central y/o umbilical y ventilación mecánica, nutrición parenteral, uso de antimicrobianos y otras variables terapéuticas de fármacos relacionados (Polin *et al.*, 2012).

El periodo neonatal, definido como los primeros 28 días desde el nacimiento, es el período más vulnerable en la vida de un niño, dándose en éste el 47% de las muertes en niños menores de 5 años (Perin *et al.*, 2022). Aproximadamente, un tercio de las muertes neonatales anuales son causadas por infecciones (Seale *et al.*, 2014), en particular infecciones bacterianas graves como septicemias, neumonía y meningitis (Zaidi *et al.*, 2005).

Desde hace más de dos décadas, el aumento de septicemias y meningitis en recién nacidos provocadas por *Klebsiella* ha sido motivo de preocupación (Podschun y Ullmann, 1998).

Lo anterior posiblemente esté relacionado con una higiene deficiente de las manos del personal médico, contacto directo con fluidos corporales y contaminación en el ambiente intrahospitalario (Rosa-Mangeret *et al.*, 2022).

Aunado a esto, se ha informado el uso sin restricciones de antibióticos de amplio espectro en el tratamiento de casos graves de COVID-19, con un aumento en el uso de carbapenémicos durante la primera ola de la pandemia de COVID-19 (Grau *et al.*, 2021), periodo que coincide con el de toma de muestras para este estudio.

En este estudio, además de la producción de carbapenemasas, la característica que comparten todas las cepas evaluadas es el gen codificante para la carbapenemasa NDM-1.

La NDM-1 es una carbapenemasa perteneciente a la clase molecular B1 de la clasificación de Ambler (Wang *et al.*, 2021). Las NDM se describieron por primera vez en el 2008 en un paciente sueco, el cual, al retornar de la Nueva Delhi, India, presentó infección del tracto urinario por *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos (Yong *et al.*, 2009). En 2011 se reportaron por primera vez dos cepas identificadas en Guatemala, siendo estos los primeros casos de *K. pneumoniae* en Latinoamérica (Pasteran *et al.*, 2012).

La prevalencia de carbapenemasas en *K. pneumoniae* ha sido poco estudiada en México, sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que la carbapenemasa NDM-1 es más frecuente que la de KPC (Aquino-Andrade *et al.*, 2018). La NDM-1 ha sido reportada como endémica en Estados Unidos, Brasil, Argentina, Colombia, México y esporádicamente en Canadá (Lee *et al.*, 2016; Halat y Moubareck, 2020).

Para este estudio se utilizó la técnica MLST para el análisis de 20 aislamientos. Como se indicó en el procedimiento experimental, la cepa 478, identificada como *K. oxytoca*, se descartó para el análisis ya que pertenece a otra especie. Adicionalmente, para ésta, durante el procedimiento experimental no se obtuvieron amplicones para algunos genes, mientras que para aquellos que sí amplificaron no se obtuvieron alelos al introducir las secuencias en el software.

La estandarización y amplificación de los genes *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, y *rpoB* se realizó de manera satisfactoria con los oligos descritos por Diancourt *et al.* (2005), y se obtuvieron los pesos moleculares esperados conforme a lo reportado por Institut Pasteur, b (s.f). Sin embargo, en un inicio posterior a la estandarización, para el gen *tonB* se utilizaron los oligos descritos por Diancourt *et al.* (2005); a lo largo del estudio no se obtuvieron amplicones de la mayoría de las muestras. Para aquellas que sí amplificaron, se enviaron las muestras para su secuenciación. No obstante, cabe destacar que el número de bases no coincidía, además de que al hacer el curado de las secuencias éstas mostraban “ruido” asociado a los oligos. Por ello, se solicitaron los oligos con la secuencia universal para ambos sentidos con base en el protocolo sugerido por Institut Pasteur, b (s.f.) (ANEXO: Tabla 7).

Una vez que se obtuvieron los amplicones del peso molecular esperado y se enviaron a secuenciación, se hizo el análisis de cada una de las 20 muestras identificadas como *K. pneumoniae* para obtener los alelos de cada gen y las ST's.

