



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA



HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**“Determinación de los genes que codifican  $\beta$ -lactamasas  
en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de neonatos del Hospital  
Infantil de México Federico Gómez”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO**

P R E S E N T A

**ZELTZIN YANITSEY PALACIOS VENTURA**

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. LETICIA VERÓNICA JIMÉNEZ ROJAS

ASESOR DE TESIS:

M en C. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ



CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El amor es sufrido, es benigno; el amor no tiene envidia, el amor no es jactancioso, no se envanece; no hace nada indebido, no busca lo suyo, no se irrita, no guarda rencor; no se goza de la injusticia, más se goza de la verdad.

Todo lo sufre, todo lo cree, todo lo espera, todo lo soporta.

1 Corintios 13:4-7

# AGRADECIMIENTOS

Primeramente le agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por otorgarme una profesión, a cada uno de mis profesores por enseñarme, por tenerme paciencia y por darme una lección no sólo académica sino también de vida, pero en especial a mi profesora **Paty Vidal** que su vida motivo la mía.

También le agradezco a la **Dra. Guillermina Campos** por darme la oportunidad de realizar mi trabajo en el hospital, al Hospital Infantil de México Federico Gómez por prestarme sus instalaciones para el desarrollo y elaboración de mi tesis, en particular al Laboratorio de Infectología área de bacteriología y en especial le agradezco con mucho cariño a mi directora de tesis la **Dra. Verónica Jiménez** por enseñarme los procedimientos con mucha dedicación y tenerme paciencia en el proceso, pero sobre todo por su gran cariño hacia mí.

De igual manera le doy las gracias a mi asesor de tesis el **Maestro Roberto Cruz** por la ayuda y a mis sinodales **QFB Alicia Cabrera** y **QFB Miriam Hinojosa** por darme un espacio en su vida.

Por último le agradezco a cada uno de mis amigos por acompañarme en este largo camino, darme su cariño y su apoyo, pero en especial a **Sharone Garduño** porque siempre estuvo a mi lado en esta etapa tan bonita de mi vida, gracias a ella tuve muchas aventuras en la etapa de aprender a ser QFB.

## DEDICATORIA

Se dice fácil tener un título pero lo que conlleva es mucho, a lo largo de estos 6 años he aprendido demasiadas cosas, desde no conformarme con una calificación hasta no rendirme cuando ya no tengo fuerzas. Sin embargo la vida nos dice que hay que aprender de todo lo que pasa. Este trabajo, en primera, se lo dedico a **Dios** por darme todo en la vida.

A mis tíos **Javier, Ranulfo, Lilia, Rosa, Andrea, Guadalupe, Ana, María Elena y Salvador** que siempre me han dado un consejo, un abrazo, un consuelo y mucho amor. A mi tía **Estela** que aunque no está físicamente, a lo largo de su vida me quiso como a una hija.

A mis primos que son más que eso, mis hermanos **Anabel, Daniela, Israel, Rarámuri, Lucy y Javiercito** que a pesar de todo siempre están consintiéndome, apoyándome, escuchándome y dándome ese empujón para dar lo mejor de mí.

A mis casi hijos **Elian y Naim** que cuando hay momentos grises, convierten mi mundo de colores, con sus sonrisas y su amor incondicional.

Por último, pero los más importantes, con mucho énfasis y con todo el amor que puedo dar, le dedico mi carrera, mi vida y mi tesis a mis amados padres, **Manuel Palacios y Patricia Ventura** que desde pequeña me amaron como nadie, me dieron la vida, me formaron y me hicieron la mujer que soy, que me han dado todo para seguir adelante y a pesar de que ella no está físicamente, seguirán siendo mi motivación y mi inspiración para dar lo mejor, para no rendirme y para ser la mujer exitosa que ellos siempre han soñado.

# ÍNDICE

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco teórico.....</b>	<b>3</b>
2.1. Generalidades de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	3
2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	5
2.2.1 Generalidades.....	5
2.2.2 Cuadro clínico.....	8
2.3. Tipos de antibióticos.....	9
2.4. Mecanismos de resistencia.....	15
2.5. Historia y tipos de $\beta$ -lactamasas.....	22
2.6. Epidemiología de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	29
2.7. Fundamento de la extracción de ADN.....	30
2.8. Reacción en cadena de la polimerasa.....	31
2.9. Electroforesis.....	34
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>36</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>37</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
6.1. Diseño.....	39
6.2. Universo.....	39
6.3. Variables.....	39
6.4. Técnicas.....	40
6.5. Análisis estadístico.....	47
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>63</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>12. ANEXO I.....</b>	<b>73</b>

# INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud recientemente publicó una lista de las bacterias que se han hecho multirresistentes a los antibióticos, tiene una clasificación que engloba a las de prioridad crítica, elevada y media. La prioridad crítica incluye a las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan un ventilador para poder sobrevivir, la bacteria objeto en este estudio es *Klebsiella pneumoniae* y es considerada de situación crítica.

