



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

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CLONAS BACTERIANAS
DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE AISLADAS DE INFECCIONES
NOSOCOMIALES EN LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS
NEONATALES DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO
GÓMEZ”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

NEONATOLOGÍA

P R E S E N T A:

DRA. MARÍA GUADALUPE VEGA GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:
D EN C. LETICIA VERÓNICA JIMÉNEZ ROJAS
TUTOR DE TESIS:
DR. DANIEL IBARRA RÍOS

MEXICO, D.F., FEBRERO 2016.





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.

DRA. REBECA GOMEZ CHICO VELASCO.
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO
ACADÉMICO DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO
"FEDERICO GÓMEZ"



DIRECTOR DE TESIS
D EN C. LETICIA VERÓNICA JIMÉNEZ ROJAS
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS C
LABORATORIO DE INFECTOLOGÍA
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ



TUTOR DE TESIS
DR. DANIEL IBARRA RÍOS
MÉDICO ESPECIALISTA TIPO A
DEPARTAMENTO DE NEONATOLOGÍA
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

DEDICATORIAS

A mis padres. Por ser mi motor y mis guías. En agradecimiento a su gran apoyo día a día, a su ejemplo, amor, paciencia y sacrificios.

A mis hermanos y sus hermosos hijos. Por motivarme a seguir siempre adelante.

A mis tutores. Por su enseñanza y gran conocimiento, por su paciencia y consejo.

A los niños. Por ser grandes guerreros. Porque a pesar de ser tan pequeños son capaces de transformar.

ÍNDICE

1) Resumen	5
2) Introducción	6
3) Marco teórico	7
4) Antecedentes	8
5) Planteamiento del Problema	9
6) Pregunta de Investigación	10
7) Justificación	11
8) Objetivos	12
9) Hipótesis	13
10) Métodos	14
11) Plan de análisis estadístico	15
12) Descripción de Variables	16
13) Resultados del estudio	17
14) Discusión	23
15) Conclusión	24
16) Limitación del estudio	25
17) Cronograma de actividades	26
18) Referencias bibliográficas	27

RESUMEN

Objetivos: Aplicar la tecnología de biología molecular necesaria, que auxilie en la investigación diagnóstica de las infecciones neonatales, así como en brotes epidemiológicos.

Métodos: Es un estudio analítico, descriptivo y prospectivo. En la primera fase del estudio, se incluirán los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes de ambos géneros que se encuentren hospitalizados en el Departamento de Neonatología del HIMFG y que hayan sido considerados como de infección nosocomial por el personal médico del servicio, durante el periodo comprendido de enero a mayo de 2015.

Resultados: Se obtuvieron 42 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* aislados de 15 pacientes quienes fueron abordados en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales por Infección nosocomial. Se determinó que la taquicardia y la fiebre fueron las características clínicas que presentaron en común los pacientes. En cuanto al origen de las muestras se observó que las dos fuentes principales fueron: orina y sangre, los cuales se obtuvieron mediante diferentes métodos. La determinación de susceptibilidad mediante el método de difusión en disco (Kirby-bauer) mostró que todas las cepas presentaron betalactamasas de espectro extendido, así como resistencia a ampicilina, ampicilina/sulbactam, ceftazidima y ceftriaxona y una alta sensibilidad a carbapenemicos y quinolonas. La técnica de PFGE nos permitió determinar clonalidad entre algunos de los aislados de *Klebsiella pneumoniae*, ya que el análisis de las 42 cepas nos generó 12 perfiles electroforéticos, de los cuales destaca el perfil "A" que mostraron 15 cepas provenientes de ocho pacientes. Los pacientes a quienes se les aisló la clona predominante (clona "A") mostraron gran heterogeneidad en su forma de presentación clínica con pacientes francamente sintomáticos (paciente 7) en contraste con pacientes sin mayor sintomatología ni datos de laboratorio (paciente 12) en donde el abordaje se realizó como seguimiento de término del esquema antimicrobiano, sin presencia de características clínicas.

Conclusiones: Como se observa en este estudio, *Klebsiella pneumoniae* representa a uno de los gérmenes patógenos más importantes durante el periodo neonatal ya que se aisló en 38% de los casos considerados como infección nosocomial que se presentaron en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales durante el periodo estudiado.

Siendo de suma importancia debido a que la identificación oportuna de factores de riesgo asociados y las características clínicas más frecuentemente presentadas, orientarán a un diagnóstico de sospecha de bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* como una de las principales causas de sepsis neonatal.

En este estudio, se identificaron 3 clonas principales de *Klebsiella pneumoniae* en el departamento de Neonatología a partir del programa de caracterización molecular, lo cual ha permitido, identificar y aportar mayor información sobre las características de los brotes y auxiliar en la investigación diagnóstica, lo cual sería útil para un control eficiente de las infecciones intrahospitalarias producidas por bacterias en el área de neonatología del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG).

INTRODUCCIÓN

Los Servicios de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) constituyen un área esencial dentro de los hospitales pediátricos ya que reciben recién nacidos con diversos factores de riesgo como son: bajo peso al nacer, inmunosupresión, exposición a procedimientos invasivos como ventilación mecánica, cateterismo, alimentación parenteral, entre otros. Todo esto, aunado a la mayor supervivencia de los recién nacidos pretérmino o con malformaciones congénitas, ocasiona un incremento en la incidencia de las infecciones hospitalarias. La interacción entre estos elementos de riesgo y los relativos al ambiente hospitalario es especialmente compleja en el neonato.^{1,2} La causa de la sepsis neonatal tardía depende de la localización inicial de la infección, la manipulación, el entorno del paciente y de la flora de la UCIN. Los gérmenes más frecuentemente aislados son los bacilos gramnegativos como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Enterobacteriaceae*, así como cocos grampositivos como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.³

Para guiar el tratamiento empírico, identificar nuevos agentes, reconocer epidemias y vigilar tendencias, se debe tener en cuenta la vigilancia microbiológica.⁴ Dentro de las actividades de dicha vigilancia se consideró necesario realizar esta investigación ya que se observó un aumento en la frecuencia de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en la UCIN del HIMFG.