Con ayuda de los perfiles alélicos, se obtuvieron 9 ST's diferentes. Sin embargo, en el caso de la cepa 416, no se identificó ST con el perfil alélico obtenido con la base de datos mencionada en el procedimiento experimental, por lo que no se consideró

para el resto del análisis. Cabe destacar que, con los resultados obtenidos, se puede confirmar la presencia de una nueva ST y con ello realizar el proceso de registro en la plataforma para la asignación de un nuevo número de ST.

Durante la revisión bibliográfica se hizo la comparación de los diferentes métodos de análisis de dispersión clonal (UPMGA, eBURST, goeBURST) y se llegó a la conclusión de que goeBURST constituye una herramienta mejorada con respecto a las anteriores, pues permite la agrupación de ST's en complejos clonales, por lo que el análisis de la dispersión clonal se realizó con este algoritmo.

Esto es, en términos de MLST, los descendientes del fundador permanecerán inicialmente sin cambios en el perfil alélico, pero con el tiempo surgirán variantes en las que uno de los siete alelos ha cambiado (por mutación puntual o recombinación). Estos genotipos que tienen perfiles alélicos que difieren del fundador en solo uno de los siete locus, se denominan *variantes en un locus* (SLV). Eventualmente, los SLV se diversificará aún más, para producir variantes que difieren en dos de los siete locus (*variante en dos locus* [DLV]), en tres de los locus (*variante en tres locus* [TLV]), y así sucesivamente (Feil *et al.*, 2004). Es por ello que el algoritmo goEBURST es el más viable pues, a diferencia de eBURST, no solo toma en cuenta la relación de las ST's con el genotipo ancestral del complejo clonal, si no que permite identificar diferencias en uno, dos o tres locus.

El parámetro utilizado en este análisis fue SLV con la finalidad de identificar CC en los que las ST's que los confirman difieren en un solo gen.

Con dicho procedimiento, se logró identificar un complejo clonal denominado CC485 conformado por 4 ST's: 485, 45, 323 y 163 , las cuales fueron recolectadas en el mismo año (2021) aunque los pacientes no se encontraban en la misma área de hospitalización. El resto de las ST's (25, 11, 268, 628 y 870) se denominaron *singletons* al no pertenecer a un CC bajo el parámetro empleado.

En este estudio, la secuencia tipo ST25 predominó con un 36.84% (Figura 10), ST que en los últimos años se identificó prevalentemente en cepas de *K. pneumoniae* hipermucoviscosa resistente a carbapenémicos en hospitales de Argentina (Albarracin *et al.*, 2022). Aparte, en un estudio realizado en muestras recolectadas en el periodo 2015-2017 de 3 diferentes hospitales en la ciudad de Buenos Aires, Argentina a muestras cuyo proposito fue describir la epidemiología cambiante de los linajes de *K pneumoniae* KPC en entornos clínicos, se pudo observar que la diseminación de linajes más virulentos como ST25 y ST11, ha sustituido la prevalencia casi absoluta de ST258 en dicha región (Cejas *et al.*, 2019).

El primer estudio que informa una infección causada por *K. pneumoniae* ST25 positivo para blaNDM-1 en la unidad neonatal, se reportó en China en una recién

nacidas de 9 días de vida que nació prematuramente y se obtuvo en cultivo de líquido cefalorraquídeo (LCR) y hemocultivo en octubre de 2019 (Zhao *et al.*, 2022).

La ST258 KPC es una clona de importancia a nivel mundial que, aunque no se encontró en el presente estudio, es importante mencionarla ya que comúnmente infecta a pacientes hospitalizados. Adicionalmente, cabe señalar que en China, el clon dominante de *K. pneumoniae* productora de KPC es ST11, que está estrechamente relacionado con ST258 al ser resistentes a casi todos los antimicrobianos. En 2016 se detectó un brote causado por ST11 *K. pneumoniae* asociado al ventilador en una UCI de un hospital docente terciario en el centro de China (Hu *et al.*, 2016). Dicha ST (ST11) también se identificó en el presente estudio en 2 de las 19 cepas (10.53%), siendo éste el primer reporte en México.