*K. pneumoniae* es una bacteria gramnegativa, de la familia *Enterobacteriaceae*, tiene forma de bacilo, anaerobia facultativa, tiene una cápsula y es inmóvil. Su mecanismo de transmisión es por contacto y como permanece mucho tiempo en las manos puede llegar a diseminarse por varios pacientes, diferentes salas y hasta en países, sobre todo por su resistencia a la desecación conferida por la cápsula que la protege. Como ya se ha mencionado es una bacteria muy resistente a los antibióticos en especial a los carbapénemicos y a las cefalosporinas, principalmente por la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas, las cuales pueden romper el anillo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos haciéndolos ineficaces en su labor y evitando que se elimine la bacteria. Esto provoca la necesidad de conocer cuáles son los mecanismos de resistencia con los que cuentan las bacterias ya que los pacientes se están quedando sin opciones de tratamiento para atacar la infección, haciendo imposible su recuperación.

En el Hospital Infantil de México Federico Gómez se han aislado 96 cepas de *Klebsiella pneumoniae* en un periodo de 2 años. Estas fueron obtenidas de pacientes hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) y están relacionadas a infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS).

El estudio se enfocó en determinar los genes de resistencia más frecuentes en las cepas aisladas. Lo que puede auxiliar al desarrollo de estrategias para el control de infecciones adquiridas en el hospital; ya que al conocer los mecanismos de resistencia que utilizan estas bacterias se evitarán tratamientos inadecuados para este tipo de infecciones.



# MARCO TEÓRICO

## 2.1. Generalidades de la familia *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por un grupo grande y heterogéneo de bacterias, bacilos gramnegativos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, catalasa variable (por lo común positiva), cápsula variable y movilidad variable, temperatura óptima de crecimiento 37°C, reducción de nitratos variable (la mayoría positivo). Reciben su nombre, por la localización habitual como saprófitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, se encuentran de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales, además del hombre, Estas bacterias infectan sitios específicos más frecuentemente (Cuadro 1)<sup>1, 2</sup>.

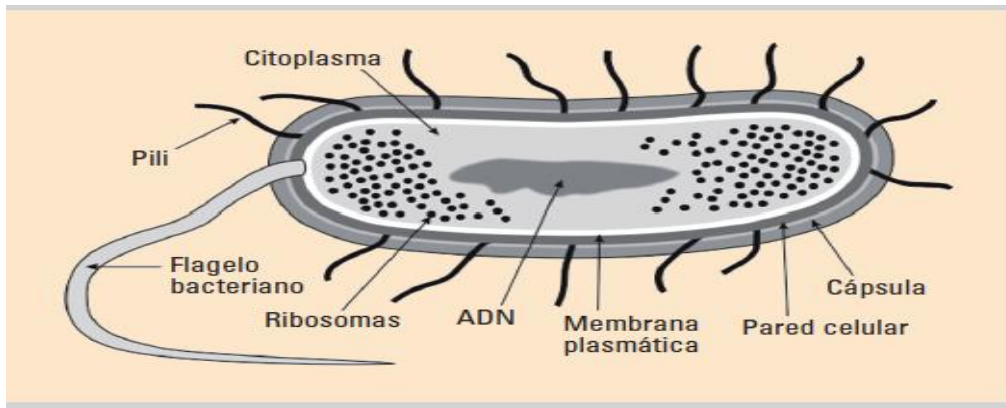
**Cuadro 1. Localización de las infecciones por las enterobacterias más frecuentes en el cuerpo humano<sup>1</sup>**

<b>Localización</b>	<b>Bacterias más frecuentes</b>
<b>SNC</b>	<i>Escherichia</i>
<b>Tracto respiratorio inferior</b>	<i>Klebsiella, Enterobacter, Escherichia</i>
<b>Torrente sanguíneo</b>	<i>Escherichia, Klebsiella, Enterobacter</i>
<b>Tracto digestivo</b>	<i>Salmonella, Shigella, Escherichia, Yersinia</i>
<b>Tracto urinario</b>	<i>Escherichia, Proteus, Klebsiella, Morganella</i>

## Estructura

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son microorganismos con forma de bastón, por lo general de 1-3  $\mu\text{m}$  de largo y 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Como en otras bacterias gramnegativas, su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar (Figura 1). La membrana interna (o citoplasmática) consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa siguiente, o capa externa, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas. La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS) que son un importante factor de virulencia de estas bacterias, las lipoproteínas a su vez están fijadas al peptidoglucano, proteínas porinas multiméricas que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y otras proteínas de la membrana externa. El LPS tiene tres dominios principales: el esqueleto de lípido A, el oligosacárido fosforilado central (core) y las cadenas laterales de oligosacárido de repetición. El lípido A, también conocido como endotoxina, es la parte biológicamente activa de la molécula que el huésped reconoce. El oligosacárido de repetición unido al LPS se conoce como antígeno O. Este antígeno es la base para la clasificación de los serogrupos<sup>1</sup>.