Existen varios factores que favorecen la adquisición de algún tipo de infección en el recién nacido, como la utilización de catéteres, el soporte ventilatorio, la utilización de antibióticos, entre otros, los cuales propician la colonización de un huésped inmunológicamente inmaduro y más vulnerable aún si coexiste prematuridad.^{5,7}

Un trabajo publicado en la Gaceta Médica de México revela que los gérmenes gram negativos como *Klebsiella* y *Serratia* fueron los microorganismos encontrados con mayor frecuencia en recién nacidos hospitalizados, principalmente en los que presentaban infecciones en heridas quirúrgicas. Por otro lado, Morayta Ramírez y col⁶ también refieren que las *Klebsiellas* constituyeron el germen patógeno más común, con un 24,5% de aislamientos¹.

MARCO TEÓRICO

Las infecciones nosocomiales (IN) deterioran la capacidad funcional del paciente y en algunos casos pueden ocasionar trastornos discapacitantes que reducen la calidad de vida. Una de las principales consecuencias directas de las IN, es la prolongación de los días de internamiento ya que, como mínimo; la estadía se prolonga de 1 a 5 días, dependiendo del sitio de la infección y del estado inmunológico del paciente. Aumenta los costos, alcanzando a veces cifras muy elevadas, dependiendo del tipo del o los antimicrobianos utilizados y de la localización de la infección. Consecuentemente, se incrementa la tasa de mortalidad, ya que generalmente el 1% de las IN son la causa de muerte del paciente y cerca del 3% contribuyen a la muerte¹.

Cada año, en el mundo mueren alrededor de 3,7 millones de recién nacidos (RNs) durante las primeras cuatro semanas de vida, el 99% de dichas muertes ocurren en países en desarrollo. Casi el 40% de las defunciones en menores de 5 años se produce durante los 28 primeros días de vida (periodo neonatal). De tal manera que el 75% se produce durante la primera semana de vida y del 25 a 45% durante las primeras 24 horas.⁷ Se considera a la infección como la principal causa, ya que se estima que es responsable de 35% de las muertes neonatales.⁷

La presentación de una infección en el paciente neonato, y especialmente en el prematuro, constituye un problema particular, ya que por las características inmunológicas del paciente, así como las necesidades incrementadas de procedimientos de soporte y terapias invasivas, se modifica notablemente la epidemiología de estas IN, incluyendo susceptibilidad a agentes tradicionalmente inocuos^{8,9}

Las IN en neonatos son de inicio tardío y su incidencia varía ampliamente entre las unidades de cuidados intensivos (UCIN) (7-24,4%) dependiendo de factores ambientales y diferencias en las prácticas clínicas. Sin embargo, se estima que esta incidencia es en promedio del 15-20% en los neonatos menores de 1500 gramos y del 40% aproximadamente en los menores de 1000 g. La tipología y localización de las IN son muy diversas; sin embargo se considera a la sepsis como la infección más frecuente detectada en neonatos en UCIN (45-55%), seguida por infecciones respiratorias (16-30%) e infecciones de vías urinarias (8-18%)¹.

Estudios realizados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) reportan que las infecciones más frecuentes son las bacteremias primarias (27.9%), las neumonías (20.9%), la sepsis (16.5%) y las infecciones de vías urinarias (8.9%).¹⁴

ANTECEDENTES

Las infecciones nosocomiales (IN) representan un problema social y económico¹. En la Norma Oficial Mexicana 045-SSA2-2005 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales (NOM-045) las IN se definen como la “condición localizada o generalizada resultante de la reacción adversa a la presencia de un agente infeccioso o su toxina, que no estaba presente o en periodo de incubación en el momento del ingreso del paciente al hospital y que puede manifestarse incluso después de su egreso”¹.

Son complicaciones frecuentes y severas de la atención hospitalaria y constituyen un problema de salud pública cuya importancia epidemiológica y clínica radica en el impacto a las tasas de morbi-mortalidad, condicionando daños a la salud e incremento en los recursos materiales, humanos y económicos. Se calcula que en países desarrollados, entre el 5 a 10% de los pacientes hospitalizados desarrollan una IN y a nivel mundial afecta al 8.7%, pudiendo controlarse y prevenirse en un 40%¹⁰.

Se consideran entre los mejores indicadores de calidad de la atención hospitalaria, debido a su incidencia, gravedad y a que son el resultado de condiciones relevantes y modificables de las prácticas de atención a los pacientes.

La mayoría de las IN (99%), se producen en forma endémica y sólo ocasionalmente se detectan brotes epidémicos que generan gran alarma y preocupación debido a que pueden involucrar tanto a los pacientes, como al personal y a las visitas.

Las Instituciones hospitalarias, cuentan con Comités de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria, que en “tiempo real” estudian la dinámica de los brotes para brindar acciones inmediatas. En el HIMFG, el Comité de detección y control de Infecciones Nosocomiales es quien se encarga¹¹.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones hospitalarias consideradas cotidianas, así como los brotes epidémicos en el HIMFG, aunque no son frecuentes, son un problema importante, debido a sus posibles consecuencias en términos de morbi-mortalidad, alteración de su funcionamiento, cierres de salas hospitalarias y malestar y ansiedad entre los pacientes y el personal en general¹.

Los métodos convencionales de caracterización bacteriana, ofrecen información que se prolonga 24 a 72 hrs o más. Los sistemas moleculares alternativos aportan mayor información sobre las características individuales y colectivas de las bacterias aisladas. Ciertamente estos procedimientos requieren personal experto, equipamiento adecuado y costos elevados. Sin embargo, la información que aportan es invaluable.

Los microorganismos involucrados en las infecciones neonatales muestran variaciones significativas en relación con el tiempo de presentación de la infección (temprana vs tardía), edad de la gestación (pretérmino vs término), antecedentes de colonización materna y profilaxis antimicrobiana materna intraparto, todo ello aunado a los factores de riesgo propios del recién nacido.¹²

Los bacilos Gram-negativos son patógenos importantes durante el periodo neonatal en los países en desarrollo, destacando *Klebsiella pneumoniae* como uno de los más importantes patógenos en el periodo neonatal, su incidencia varía entre 4.1 y 6.3 por cada 1,000 nacidos vivos, con una tasa de mortalidad entre 18 al 68%. México reportó 7.1 casos por cada 100 admisiones hospitalarias¹³.