En nuestro país se reportó recientemente la ST25 en un estudio realizado en cepas clínicas de 4 hospitales de la Ciudad de México recolectados en el periodo 2013-2015. Se identificaron un total de cuatro clonas con esta ST aisladas en tres de los cuatro hospitales mencionados (Córdova-Espinoza *et al.*, 2023). En este mismo estudio se encontró la ST628, misma que se identificó en 2 de las 19 cepas (10.53%) analizados en el presente trabajo; así como la ST485 identificada en 1 de las 19 cepas (5.26%), la cual fue denominada por el algoritmo goeBURST como el genotipo ancestral hipotético del subgrupo descendiente del complejo clonal identificado.

La ST45 se encontró solo en 1 de las 19 cepas (5.26%), si bien en nuestro país se reportó con anterioridad en el estado de Guerrero, en un estudio realizado en el periodo 2013-2014 con muestras de cepas de *Klebsiella spp.* obtenidas de pacientes con IAAS de cuatro hospitales rurales (Garza-Ramos *et al.*, 2018).

Del resto de las ST's identificadas (ST's ST11, ST163, ST268, ST323 y ST485), no se encontraron reportes anteriores en nuestro país, sin embargo, existen clonas que fueron previamente reportados en otros países lejanos.

En un estudio realizado a 107 cepas de *K. pneumoniae* recolectados entre los años 2018 y 2019 en un hospital de tercer nivel de atención en China, se detectó por primera vez la ST485 que a su vez demostró por primera vez la coexistencia de los *mcr-1*, *blaNDM-5* y *blaCTX-M-55* (Cao *et al.*, 2021). Esto es relevante ya que éstos genes están implicados en la resistencia a múltiples familias de antimicrobianos.

Esta tipificación multilocus de secuencias, realizada a las 20 cepas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos procedentes del hospital pediátrico de tercer nivel, permitió inferir que este microorganismo no tiene un origen clonal común. No obstante, esta información permite lograr un mejor control

epidemiológico, así como hacer hincapié en la importancia sobre el manejo de este tipo de infecciones.

6. CONCLUSIONES

- Se estandarizó satisfactoriamente la amplificación de 7 genes conservados (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* y *tonB*) de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos para la técnica de análisis multilocus de secuencias (MLST).
- Se amplificaron y secuenciaron 7 genes conservados (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* y *tonB*) en 20 aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos codificada por el gen NDM-1.
- Se identificaron 9 ST's diferentes en 19 de las 21 cepas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, de las cuales:
 - Cuatro ST's (485, 45, 323 y 163) forman parte del complejo clonal CC485.
 - Cinco ST's (25, 11, 268, 628 y 870) se denominaron *singletons* al no pertenecer a un CC.
- No se encontró una relación genética estrecha entre las ST's identificadas, por lo que la incidencia de *K. pneumoniae* en este hospital no se asocia a un origen clonal común.

7. PERSPECTIVAS

El presente estudio se centra en solo un hospital pediátrico de tercer nivel de la Ciudad de México. El análisis de aislamientos que se obtengan de otros hospitales de México permitirá identificar la presencia y diseminación de las ST's, e incluso identificar nuevas ST's de relevancia para nuestro país.

Aunque anteriormente, *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos se asociaba a brotes hospitalarios, con elevada mortalidad y rápida propagación, parece que estas cepas tienen un comportamiento endémico, por lo que es imperativo el estudio de la diseminación de éstas.

Es necesario que se implementen o intensifiquen las campañas y/o estrategias de educación y concientización sobre el uso de antimicrobianos de amplio espectro y último recurso (carbapenémicos) dirigidas a los hospitales de todo el país.