Figura 1. Estructura de la familia *Enterobacteriaceae* y sus componentes más importantes<sup>1</sup>.



## 2.2. *Klebsiella pneumoniae*

### 2.2.1 Generalidades

El género *Klebsiella* recibió ese nombre en honor a Edwin Klebs, un microbiólogo alemán de fines del siglo XIX<sup>3</sup>.

*Klebsiella pneumoniae* es una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es gramnegativa (Figura 2). Es un bacilo, anaerobio facultativo, no tiene movilidad y está encapsulada<sup>4</sup>. Está ampliamente esparcida en el ambiente, presente de manera especial en las superficies de mucosas de mamíferos, en los seres humanos coloniza nasofaringe y el tracto gastrointestinal, pero también se ha encontrado en tracto urinario<sup>4,5</sup>.

**Figura 2. Tinción de bacterias gramnegativas<sup>6</sup>.**



Es un patógeno oportunista, tiene como factores de virulencia endotoxinas, la cual facilita su multiplicación en tejidos del hospedero<sup>2,4</sup>, puede permanecer en las manos porque tiene diferentes propiedades como resistir la desecación puesto que tiene una cápsula hidrófila que la protege, así como de la fagocitosis por los polimorfonucleares y macrófagos y de los bactericidas, esta cápsula está hecha de polisacáridos complejos y tiene subunidades repetidas de 4 a 6 azúcares, además de ácidos urónicos con carga negativa. Puede estar sujeta al hospedero por medio de adhesinas y fimbrias no flagelares que se encuentran en la superficie del hospedero, tiene un antígeno O que la protege del complemento. Secreta sideróforos, su función es quelar el hierro y es esencial para el crecimiento bacteriano, lo que provoca que asegure su nutrición<sup>4</sup>. Aunado a esto, tiene más mecanismos de resistencia los cuales se explicarán con mayor detenimiento en otro apartado.

Se recupera con mayor frecuencia de muestras clínicas, produce una neumonía clásica primaria<sup>3</sup>. Sabemos que la resistencia bacteriana está en incremento y es un problema serio, de acuerdo a diferentes informes internacionales y locales, uno de los principales agentes aislados es *Klebsiella pneumoniae* y está relacionada a infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), porque es un microorganismos que se adapta muy bien en un hospital. Esto se debe a que sobrevive mucho tiempo en las manos del personal de salud (por las características ya mencionadas), facilitando la diseminación entre los pacientes, ciudades y países<sup>4</sup>.

Los pacientes más susceptibles son los hospitalizados en unidades de cuidados intensivos (UCI) con un tratamiento con antibióticos de amplio espectro<sup>7</sup>, los neonatos, los inmunocomprometidos y los que tienen enfermedades debilitantes como *diabetes mellitus* y enfermedad obstructiva crónica, provoca complicaciones a los pacientes con insuficiencia renal<sup>3,4,5,8</sup>. *K. pneumoniae* productora de BLEE ( $\beta$ -lactamasa de espectro extendido), se ha aislado con mayor frecuencia en UCI neonatal y pediátrica<sup>9</sup>, como es una bacteria multiresistente a antibióticos tiene una tasa de mortalidad y morbilidad alta<sup>10</sup>.

Para poder identificar a *K. pneumoniae*, se empieza con una tinción de Gram (Figura 2), enseguida se observa la morfología colonial; en agar sangre son colonias grandes, gris mate, mucoides, esto se debe a la cápsula<sup>3</sup>. La identificación definitiva se realiza mediante pruebas bioquímicas (Anexo I) ya sean caseras o sistematizadas como el sistema Vitek®, en este trabajo se realizó la identificación por los dos métodos.

### 2.2.3 Cuadro clínico

La neumonía tiende a ser destructiva, con necrosis y hemorragia extensas, y conduce a la producción de esputo que puede ser viscoso, mucoide y rojo ladrillo o fluido<sup>3</sup>.

En los casos graves se pueden observar abscesos pulmonares, enfermedad cavitaria crónica, hemorragia interna y hemoptisis, aparte puede producir infecciones extrapulmonares como enteritis y meningitis en neonatos, infecciones de las vías urinarias en niños y adultos, infecciones en pacientes con quemaduras, infecciones intra-abdominales así como una bacteriemia primaria para después se agrave a una septicemia<sup>3,10,11</sup>.

Un trabajo realizado en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, reporta que las características clínicas encontradas en una sepsis neonatal debida a *K. pneumoniae* son fiebre, taquicardia, cambios en la coloración de la piel por la hipoperfusión tisular y alteraciones en el esfuerzo respiratorio. Los resultados de los análisis clínicos muestran leucocitosis, bandemia, trombocitopenia y alteraciones en el equilibrio ácido-base<sup>12</sup>.

## 2.3 Tipos de antibióticos

### Historia de los antibióticos

Como se sabe *K. pneumoniae* es una bacteria patógena bien reconocida, por ello es que se requieren diferentes antibióticos para evitar que produzca más daño.