Los estudios de caracterización genética bacteriana como la genotipificación ayudan a definir el origen y la ruta de diseminación de una bacteria en un entorno epidemiológico, ya que la definición de clona indica que se trata de la misma bacteria que se ha diseminado de un caso a otro, lo que se conoce como transmisión cruzada, a diferencia de infecciones endógenas donde por lo común se identifica variabilidad clonal.^{14, 15} Por lo tanto, son una herramienta útil para definir conductas en el control de infecciones hospitalarias; en estos casos se utiliza una técnica rápida de PFGE con la cual es posible tener información en 72 horas y plantear intervenciones oportunas para evitar transmisión cruzada.¹⁶

Las técnicas de biología molecular para la investigación de brotes incluyen entre otras: el análisis de restricción del DNA plasmídico, la ribotipificación, la reacción en cadena de la polimerasa aleatoria RAPD-PCR y de secuencias repetitivas de ADN (por ejemplo ERIC-PCR) y la electroforesis en gel por campos pulsantes (PFGE); siendo esta última la más utilizada en la investigación de brotes¹⁷.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la caracterización molecular y la correlación con la presentación clínica de pacientes con Infección Nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* tras la implementación del programa de caracterización de clonas bacterianas provenientes de infecciones nosocomiales en los pacientes hospitalizados en la UCIN en el Hospital Infantil de México Federico Gómez?

JUSTIFICACIÓN

Los laboratorios de microbiología son presionados para obtener resultados rápidos y precisos y el nivel de identificación se limita, en el medio hospitalario; hasta la determinación del microorganismo y su patrón de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Estos métodos convencionales de caracterización bacteriana, no ofrecen suficiente información sobre el origen y/o las distintas vías de transmisión de microorganismos patogénicos entre los pacientes hospitalizados en los hospitales.

Los estudios de caracterización genética bacteriana como la genotipificación ayudan a definir el origen y la ruta de diseminación de una bacteria en un entorno epidemiológico, ya que la definición de clona indica que se trata de la misma bacteria que se ha diseminado de un caso a otro, lo que se conoce como transmisión cruzada, a diferencia de infecciones endógenas donde por lo común se identifica variabilidad clonal. Por lo tanto, son una herramienta útil para definir conductas en el control de infecciones hospitalarias; en estos casos se utiliza una técnica rápida de PFGE con la cual es posible tener información en 72 horas y plantear intervenciones oportunas para evitar transmisión cruzada.¹⁹

Es por esto, que estudios de la dinámica de las transmisiones intrahospitalarias han revelado factores que contribuyen a la presentación de infecciones y por tanto auxiliado en el desarrollo de medidas preventivas más eficientes. Estos factores pueden ser analizados gracias al uso de las técnicas y criterios de la biología molecular, que ayudarían a este instituto a contribuir con la vigilancia, prevención y control de las distintas infecciones.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

Identificar los gérmenes más frecuentemente aislados en pacientes que cursen con infección nosocomial en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Correlacionar la presentación clínica y evolución de los pacientes con infección que cursan con infección nosocomial entre cada grupo de microorganismo.

Aplicar la tecnología de biología molecular necesaria, que auxilie en la investigación diagnóstica de las infecciones neonatales.

Objetivos específicos

1. Realizar un monitoreo constante de la aparición de infecciones nosocomiales debidas a bacterias en la sala de neonatología.
2. Reconocer los aislamientos relacionados que indiquen sospecha de infección individual.
3. Recabar la información clínico-epidemiológica de los pacientes a los que se les aísle alguna bacteria.
4. Recolectar las bacterias aisladas e identificadas por el laboratorio clínico para enviarlas al laboratorio de inmunoquímica junto con los formularios correspondientes.
5. Establecer un banco de datos que en el futuro nos permita detectar clonas residentes en el hospital.

HIPOTESIS

La tecnología molecular alternativa aplicada a bacterias identificadas en pacientes hospitalizados del Departamento de Neonatología, aportará información sobre las características individuales y colectivas de los mecanismos de resistencia antimicrobiana¹⁸.

MÉTODOS

Diseño del estudio: Es un estudio analítico, descriptivo y prospectivo.

Localidad y población blanco del estudio. En la primera fase del estudio, se incluyeron los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes de ambos géneros hospitalizados en el Departamento de Neonatología del HIMFG y que fueron considerados como de infección nosocomial por el personal médico del servicio, durante el periodo comprendido de enero a mayo de 2015.

Lugar

El estudio se realizó en el Hospital Infantil de México Federico Gómez con la colaboración de:

- Departamento de Neonatología
- Departamento de Laboratorio Clínico
- Departamento de Inmunoquímica
- Laboratorio de Infectología

Criterios de Inclusión:

Cepas bacterianas aisladas de cultivos pertenecientes al género/especie *Klebsiella pneumoniae* y consideradas como agente etiológico de infección nosocomial en los pacientes hospitalizados en el Departamento de neonatología.

Criterios de exclusión

Cepas no pertenecientes al género/especie *Klebsiella pneumoniae*.
Cepas que al resemebrarse estén contaminadas o no viables (sin crecimiento).

Monitoreo de infecciones nosocomiales y obtención de datos clínico-epidemiológicos.

La actividad específica de Neonatología, en el operativo de este proyecto, es incluir a los aislamientos detectados en esta área de hospitalización (Anexo A) y coleccionar la información clínico-epidemiológica de cada paciente que presente infección nosocomial (Anexo B). El análisis de los datos obtenidos nos permitirá relacionar las características moleculares de las cepas bacterianas con las clínico-epidemiológicas.

Pruebas de susceptibilidad.

Entre las pruebas diagnósticas que realiza el laboratorio de bacteriología en forma rutinaria, las cepas son sometidas a procesos automatizados de sensibilidad. Este estudio contempla realizar determinaciones especializadas de sensibilidad, que se llevarán a cabo en el Laboratorio de Inmunoquímica de acuerdo a la guía del CLSI, 2012.¹⁹

PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para datos clínico-epidemiológicos se utilizará un análisis descriptivo simple (medidas de tendencia central).