8. REFERENCIAS

- Al-Bayati, M., y Samarasinghe, S. (2022). Biofilm and Gene Expression Characteristics of the Carbapenem-Resistant Enterobacterales, *Escherichia coli* IMP, and *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 Associated with Common Bacterial Infections. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/ijerph19084788>
- Albarracin, L., Ortiz Moyano, R., Vargas, J. M., Andrade, B. G. N., Cortez Zamar, J., Dentice Maidana, S., Fukuyama, K., Kurata, S., Jure, M. Á., Kitazawa, H., y Villena, J. (2022). Genomic and Immunological Characterization of Hypermucoviscous Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST25 Isolates from Northwest Argentina. *International journal of molecular sciences*, 23(13), 7361. <https://doi.org/10.3390/ijms23137361>
- Ambler R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 289(1036), 321–331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Aquino-Andrade, A., Merida-Vieyra, J., Arias De La Garza, E., Arzate-Barbosa, P., y De Colsa Ranero, A. (2018). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Mexico: Report of seven non-clonal cases in a pediatric hospital. *BMC Microbiology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1166-z>
- Bayat A. (2002). Science, medicine, and the future: *Bioinformatics*. *BMJ (Clinical research ed.)*, 324(7344), 1018–1022. <https://doi.org/10.1136/bmj.324.7344.1018>
- Benton, D. (1996). Bioinformatics - Principles and potential of a new multidisciplinary tool. *Trends in Biotechnology*. Elsevier Science Ltd. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)10037-8](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10037-8)
- Bor, M., e Ilhan, O. (2021). Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit: Risk Factors for Mortality. *Journal of Tropical Pediatrics*, 67(3). <https://doi.org/10.1093/tropej/fmaa057>
- Brisse, S., Grimont, F., y Grimont, P. A. (2006). The genus *Klebsiella*. *The Prokaryotes*, 159–196. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x_8
- Bush, K., Jacoby, G. A., y Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(6), 1211–1233. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.6.1211>
- Bush, K., y Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Cao, X., Zhong, Q., Guo, Y., Hang, Y., Chen, Y., Fang, X., Xiao, Y., Zhu, H., Luo, H., Yu, F., y Hu, L. (2021). Emergence of the Coexistence of *mcr-1*, *bla*NDM-5, and *bla*CTX-M-55 in *Klebsiella pneumoniae* ST485 Clinical Isolates in China. *Infection and drug resistance*, 14, 3449–3458. <https://doi.org/10.2147/IDR.S311808>

- Cejas, D., Elena, A., Guevara Nuñez, D., Sevillano Platero, P., De Paulis, A., Magariños, F., Alfonso, C., Berger, M. A., Fernández-Canigia, L., Gutkind, G., y Radice, M. (2019). Changing epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Argentina: Emergence of hypermucoviscous ST25 and high-risk clone ST307. *Journal of global antimicrobial resistance*, 18, 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.06.005>
- Choi, M., Hegerle, N., Nkeze, J., Sen, S., Jamindar, S., Nasrin, S., ... Tennant, S. M. (2020). The Diversity of Lipopolysaccharide (O) and Capsular Polysaccharide (K) Antigens of Invasive *Klebsiella pneumoniae* in a Multi-Country Collection. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01249>
- Cloeckaert, A., Zygmunt, M. S., y Doublet, B. (2017). Editorial: Genetics of Acquired Antimicrobial Resistance in Animal and Zoonotic Pathogens. *Frontiers in microbiology*, 8, 2428. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02428>
- Córdova-Espinoza, M. G., Giono-Cerezo, S., Sierra-Atanacio, E. G., Escamilla-Gutiérrez, A., Carrillo-Tapia, E., Carrillo-Vázquez, L. I., Mendoza-Pérez, F., Leyte-Lugo, M., González-Vázquez, R., Mayorga-Reyes, L., y González-Vázquez, R. (2023). Isolation and Identification of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clones from the Hospital Environment. *Pathogens*, 12(5), 634. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050634>
- de las Rivas, B., Morcobal, A., y Muñoz, R. (2007). MLST (Multilocus Sequence Typing): Un método molecular para la caracterización inequívoca de cepas de *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum*. *Avances en Ciencias y Técnicas Enológicas. Transferencia de Tecnología de la Red GIENOL al Sector Vitivinícola*: p.p 34-35.
- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P. A., y Brisse, S. (2005). Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of clinical microbiology*, 43(8), 4178–4182. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005>
- Echeverri, L. M., y Cataño, J. C. (2010). *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *Iatreia*, 23(3), 240-249.
- El-Gamal, M. I., Brahim, I., Hisham, N., Aladdin, R., Mohammed, H., y Bahaaeldin, A. (2017). Recent updates of carbapenem antibiotics. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.022>
- Emamalipour, M., Seidi, K., Zununi Vahed, S., Jahanban-Esfahlan, A., Jaymand, M., Majdi, H., ... Zare, P. (2020, May 19). Horizontal Gene Transfer: From Evolutionary Flexibility to Disease Progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00229>
- Enright, M. C., y Spratt, B. G. (1999). Multilocus sequence typing. *Trends in microbiology*, 7(12), 482–487. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(99\)01609-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01609-1)
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., y Spratt, B. G. (2004). eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of*