Un antibiótico, está definido como toda aquella sustancia que elimina o inhibe el crecimiento de un microorganismo<sup>13</sup>.

El descubrimiento de la penicilina se atribuye a Alexander Fleming quien, en septiembre de 1928, observó que el crecimiento de *Staphylococcus aureus* se inhibía ante la presencia del hongo *Penicillium notatum*<sup>14</sup>. Fue hasta el año de 1939 cuando H. Florey y E. Chain lograron aislar de dicho hongo un compuesto ahora conocido como penicilina y lo usaron para tratar con éxito infecciones bacterianas. Desde entonces la penicilina ha sido de gran valor y gracias a ella vidas humanas han sido salvadas<sup>13</sup>.

En aquellos años, a pesar de la gran efectividad de la penicilina, la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos continuó activamente y para el año de 1950 el arsenal antibacteriano de la humanidad contaba ya con tres antibióticos más: la estreptomicina, el cloranfenicol y la tetraciclina<sup>13</sup>.

En paralelo con el descubrimiento de antibióticos naturales, la carrera de los antibióticos obtenidos por síntesis química continuó a través del camino iniciado por las sulfonamidas y sus derivados. La posibilidad de aislar el núcleo químico 6-aminopenicilánico (6-APA) permitió, mediante la incorporación de distintas cadenas laterales, iniciar el largo proceso de las penicilinas semisintéticas que comenzaron la metilicina en 1960 y la ampicilina en 1961<sup>15</sup>.

Como se sabe, los antibióticos tienen diferentes estructuras químicas, lo que conlleva a tener diversos antibióticos como los macrólidos, quinolonas, tetracilinas y  $\beta$ -lactámicos. En este trabajo describimos a los  $\beta$ -lactámicos, ya que se enfocó en la búsqueda de genes que codifican para enzimas que rompen y destruyen su estructura química.

### Antibióticos $\beta$ -lactámicos

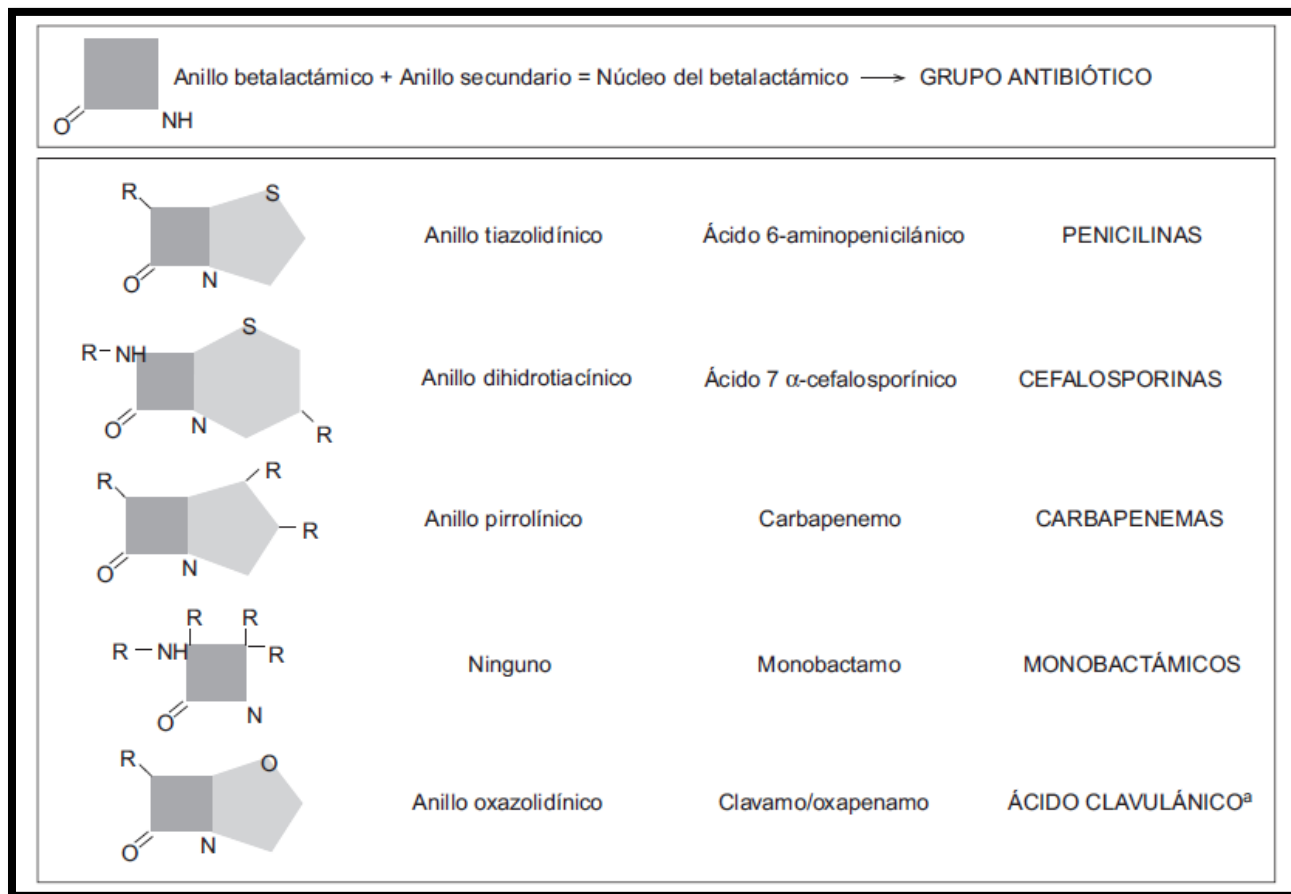
#### ➤ Clasificación y estructura química.