Los perfiles electroforéticos (bandas) generados mediante las distintas estrategias moleculares utilizadas se analizarán por inspección visual examinando y comparando el número y tamaño de bandas. Los patrones de la PFGE (aislados) serán categorizados usando los criterios de Tenover.¹⁹

De ser necesario se construirán dendrogramas utilizando el programa NTSYS versión 2.2

Posteriormente se determinarán los porcentajes de los genotipos bacterianos encontrados, mediante el análisis de frecuencias.

Se analizarán los datos obtenidos para determinar la correlación clínica y epidemiológica con el tipo de IN y utilizando análisis no paramétrico se determinarán los factores de riesgo cuando sea posible.

DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

Tabla 1. Descripción de variables utilizadas en el presente trabajo.

VARIABLE DEPENDIENTE	TIPO DE VARIABLE	DEF. CONCEPTUAL	UNIDAD DE MEDIDA
CARACTERIZACION DE CLONAS DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> EN LA UCIN.	CUALITATIVA	GENOTIPOS DE <i>Klebsiella pneumoniae</i>	PERFIL ELECTROFORÉTICO DE CEPAS <i>Klebsiella pneumoniae</i> DETERMINADO POR ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSADOS
VARIABLE INDEPENDIENTE	TIPO DE VARIABLE	DEF. CONCEPTUAL	UNIDAD DE MEDIDA
EDAD	CUANTITATIVO	TIEMPO TRANSCURRIDO A PARTIR DEL NACIMIENTO	DIAS
GENERO	CUALITATIVO	HOMBRE O MUJER	1= HOMBRE 2=MUJER
TIPO DE NACIMIENTO	CUALITATIVO	UNICO O MULTIPLE	1=VAGINAL 2=CESAREA
VIA DE NACIMIENTO	CUALITATIVO	VAGINAL O CESAREA	1=VAGINAL 2=CESAREA
FECHA TOMA MUESTRA	CUALITATIVA	FECHA DE TOMA DE PRODUCTOS	DIA DEL AÑO
QUEJIDO	CUALITATIVO	SALIDA FORZADA DE AIRE EN LA ESPIRACION	1=SI 2=NO
CONVULSIONES	CUALITATIVO	MOVIMIENTOS ANORMALES	1=SI 2=NO
HIPERTERMIA	CUALITATIVO	TEMPERATURA > 37.5	1=SI 2=NO
HIPOTERMIA	CUALITATIVO	TEMPERATURA < 36.5	1=SI 2=NO
HIPOTENSION	CUALITATIVO	TENSION ARTERIAL POR DEBAJO DE 2 DE DE LA MEDIA PARA SU EDAD	1=SI 2=NO
MARMOREO	CUALITATIVO	ASPECTO RETICULADO POR MALA IRRIGACION CUTÁNEA.	1=SI 2=NO
PALIDEZ	CUALITATIVO	TONO DE PIEL ANORMALMENTE MAS CLARO.	1=SI 2=NO
CIANOSIS	CUALITATIVO	COLORACION AZUL O LIVIDA DE LA PIEL	1=SI 2=NO
ACIDOSIS	CUALITATIVO	PRESENCIA EXCESIVA DE ACIDOS EN LOS TEJIDOS Y LA SANGRE	1=SI 2=NO
ANURIA	CUALITATIVO	SUSPENSIÓN DE LA EXCRECION DE LA ORINA	1=SI 2=NO
HIPOXEMIA	CUALITATIVO	DISMINUCION ANORMAL DE LA PRESION PARCIAL DE OXIGENO	1=SI 2=NO
HIPERCARBIA	CUALITATIVO	AUMENTO DE LA PRESION PARCIAL DE DIOXIDO DE CARBONO	1=SI 2=NO
TAQUIPNEA	CUALITATIVO	FR >60 POR MINUTO	1=SI 2=NO
RET. TORACICA	CUALITATIVO	INCREMENTO DEL ESFUERZO DE LOS MUSCULOS INTERCOSTALES SECUNDARIO A INCREMENTO EN EL ESFUERZO VENTILATORIO	1=SI 2=NO
TAQUICARDIA	CUALITATIVO	INCREMENTO DE LA FRECUENCIA CARDIACA 2 DE DE LAS PERCENTILAS PARA LA EDAD	1=SI 2=NO
INSUFICIENCIA CARDIACA	CUALITATIVO	FALLA DE BOMBA CARDIACA	1=SI 2=NO
HIPERLACTATEMIA	CUALITATIVO	INCREMENTO DE LACTATO PARA LA EDAD GESTACIONES	1=SI 2=NO
LEUCOPENIA	CUALITATIVO	DISMINUCION DE LEUCOCITOS PARA LA EDAD GESTACIONAL	1=SI 2=NO
LEUCOCITOSIS	CUALITATIVO	INCREMENTO DE LEUCOCITOS PARA LA EDAD GESTACIONAL	1=SI 2=NO
BANDEMIA	CUALITATIVO	INCREMENTO DE BANDAS PARA LA EDAD GESTACIONAL	1=SI 2=NO
TROMBOCITOPENIA	CUALITATIVO	DISMINUCION DE PLAQUETAS PARA LA EDAD GESTACIONAL	1=SI 2=NO
PCR	CUANTITATIVO	NIVELES DE REACCION EN CADENA DE POLIMERASA	CANTIDAD
PCT	CUANTITATIVO	NIVELES DE PROCALCITONINA	CANTIDAD

RESULTADOS

Cepas analizadas

Posterior a la recolección de datos, en el periodo comprendido de enero a mayo de 2015 se obtuvieron 42 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en pacientes abordados en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del HIMFG. Estos aislamientos representaron el 38.8% del total de casos considerados como infección nosocomial, en dicha unidad durante el periodo estudiado.

Fuente de aislamiento.

El origen de la muestra de los pacientes estudiados, se obtuvo de dos fuentes principales que fueron: orina y sangre, por diferentes métodos de obtención (fig. 1). Como se observa en la figura también se aisló a la bacteria de catéteres y líquido pleural.