- bacteriology*, 186(5), 1518–1530. <https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004>
- Founou, R. C., Founou, L. L., Allam, M., Ismail, A., y Essack, S. Y. (2019). Whole Genome Sequencing of Extended Spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Hospitalized Patients in KwaZulu-Natal, South Africa. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42672-2>
- Francisco, A. P., Bugalho, M., Ramirez, M., y Carriço, J. A. (2009). Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-152>
- Galani, I., Karaiskos, I., Karantani, I., Papoutsaki, V., Maraki, S., Papaioannou, V., ... Giamarellou, H. (2018). Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece, 2014 to 2016. *Eurosurveillance*, 23(31). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.30.1700775>
- García-Betancur, J. C., Appel, T. M., Esparza, G., Gales, A. C., Levy-Hara, G., Cornistein, W., ... Villegas, M. V. (2021). Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1813023>
- Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., Moreno-Domínguez, S., Toribio-Jiménez, J., Jardón-Pineda, D., Cuevas-Peña, J., Sánchez-Pérez, A., Duran-Bedolla, J., Olguín-Rodríguez, J., y Román-Román, A. (2018). Phenotypic and molecular characterization of *Klebsiella* spp. isolates causing community-acquired infections. *New microbes and new infections*, 23, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.02.002>
- Gómez, J., García-Vázquez, E., y Hernández-Torres, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter*, 28(1), 1-9.
- Grau, S., Echeverría-Esnal, D., Gómez-Zorrilla, S., Navarrete-Rouco, M. E., Masclans, J. R., Espona, M., Gracia-Arnillas, M. P., Duran, X., Comas, M., Horcajada, J. P., y Ferrández, O. (2021). Evolution of antimicrobial consumption during the first wave of covid-19 pandemic. *Antibiotics*, 10(2), 1–10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020132>
- Halat, D. H., y Moubareck, C. A. (2020, April 1). The current burden of carbapenemases: Review of significant properties and dissemination among gram-negative bacteria. *Antibiotics*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040186>
- Hashizume, T., Ishino, F., Nakagawa, J., Tamaki, S., y Matsushashi, M. (1984). Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *The Journal of antibiotics*, 37(4), 394–400. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.394>
- Hu, L., Liu, Y., Deng, L., Zhong, Q., Hang, Y., Wang, Z., Zhan, L., Wang, L., y Yu, F. (2016). Outbreak by Ventilator-Associated ST11 *K. pneumoniae* with Co-

- production of CTX-M-24 and KPC-2 in a SICU of a Tertiary Teaching Hospital in Central China. *Frontiers in microbiology*, 7, 1190. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01190>
- Institut Pasteur, a (s.f). *Klebsiella* locus/sequence definitions database. Recuperado de: https://bigsdbs.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef
- Institut Pasteur, b (s.f) Primers used for MLST of *Klebsiella pneumoniae*. Recuperado de: <https://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/primers-used/>
- INVIFAR. (s.f.). Red Temática de Investigación y Vigilancia de la Farmacorresistencia (INVIFAR). Recuperado de: <https://invifar.ucol.mx/acerca.htm>
- Iredell, J., Brown, J., y Tagg, K. (2016, February 8). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms and clinical implications. *BMJ (Online)*. BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.h6420>
- Klemm, P., y Schembri, M. A. (2000). Fimbrial surface display systems in bacteria: from vaccines to random libraries. *Microbiology (Reading, England)*, 146 Pt 12, 3025–3032. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-12-3025>
- Kumar, S., Shankar, B., Arya, S., Deb, M., y Chellani, H. (2018). Healthcare associated infections in neonatal intensive care unit and its correlation with environmental surveillance. *Journal of Infection and Public Health*, 11(2), 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.08.005>
- Lang, A. S., Zhaxybayeva, O., y Beatty, J. T. (2012, July). Gene transfer agents: Phage-like elements of genetic exchange. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2802>
- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., y Lee, S. H. (2016). Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895>
- Li, Y., Kumar, S., Zhang, L., y Wu, H. (2022). *Klebsiella pneumoniae* and Its Antibiotic Resistance: A Bibliometric Analysis. *BioMed research international*, 2022, 1668789. <https://doi.org/10.1155/2022/1668789>
- López-Jácome, L. E., Fernández-Rodríguez, D., Franco-Cendejas, R., Camacho-Ortiz, A., Morfin-Otero, M. D. R., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Ortiz-Brizuela, E., Rojas-Larios, F., Velázquez-Acosta, M. D. C., Mena-Ramírez, J. P., Rodríguez-Zulueta, P., Bolado-Martínez, E., Quintanilla-Cazares, L. J., Avilés-Benítez, L. K., Consuelo-Munoz, S., Choy-Chang, E. V., Feliciano-Guzmán, J. M., Couoh-May, C. A., López-Gutiérrez, E., ... Garza-González, E. (2022). Increment Antimicrobial Resistance During the COVID-19 Pandemic: Results from the Invifar Network. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 28(3), 338–345. <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0231>
- Lorenz, M. G., y Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological reviews*, 58(3), 563–602. <https://doi.org/10.1128/mr.58.3.563-602.1994>