Estos antibióticos tienen un anillo  $\beta$ -lactámico (Figura 3), este determina el mecanismo de acción el cual es la inhibición de la síntesis de la pared celular, tiene poca toxicidad ya que la pared celular no se encuentra en células eucarióticas. Sin embargo para que el  $\beta$ -lactámico sea activo, es importante que esté unido a otros radicales, que por lo general también son anillos<sup>14</sup>.

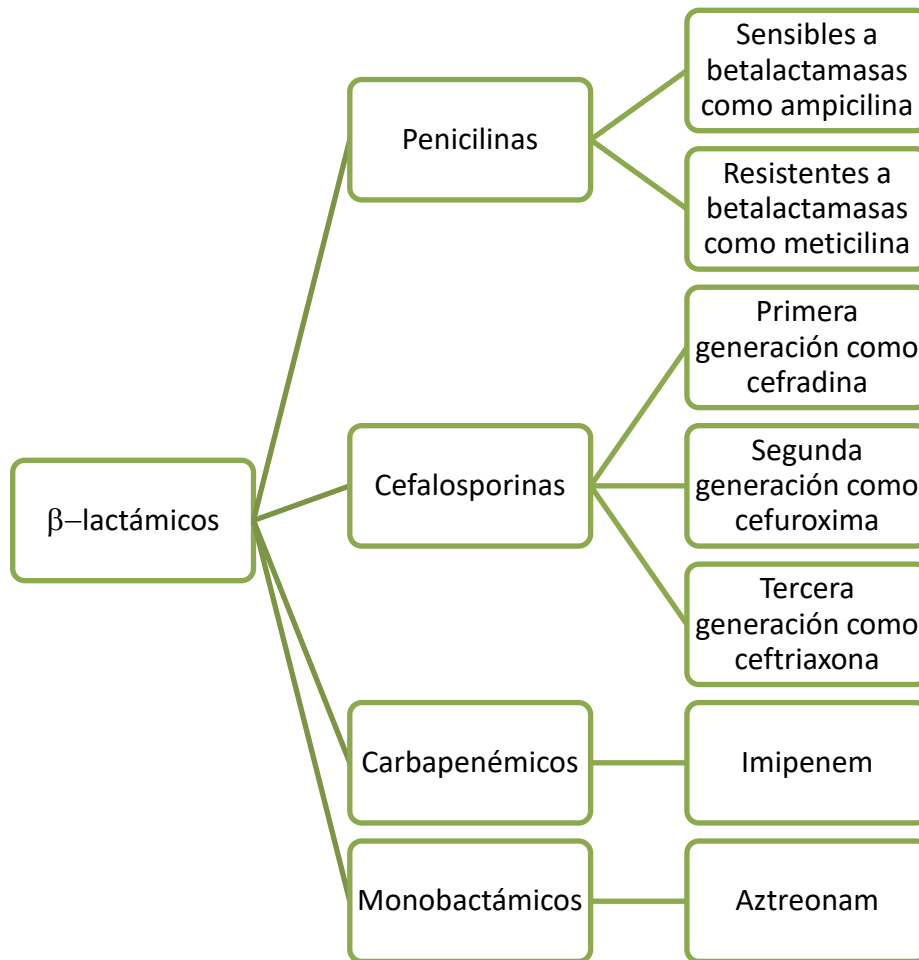
La unión a diferentes estructuras químicas, ya sea cadenas lineales o anillos, modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a diferentes grupos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Figura 3): como son penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas (Cuadro 2).



Figura 3. Estructura química del anillo  $\beta$ -lactámico así como de los diferentes tipos de antibióticos que tienen en su estructura un anillo  $\beta$ -lactámico<sup>14</sup>.



**Cuadro 2. Clasificación de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y ejemplos de cada una de las diferentes clasificaciones<sup>14</sup>.**



➤ Farmacocinética y farmacodinamia de los  $\beta$ -lactámicos.

Tras ser administrados vía intravenosa alcanzan con rapidez concentraciones plasmáticas elevadas, pero la semivida de eliminación de la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos es baja, por lo que se debe administrar varias veces al día<sup>14</sup>.