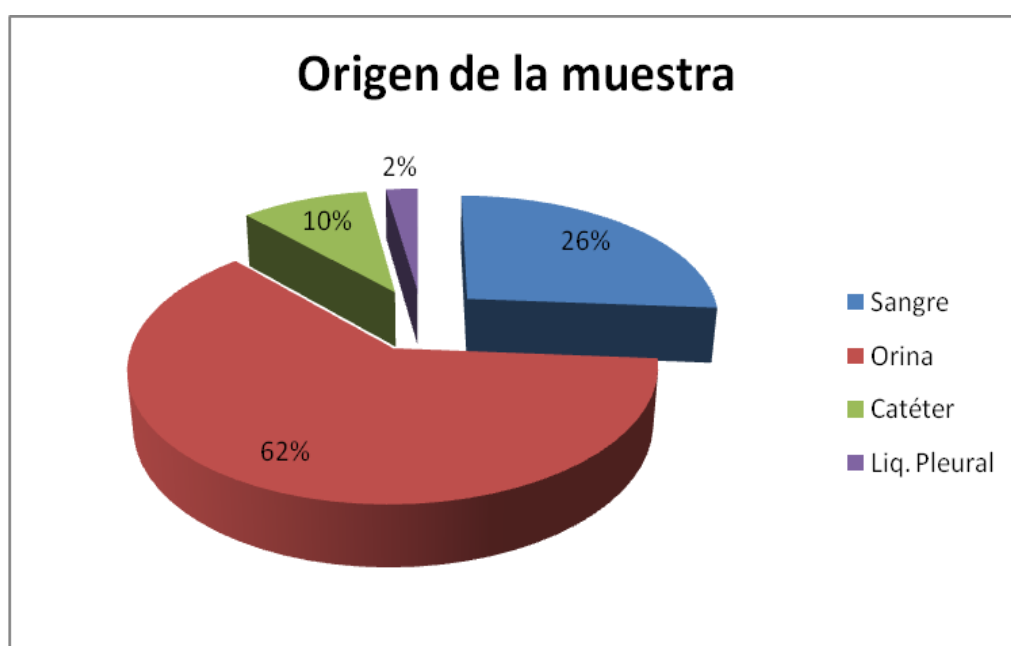


Figura 1. Porcentajes de origen de las muestras procesadas a las que se les aisló *Klebsiella pneumoniae* en la UCIN del HIMFG durante el periodo comprendido de enero a mayo de 2015.

Susceptibilidad a antimicrobianos.

Del total de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* analizadas, 100% mostraron ser productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs positivas).

De los 42 aislamientos el 100% presentaron resistencia para antimicrobianos como: Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Ceftazidima y Ceftriaxona. Observándose en el antibiograma una alta sensibilidad a carbapenémicos y quinolonas. (Fig. 2)

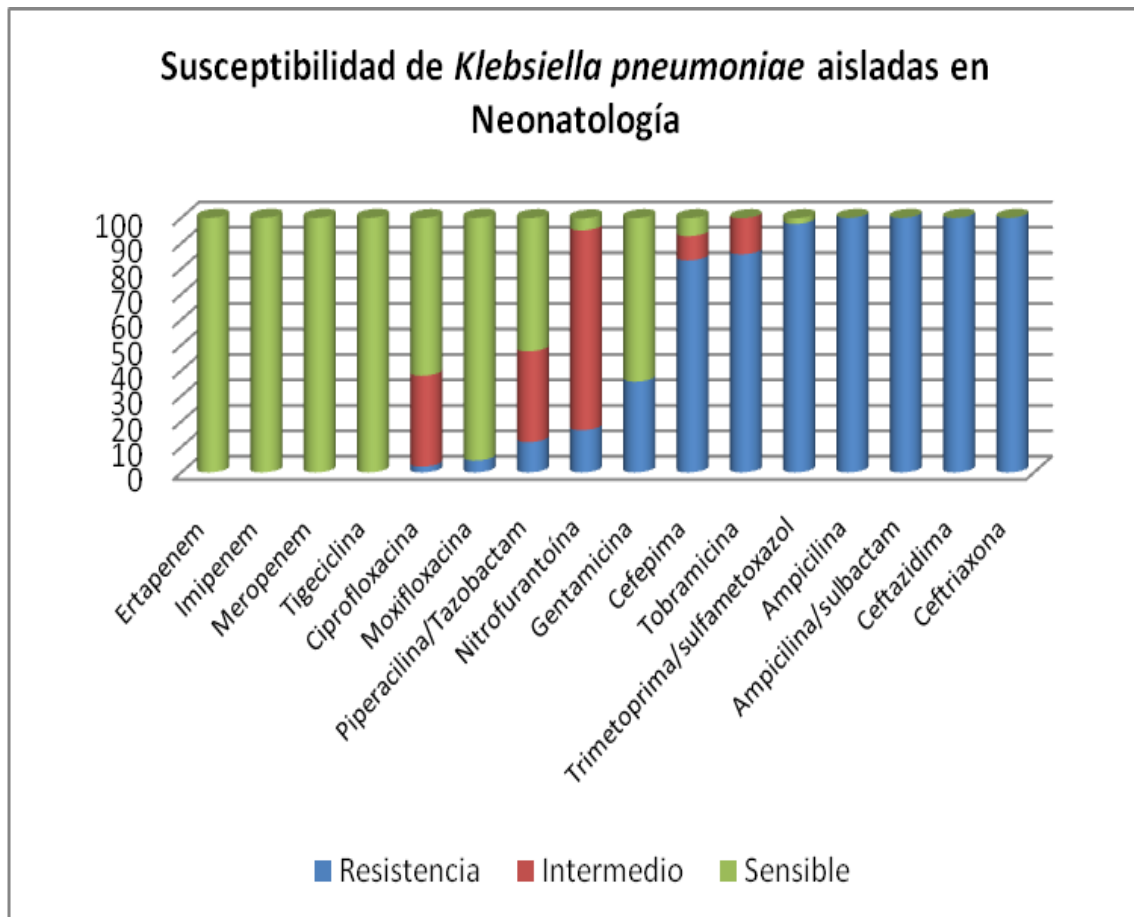


Figura 2. Susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en la UCIN del HIMFG durante el periodo comprendido de enero a mayo de 2015. Método de difusión en disco (Kirby-bauer)

Características clínicas de pacientes y moleculares de las cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

La tabla 2 muestra las clonas encontradas entre los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, así como las características clínicas de los pacientes abordados.