- Lorenzo-Díaz, F., Fernández-López, C., Lurz, R., Bravo, A., y Espinosa, M. (2017). Crosstalk between vertical and horizontal gene transfer: plasmid replication control by a conjugative relaxase. *Nucleic acids research*, 45(13), 7774–7785. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx450>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Maiden, M. C. J. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual Review of Microbiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121325>
- Martin, J., Phan, H. T. T., Findlay, J., Stoesser, N., Pankhurst, L., Navickaite, I., ... Wilcox, M. H. (2017). Covert dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) in a successfully controlled outbreak: Long- and short-read whole-genome sequencing demonstrate multiple genetic modes of transmission. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(11), 3025–3034. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx264>
- Martínez-Martínez L. (2008). Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 Suppl 1, 82–89. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01860.x>
- Meroueh, S. O., Bencze, K. Z., Heseck, D., Lee, M., Fisher, J. F., Stemmler, T. L., y Mobashery, S. (2006). Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(12), 4404–4409. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510182103>
- Morrison, L., y Zembower, T. R. (2020). Antimicrobial Resistance. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.004>
- Murray, P. R., Pfaller, M. A., Rosenthal, K. S., y Murray, P. R. (2021). *Microbiología médica* (9a edición). Elsevier.
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., y Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 252–275. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
- Noel, G. J., Kendler, J. S., Hartman, B. J., Macielag, M., y Bush, K. (2010). β -Lactam antibiotics. In *Infectious Diseases: Third Edition* (Vol. 2, pp. 1340–1354). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-04579-7.00134-9>
- OMS (2021, 17 de noviembre) Resistencia a los antimicrobianos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#:~:text=La%20OMS%20ha%20declarado%20que,la%20aparici%C3%B3n%20de%20pat%C3%B3genos%20farmacorresistentes>
- Otman, J., Perugini, M. E., Tognim, M. C. B., y Vidotto, M. C. (2007). Atypical phenotypic characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates from an outbreak in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Brazilian Journal of*

- Microbiology*, 38(2), 273–277. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200016>
- Paczosa, M. K., y Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR*, 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., y Bonomo, R. A. (2011, November). Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
- Pasteran, F., Albornoz, E., Faccione, D., Gomez, S., Valenzuela, C., Morales, M., Estrada, P., Valenzuela, L., Matheu, J., Guerriero, L., Arbizú, E., Calderón, Y., Ramon-Pardo, P., y Corso, A. (2012). Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(7), 1795–1797. <https://doi.org/10.1093/jac/dks101>
- Pastor, G. P., Pumarola, T., y Mirelis, B. (2023). Microbiología y Parasitología Médicas (2a. edición, pp. 137–140)., Editorial Médica Panamericana.
- Patel, S. S., Chauhan, H. C., Patel, A. C., Shrimali, M. D., Patel, K. B., Prajapati, B. I., ... Patel, M. A. (2017). Isolation and Identification of *Klebsiella pneumoniae* from Sheep-Case Report. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(5), 331–334. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.037>
- Paterson, D. L., y Bonomo, R. A. (2005, October). Extended-spectrum β -lactamases: A clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
- Perin, J., Mulick, A., Yeung, D., Villavicencio, F., Lopez, G., Strong, K. L., ... Liu, L. (2022). Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–19: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *The Lancet Child and Adolescent Health*, 6(2), 106–115. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(21\)00311-4](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(21)00311-4)
- Podschn, R., y Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.4.589>
- Polin, R. A., Denson, S., Brady, M. T., Papile, L. A., Baley, J. E., Carlo, W. A., ... Frantz, J. (2012). Epidemiology and diagnosis of health care - Associated infections in the NICU. *Pediatrics*, 129(4). <https://doi.org/10.1542/peds.2012-0147>
- Public databases for molecular typing and microbial genome diversity (PubMLST) (s.f.). <https://pubmlst.org/>
- PUCRA (2022, julio) RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN MÉXICO 2017 a 2020 Reporte de los hospitales de la Red PUCRA: Resistencia antimicrobiana y consumo de antibióticos, UNAM. <http://www.puis.unam.mx/divulgacion/pucra.php>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>