Las sustancias nativas se absorben poco o nada por vía digestiva ya que el ácido clorhídrico las degrada, la presencia de alimento retrasa y disminuye la absorción, que se produce a la altura de la primera parte del duodeno. La unión a proteínas es variable y sólo la porción libre es activa, tienen una distribución corporal amplia, con concentraciones séricas y tisulares adecuadas en la mayoría de los tejidos, incluidos la bilis y el líquido sinovial; atraviesan sin problemas la barrera placentaria, pero no penetran adecuadamente ni en el sistema nervioso ni en el ojo. Casi no hay metabolismo, se encuentra en su forma activa hasta que es filtrado por el glomérulo y secreción tubular para ser eliminado<sup>14</sup>.

Los  $\beta$ -lactámicos son antibióticos de actividad bactericida lenta independientemente de la concentración que se encuentra en el plasma, hace efecto siempre y cuando sobrepase la concentración inhibitoria mínima (CIM) de la bacteria, un dato importante es que este tipo de antibióticos solo ejercen su actividad cuando los microorganismos están en su fase de crecimiento. En algunos casos al antibiótico se le agrega un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas; que son moléculas con una afinidad elevada contra estas enzimas, su enlace es irreversible y así evitan la inactivación del anillo  $\beta$ -lactámico. Unos ejemplos de estos son el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam<sup>14</sup>.

## Mecanismo de acción de los antibióticos $\beta$ -lactámicos<sup>14</sup>

Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana



Las bacterias gramnegativas tienen una pared más fina, está formada por una membrana externa de lípidos y proteínas, de una capa interna delgada de peptidoglucano.



El peptidoglucano está constituido por largas cadenas por repetición de ácido N- acetilmurámico y N-acetilglucosamina, el ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí y forman una malla, para finalizar la síntesis, pasa de los tetrapéptidos a pentapéptidos con la ayuda de unas enzimas que se llaman transpeptidasas o PBP (proteína ligada a la penicilina).

El anillo  $\beta$ -lactámico presenta una similitud a una parte del pentapéptido y esta parte se une a las enzimas PBP (Proteínas de unión a la penicilina), por ese motivo el antibiótico se une a las enzimas en forma covalente e impide la síntesis de la pared celular.



Inducción de la autólisis bacteriana.



El antibiótico activa una autolisina bacteriana endógena y esta destruye el peptidoglucano.

Sin la pared, la bacteria queda expuesta al medio y entonces muere la bacteria por los cambios de la presión oncótica.



Por eso el antibiótico funciona sólo cuando la bacteria está en fase de crecimiento.

## 2.4 Mecanismos de resistencia

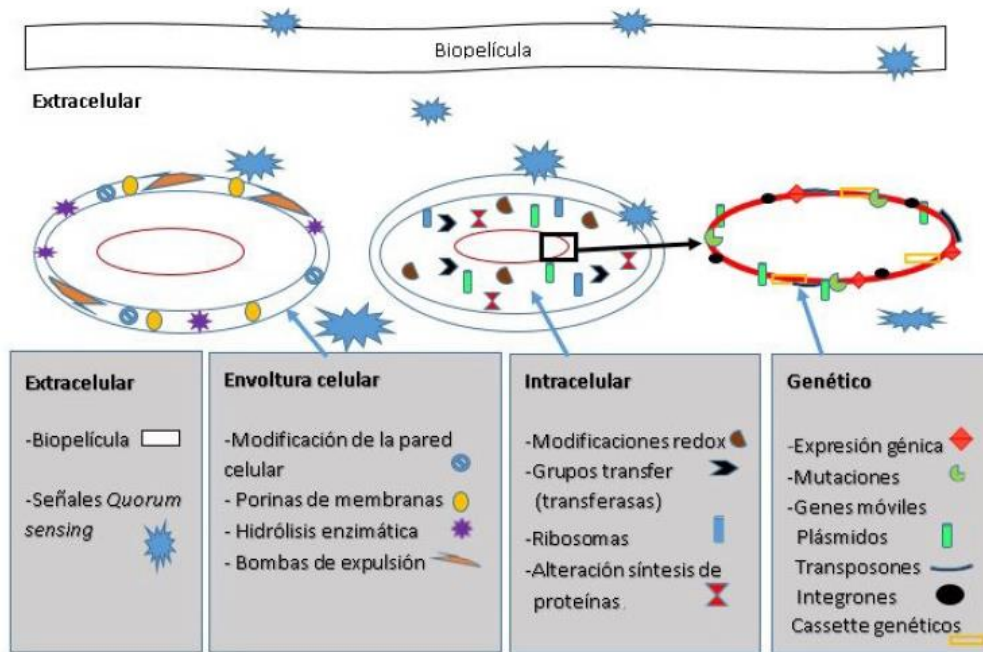
Como se mencionó en el apartado anterior, los antibióticos pueden eliminar o detener la reproducción de una bacteria, sin embargo las bacterias se adaptan a cualquier cambio y crean resistencia a antibióticos.