Las características clínicas más frecuentes fueron hipertermia, palidez, taquicardia y bandemia, sin embargo; podemos observar que no estuvieron presentes en todos los pacientes.

Todas las clonas mostraron gran heterogeneidad en su forma de presentación clínica con pacientes francamente sintomáticos (paciente 7) en contraste con pacientes sin mayor sintomatología ni datos de laboratorio (paciente 12) en donde el abordaje se realizó como seguimiento de término del esquema antimicrobiano, sin presencia de características clínicas.

Se observa también que los biomarcadores (PCR y PCT) así como la presencia de células proinflamatorias, no presentan correlación clínica al momento del abordaje.

Es importante mencionar que durante el periodo de evolución de 6 días que define el programa, no se presentó ningún evento de defunción, sin embargo, los pacientes 1, 6 y 8 fallecieron en la evolución posterior.

Tabla 2. Características clínicas y relación clonal encontrada entre las cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de niños hospitalizados en Neonatología del HIMFG.

TIPO DE CLONA	F	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	I	K	A	A	A	A	A	A	A	
# PACIENTE	1	2									3	4								5	
PACIENTE (CASOS PRESENTADOS)	1.1	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.9	3.1	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	4.8	4.9	5.1
MES DE ABORDAJE	ENE		FEB				MAR				ENE	FEB	MAR						FEB		
VARIABLES																					
EDAD (DIAS) TOMA MUESTRA	16	60	60	60	90	90	90	90	90	90	240	95	95	95	90	90	90	90	90	90	74
QUEJIDO		+												+	+	+	+	+	+	+	
CONVULSION			+	+	+	+	+	+	+	+											
HIPERtermIA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+				+
HIPOTERMIA																					
HIPOTENSION		+																			
MARMOREO		+									+			+	+	+	+	+	+	+	
PALIDEZ		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+				
CIANOSIS											+			+	+	+	+				
ACIDOSIS		+												+	+	+	+				
ANURIA																					
HIPOXEMIA		+										+	+	+	+	+	+				
HIPERCARBIA		+									+			+	+	+	+				
TAQUIPNEA	+	+												+	+	+	+	+	+	+	
RETRACCION TORACICA		+												+	+	+	+				
TAQUICARDIA		+	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+
INSUFICIENCIA CARDIACA	+	+																			
HIPERLACTATEMIA		+												+	+	+	+				
LEUCOPENIA																					+
LEUCOCITOSIS	+	+										+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BANDEMIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+	+				+
TROMBOCITOPENIA	+																				
PCR	6.6	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.66	0.5	0.66	0.5	3.16	0.32	0.32	12.2	12.2	12.2	12.2	5.8	5.8	5.8	0.15
PCT	0.36	0.319	1.7	1.7	1.7	1.7	0.15	1.7	0.15	1.7	4.16	1.28	1.28	0.52	0.52	0.52	0.52	1.2	1.2	1.2	0.66

Tabla 2. Características clínicas y relación clonal encontrada entre las cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de niños hospitalizados en Neonatología del HIMFG.

Continuación

TIPO DE CLONA	L	A	A	E	H	G	D	A	A	A	A	C	C	C	C	C	J	E	D	D	D	
# PACIENTE		6	7			8	9		10	11		12					13	14	15			
PACIENTE (CASOS PRESENTADOS)	5.2	6.1	7.1	7.2	7.3	8.1	9.1	9.2	10.1	11	11.2	12.1	12.2	12.3	12.4	12.5	13.1	14	15	15	15.3	
MES DE ABORDAJE		FEB					MAR					ABR										
VARIABLES																						
EDAD (DIAS) TOMA MUESTRA	74	24	20	20	20	20	60	60	31	25	25	120	120	120	120	120	30	16	30	30	30	
QUEJIDO			+	+	+		+	+		+												
CONVULSION												+										
HIPERTERMIA							+	+	+	+								+	+			
HIPOTERMIA																						
HIPOTENSION																						
MARMOREO																		+	+			
PALIDEZ							+	+		+												
CIANOSIS			+	+	+																	
ACIDOSIS																						
ANURIA																						
HIPOXEMIA			+	+	+																	
HIPERCARBIA																						
TAQUIPNEA			+	+	+		+	+	+	+	+	+						+	+			
RETRACCION TORACICA																						
TAQUICARDIA			+	+	+				+	+	+	+						+	+	+		
INSUFICIENCIA CARDIACA							+	+														
HIPERLACTATEMIA										+								+				
LEUCOPENIA		+																	+			
LEUCOCITOSIS							+	+	+	+										+		
BANDEMIA	+	+	+	+	+				+	+									+			
TROMBOCITOPENIA	+																		+			
PCR	4.1	5.93	0.5	0.5	0.5	4.6	0.33	0.3	0.44	0.8	5.5	0.31	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	60	0.4	2.1	2.09
PCT	0.28	0.14	0.1	0.1	0.1	0.1	1.2	1.2	1.35	0.5	2.56	1.13	0.52	0.52	0.52	0.52	0.32	2.5	0.7	1.4	1.39	

PFGE.

La técnica de PFGE nos permitió determinar clonalidad en algunos de los aislados de *Klebsiella pneumoniae*, ya que el análisis de las 42 cepas nos generó 12 perfiles electroforéticos (muestra en la fig. 3). De los cuales destaca el perfil "A" que mostraron 15 cepas provenientes de ocho pacientes. El siguiente en orden de frecuencia, denominado "B" estuvo presente en nueve cepas que sin embargo; fueron aisladas del mismo paciente. Se observó que a cuatro pacientes les fueron aisladas clonas diferentes y que incluso a uno de ellos se le aisló la clona predominante y otra perteneciente a otro grupo (fig 4).