- RHOVE (2023, 6 de marzo). Boletín Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud, SSA. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/808320/BOLETINRHOVEC IERRE2022_FINAL.pdf
- Riwu, K. H. P., Effendi, M. H., Rantam, F. A., Khairullah, A. R., y Widodo, A. (2022). A review: Virulence factors of *Klebsiella pneumonia* as emerging infection on the food chain. *Veterinary world*, 15(9), 2172–2179. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2172-2179>
- Rodríguez-Zulueta, P., Silva-Sánchez, J., Barrios, H., Reyes-Mar, J., Vélez-Pérez, F., Arroyo-Escalante, S., ... Garza-Ramos, U. (2013, August). First outbreak of kpc-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (st258) clinical isolates in a mexican medical center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.02530-12>
- Rosa-Mangeret, F., Benski, A. C., Golaz, A., Zala, P. Z., Kyokan, M., Wagner, N., ... Pfister, R. E. (2022, May 1). 2.5 Million Annual Deaths—Are Neonates in Low- and Middle-Income Countries Too Small to Be Seen? A Bottom-Up Overview on Neonatal Morbi-Mortality. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7050064>
- Sawa, T., Kooguchi, K., y Moriyama, K. (2020, January 28). Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>
- Schembri, M. A., Blom, J., Krogfelt, K. A., y Klemm, P. (2005). Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*, 73(8), 4626–4633. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4626-4633.2005>
- Seale, A. C., Blencowe, H., Manu, A. A., Nair, H., Bahl, R., Qazi, S. A., ... Vergnano, S. (2014). Estimates of possible severe bacterial infection in neonates in sub-Saharan Africa, south Asia, and Latin America for 2012: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 731–741. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70804-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70804-7)
- Secretaría de Salud. (2005). NOM-045-SSA2-2005: Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales. Diario Oficial de la Federación. Recuperado de: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5120943&fecha=20/11/2009#gsc.tab=0
- Snitkin, E. S., Zelazny, A. M., Thomas, P. J., Stock, F., Henderson, D. K., Palmore, T. N., y Segre, J. A. (2012). Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. *Science Translational Medicine*, 4(148). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004129>
- Suárez, C., y Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- van Dam, V., Olrichs, N., y Breukink, E. (2009). Specific labeling of peptidoglycan precursors as a tool for bacterial cell wall studies. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 10(4), 617–624. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800678>

- Vázquez, J. A., y Berrón, S. (2004). Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(2), 113–120. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(04\)73045-1](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(04)73045-1)
- Walsh, T. R. (2010). Emerging carbapenemases: A global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(SUPPL. 3), S8. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(10\)70004-2](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(10)70004-2)
- Wang, T., Xu, K., Zhao, L., Tong, R., Xiong, L., y Shi, J. (2021). Recent research and development of NDM-1 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113667>
- World Health Organization. (2005). *Global patient safety challenge: 2005-2006*. World Health Organization. Recuperado de: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43358/9241593733_eng.pdf
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., y Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(12), 5046–5054. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>
- Zaidi, A. K. M., Huskins, W. C., Thaver, D., Bhutta, Z. A., Abbas, Z., y Goldmann, D. A. (2005, March 26). Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. *Lancet*. Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71881-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71881-X)
- Zhao, J., Zheng, B., Xu, H., Li, J., Sun, T., Jiang, X., y Liu, W. (2022). Emergence of a NDM-1-producing ST25 *Klebsiella pneumoniae* strain causing neonatal sepsis in China. *Frontiers in microbiology*, 13, 980191. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.980191>

9. ANEXO

Tabla 6. Origen, fecha de obtención y recepción de las cepas utilizadas.