La resistencia antibiótica se puede definir como lo dice Troncoso: “la capacidad de un microorganismo para sobrevivir en presencia de un compuesto tóxico (antibiótico o antiséptico), permitiendo que las bacterias se multipliquen en presencia del fármaco<sup>16</sup>.”

El incremento de esta resistencia ha sido dado por diversos factores, como la prescripción y la venta no adecuada de antibióticos, la ocupación de estos cuando son enfermedades virales, no concluir un tratamiento (por parte del paciente). La resistencia es un problema a nivel mundial ya que, las bacterias presentan diversos mecanismos de resistencia, agravando la situación puesto que se están terminando las opciones de tratamiento, evitando así, la mejoría de los pacientes<sup>16,17</sup>.

Los diferentes mecanismos empiezan desde la parte extracelular hasta llegar a mutaciones genéticas, enseguida se describen los diferentes tipos (Figura 4).

Figura 4. Mecanismos de resistencia bacteriana con dependencia a su organización estructural y fisiológica<sup>16</sup>.



Se conocen dos tipos de procesos por las que las bacterias consiguen la resistencia, a) natural; como una mutación del gen y que es conocida como transferencia vertical y b) mediante la adquisición de elementos de resistencia de una bacteria a otra y que se llama transferencia horizontal<sup>13</sup>.

## Principales mecanismos:

- ◇ Formación de biopelículas; Son conjuntos de estructuras de células bacterianas, dentro de una matriz extracelular auto sintetizada y hecha de diferentes macromoléculas. Esto favorece a que las bacterias empiecen a reproducirse y secreten una matriz extracelular (formada por diferentes compuestos como polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas), que permite la protección de la célula bacteriana de los factores nocivos para las bacterias. Esta matriz, envuelve a la biopelícula evitando que todos los factores que puedan afectar a las bacterias lo hagan, y también dificulta o impide la acción antibiótica debido a la viscosidad de la capa pegajosa exterior que impide la difusión de estos hacia el interior, este mecanismo es reversible y no es heredado<sup>16</sup>.

En *Klebsiella pneumoniae* uno de sus factores de virulencia es la formación de biopelícula<sup>18</sup>.

- ◇ Sistema quorum sensing (QS); es un mecanismo adoptado por los microorganismos que está en relación con la densidad de población (quorum sensing señal) y se utiliza en comunicaciones célula-célula o por bacterias que se comunican en diferentes fases de crecimiento. Se dice que QS es uno de los principales mecanismos para la producción de biopelícula. Puede estar presente en bacterias de la misma especie o en diferente.<sup>16</sup>
- ◇ Impermeabilidad de membrana; Las bacterias están rodeadas por una envoltura celular y su trabajo es regular el paso de sustancias como nutrientes o moléculas de señalización desde el exterior al interior de la bacteria. Las bacterias gramnegativas está conformada por la pared celular, membrana plasmática y una membrana externa<sup>16</sup>.

Las bacterias al ver que hay una sustancia que las está dañando, ocupan estructuras que se encuentran en su membrana para poder defenderse e inactivar al fármaco, los principales mecanismos en esta categoría son:

**Porinas de membrana;** las porinas son estructuras proteicas y estas regulan la permeabilidad de la membrana externa por medio de canales abiertos al tránsito de agua y esto facilita el transporte pasivo de moléculas hidrofílicas, puesto que selecciona a las moléculas por carga y tamaño, permitiendo la difusión de muchas moléculas, incluyendo los antibióticos. Son más abundantes en las enterobacterias. Cuando estas cambian su funcionalidad evitan la permeabilidad de los antibióticos haciendo que no hagan su efecto antibacteriano<sup>16</sup>.

**Bombas de excreción;** son proteínas de membrana y su función principal es la excreción de sustancias hacia el exterior de la célula, en las gramnegativas se encuentran en el espacio intermembrana. Como tiene la propiedad de eliminar las sustancias de la célula, estas incluyen a los antibióticos, impide tener concentraciones óptimas para su acción y así se genera la resistencia<sup>16</sup>.

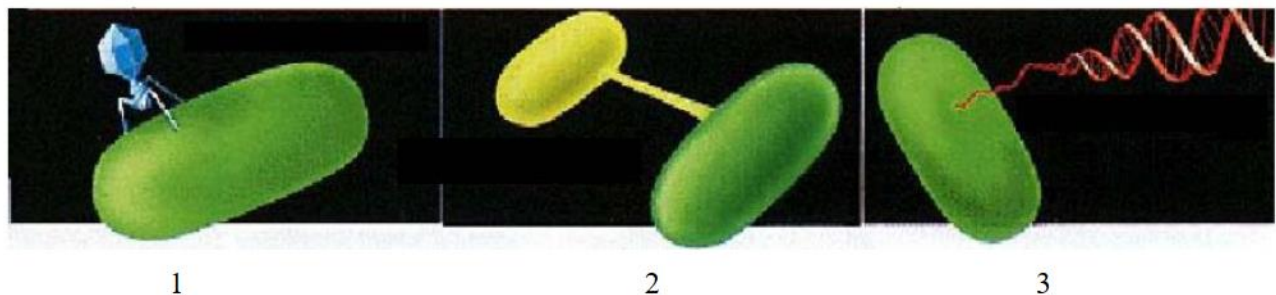
- ◇ Procesos redox; aparte de la resistencia a partir de la envoltura celular, las bacterias hacen su resistencia con mecanismos de resistencia a nivel intracelular. Existen enzimas modificadoras que se llaman grupo transfer o transferasas, otorgan la capacidad de resistencia porque sustituyen químicamente de moléculas resistentes, como son los grupos adenil, fosforil o acetil, se coloquen en la periferia del antibiótico lo que provoca la disminución de la capacidad de unión del fármaco al sitio activo<sup>16</sup>.