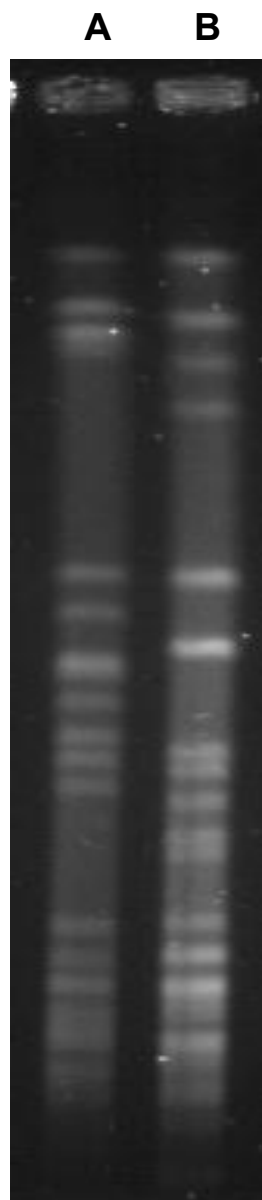


Figura 3. Electroferograma de cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en la UCIN del HIMFG obtenidos mediante la técnica de PFGE, utilizando la enzima Xba I. A y B corresponden a los perfiles denominados "A" y "B" respectivamente.

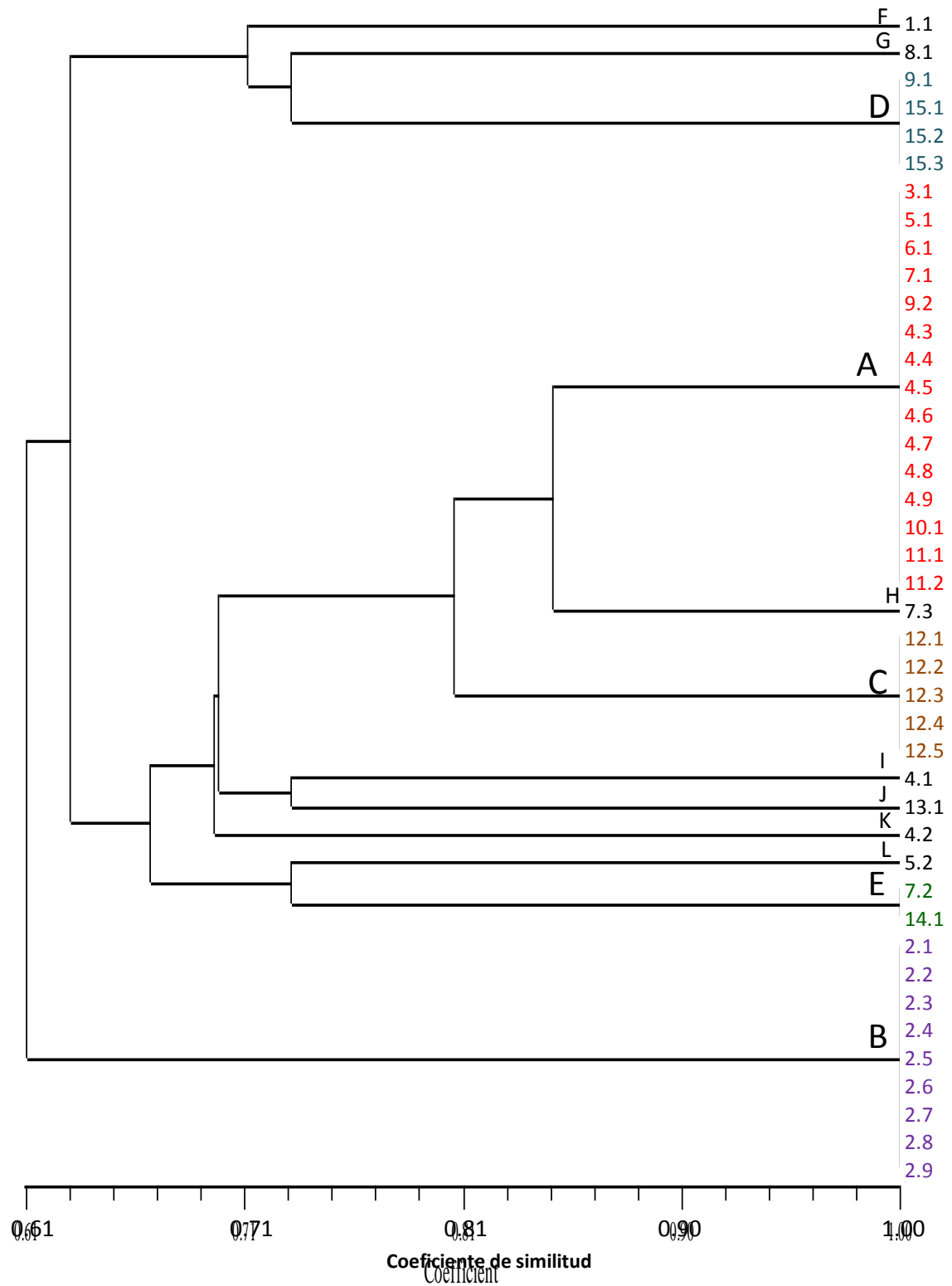


Figura 4. .- Dendrograma de los patrones electroforéticos generados por la técnica de PFGE de cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de niños hospitalizados en el departamento de Neonatología del Hospital Infantil de México Federico Gómez

DISCUSIÓN

Las infecciones en el periodo neonatal constituyen una causa importante de morbilidad, aumento de la estancia hospitalaria y mortalidad en todas las Unidades de Cuidados Intensivos.

La detección, biodiversidad y grados de adaptación de los microorganismos son ahora variables que pueden ser analizadas gracias al uso de técnicas de biología molecular, que junto con la información y correlación clínico-epidemiológica pueden contribuir a la vigilancia, prevención y control de las distintas infecciones. Dichos métodos moleculares son atractivos porque permiten un resultado rápido y con una alta sensibilidad.

Como se observa en este estudio, *Klebsiella pneumoniae* representa a uno de los gérmenes patógenos más frecuentemente aislados en el periodo neonatal con una frecuencia del 75% en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Siendo de suma importancia debido que la identificación oportuna de factores de riesgo asociados y las características clínicas más frecuentemente presentadas, orientarán a un diagnóstico de sospecha de bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* como una de las principales causas de sepsis neonatal.

Entre las características clínicas más frecuentemente presentadas predominan la fiebre, taquicardia, cambios en la coloración de la piel como resultado de hipoperfusión tisular y alteraciones en el esfuerzo respiratorio de la misma manera la leucocitosis, bandemia, trombocitopenia y alteraciones en el equilibrio ácido base.