No.	Clave	Microorganismo	Año	Origen Biológico	Área de hospitalización	Edad
1	359	<i>K. pneumoniae</i>	2020	Secreción respiratoria	Hospitalización	9 años
2	360	<i>K. pneumoniae</i>		Secreción respiratoria	Hospitalización	Desconocida
3	361	<i>K. pneumoniae</i>		Orina	Preescolares	2 años
4	362	<i>K. pneumoniae</i>		Coprocultivo	UCIN	3 meses
5	406	<i>K. pneumoniae</i>		Sangre	UCIN	1 mes
6	408	<i>K. pneumoniae</i>		Coprocultivo	UTIP	SI
7	409	<i>K. pneumoniae</i>		Coprocultivo	UTIP	1 año
8	411	<i>K. pneumoniae</i>		Líquido cefalorraquídeo	Preescolares	13 años
9	416	<i>K. pneumoniae</i>		SI	Lactantes	3 años
10	446	<i>K. pneumoniae</i>		Sangre	Escolares	4 años
11	447	<i>K. pneumoniae</i>		Punta catéter	UTIP	7 meses
12	476	<i>K. pneumoniae</i>		Secreción bronquial	UCIN	RN
13	478	<i>K. oxytoca</i>		Mielocultivo	Preescolares	2 años
14	480	<i>K. pneumoniae</i>		Sangre	UTIP	3 meses
15	481	<i>K. pneumoniae</i>		Secreción bronquial	UTIP	3 meses
16	486	<i>K. pneumoniae</i>		Líquido cefalorraquídeo	Hospitalización	2 meses
17	487	<i>K. pneumoniae</i>		Líquido cefalorraquídeo	Hospitalización	2 meses
18	534	<i>K. pneumoniae</i>	2021	Secreción bronquial	UTIP	1 año
19	541	<i>K. pneumoniae</i>		Sangre	Hospitalización	4 meses
20	558	<i>K. pneumoniae</i>		Sangre	Hospitalización	4 meses
21	563	<i>K. pneumoniae</i>		Sangre	UCIN	RN

RN: Recién nacido, UCIN: Unidad de cuidados intensivos neonatales, UTIP: Unidad de terapia intensiva pediátrica, SI: Sin información.

Tabla 7. Lista de cebadores para los genes a evaluar por MLST.

Gen	Cebador	Secuencia	Tamaño de amplicón (pb)
<i>rpoB</i>	VIC3	GGC GAA ATG GCW GAG AAC CA	1075
	VIC2	GAG TCT TCG AAG TTG TAA CC	
<i>gapA</i>	gapA173	TGA AAT ATG ACT CCA CTC ACG G	662
	gapA181	CTT CAG AAG CGG CTT TGA TGG CTT	
<i>mdh</i>	mdh130	CCC AAC TCG CTT CAG GTT CAG	756
	mdh867	CCG TTT TTC CCC AGC AGC AG	
<i>pgi</i>	pgi1F	GAG AAA AAC CTG CCT GTA CTG CTG GC	500-700
	pgi1R	CGC GCC ACG CTT TAT AGC GGT TAA T	
<i>phoE</i>	phoE604-1	ACC TAC CGC AAC ACC GAC TTC TTC GG	602
	phoE604-2	TGA TCA GAA CTG GTA GGT GAT	
<i>infB</i>	infB1R	TC GCT GCT GGA CTA TAT TCG	462
	infB2F	CGC TTT CAG CTC AAG AAC TTC	
<i>tonB*</i>	tonB1F	CTT TAT ACC TCG GTA CAT CAG GTT	539
	tonB2R	ATT CGC CGG CTG RGC RGA GAG	

Adaptado de Diancourt et al., 2015; Institut Pasteur, b (s.f.)

**tonB*: Secuencia con oligos universales sugerida por Institut Pasteur, b (s.f.)