Cabe destacar, que como se observa en este estudio, existe poca correlación entre la presentación clínica y biomarcadores de apoyo diagnóstico como son PCR, PCT y células proinflamatorias, lo que constituye un reto diagnóstico y continua siendo un problema para detección de pacientes con sepsis, lo cual a su vez, limita ofrecer tratamientos antimicrobianos dirigidos de acuerdo a la sensibilidad o multirresistencia de cada germen aislado, siendo esta última, observada con mayor frecuencia debido al uso indiscriminado de los antimicrobianos en las unidades de cuidados intensivos neonatales y con esto condicionando mayores eventos de falla a tratamiento y mayor utilización de esquemas con mayor espectro de cobertura.

Como se mencionó anteriormente la mortalidad en el estudio durante la evolución a 6 días fue cero, sin embargo 3 de los 12 pacientes fallecieron en los meses posteriores, destacando, que además de la bacteriemia, en estos pacientes existían múltiples condiciones de base y diagnósticos simultáneos no necesariamente de etiología infecciosa que pudieron contribuir a la muerte.

CONCLUSIÓN

El reconocimiento y control de las infecciones dependen de la capacidad de análisis de los patógenos aislados de humanos y su identificación en las probables fuentes de contaminación, hasta llegar, en lo posible a su reservorio y las vías de transmisión.

Las herramientas para realizar a cabo estos análisis, requieren metodologías de biología molecular que permitan establecer las relaciones del DNA entre las bacterias aisladas y determinar el grado de identidad genética existente entre ellas para identificar el agente infeccioso causal de la patología y la fuente de infección. Esta metodología se denomina genéricamente subtipificación molecular y es la base de una de las nuevas disciplinas: la epidemiología molecular.

En este estudio, se pudieron identificar 12 clonas diferentes de *Klebsiella pneumoniae* a partir del programa de caracterización molecular, lo cual ha permitido, identificar y aportar mayor información sobre las características clínicas y epidemiológicas de los brotes y auxiliar en la investigación diagnóstica, lo cual sería útil para un control eficiente de las infecciones intrahospitalarias producidas por bacterias en el área de neonatología del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG).

LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

Aunque se intentará capturar la mayor cantidad posible de aislados bacterianos causales de IN, se sabe que algunas ocasiones es imposible el aislamiento del agente causal, por lo que el presente trabajo sólo incluirá bacterias previamente aisladas e identificadas por el laboratorio clínico.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Cronograma de actividades del protocolo de Investigación

Fecha de inicio: (mes/año)	BIMESTRE											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Enero/2015	Ene-feb 2015	Mar-abr 2015	May-jun 2015	Jul-ago 2015	Sep-oct 2015	Nov-dic 2015	Ene- feb 2016	Mar-abr 2016	May-jun 2016	Jul-ago 2016	Sep-oct 2016	Nov- dic 2016
ACTIVIDAD												
Obtención de insumos	X	X					X	X				
Estandarización de técnicas	X	X										
Inclusión de participantes			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Realización de estudios			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Análisis de los estudios						X	X	X	X			
Presentación de resultados							X			X	X	
Elaboración de manuscritos	X									X	X	X
Publicación											X	X

OTRAS ACTIVIDADES (ESPECIFICAR)

Elaboración de manual de procedimientos.	X	X										
--	---	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud, informe documental extenso. 2011.
- ² Norma Oficial Mexicana 045-SSA2-2005 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales (NOM-045)
- ³ Secretaría de Salud y Subsecretaría de Innovación y Calidad. Dirección general de evaluación del desempeño. Estudio multicéntrico para estimar la prevalencia puntual de las infecciones nosocomiales en los hospitales generales de los Servicios estatales de Salud, resumen ejecutivo.
- ⁴ Panorama de las Neumonías Nosocomiales registradas en la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. 2012; 2(31).
- ⁵ Prevención de las infecciones nosocomiales: Guía práctica- WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12
- ⁶ Villegas SR, Muro FR, Espinoza GJ, Cuevas ML, Magaña MO, Estrada FV, García HJ. Diagnóstico etiológico de sepsis neonatal basado en factores de riesgo e índices hematológicos. *Enf Inf Microbiol* 2008;28: 51-59s
- ⁷ Zamora-Castorena S, Murguía-de-Sierra MT. Five years experience with neonatal sepsis in a pediatric center. *Rev Invest Clin* 1998; 50: 463-70.
- ⁸ DECLARACION CONJUNTA OMS/UNICEF. Visitas domiciliarias al recién nacido: una estrategia para aumentar la supervivencia.
http://whqlibdoc.who.int/hq/2009/WHO_FCH_CAH_09.02_spa.pdf
- ⁹ Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud 2007. Ministerio de Sanidad y Consumo. Available online: <http://www.msc.es>.
- ¹⁰ González-Saldaña N, Castañeda-Narváez JL, Saltigeral-Simental P, Rodríguez-Weber MÁ, López-Candiani C. Infecciones nosocomiales en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales. *Acta Pediatr Mex* 2011; 32: 28-32.
- ¹¹ Struelens J and Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (MESGEM). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiology and Infect* 1996; 2: 2-11.
- ¹² Tenover FC, Robert DA, Goering RV, Patricia AM, Barbara EM, David HP and Bala S. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-9.
- ¹³ Sneath PH and Sokal RR. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco. pp: 573
- ¹⁴ Vilchez G, Alonso G. Alcances y limitaciones de los métodos de biología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2009; 29:6-12.

-
- ¹⁵ Zaidi N, Konstantinou K, Zervos M. The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. Arch Pathol Lab Med. 2003; 127:1098-105.
- ¹⁶ Segura CE, Arredondo GJL. Sepsis neonatal. En: Arredondo JL, Figueroa DR, ed. *Temas actuales en infectología*. México D. F.: Intersistemas, 2000: 323-335.
- ¹⁷ Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth Mol Cell Biol* 1994; 5: 25-40.
- ¹⁸ Moretzsohn MC, Nunes CDM, Ferreira ME and Grattapaglia, D. RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) *Theor Appl Genet* 2000; 100: 57-62.
- ¹⁹ Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, fifteenth informational supplement; M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. 2012.