- ◇ Sistemas de protección ribosomal; primeramente se dice que el ribosoma es donde se sintetizan las proteínas en la célula, algunos antibióticos atacan la síntesis de proteínas por ese motivo las bacterias a través de proteínas de protección ribosomal (RPP) se resguardan del ataque de la acción de los antibióticos<sup>16</sup>.
- ◇ Modificación del sitio activo; en este mecanismos las bacterias producen sustancias metabólicas que compiten por el sitio activo del fármaco<sup>16</sup>.

Las bacterias tienen un solo cromosoma, lo que las hace susceptibles a que cualquier cambio en él, la bacteria se comporte diferente, por eso hay varios mecanismos de mutación cromosomales, también se da por la activación de un gen<sup>16</sup> o en el intercambio de material genético entre bacterias<sup>17</sup>. Los siguientes son los mecanismos de transferencia horizontal:

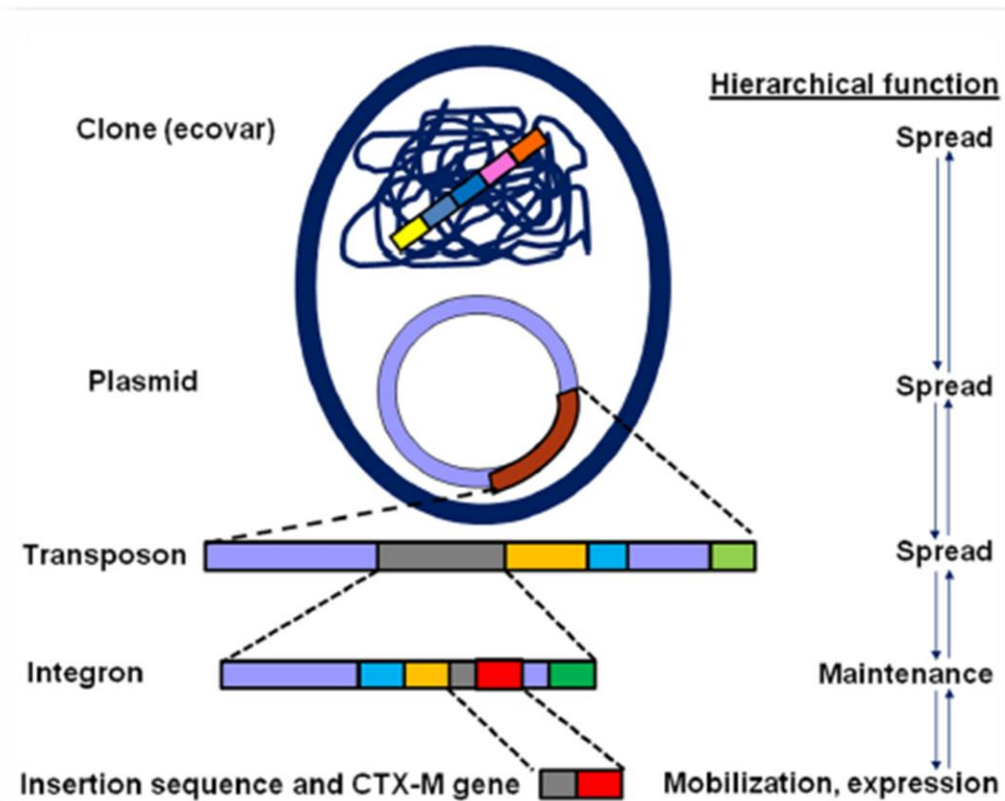
**Figura 5. Mecanismos de transferencia horizontal<sup>19</sup>.**



1. Transducción; transferencia de ADN cromosómico o plasmídico de una bacteria a otra mediante un bacteriófago<sup>17</sup>. Un plásmido son moléculas circulares de ADN de doble cadena(Figura 5 recuadro 1)<sup>20</sup>.
2. Conjugación; intercambio de material genético entre dos bacterias (donante y receptor), a través de una hebra sexual o contacto físico entre ambas (Figura 5 recuadro 2)<sup>17</sup>.

3. Transformación; se puede decir que es una incorporación a una bacteria de ADN libre extracelular procedente de la lisis de otras bacterias, se puede dar por una transposición; movimiento de un transposon (secuencia de ADN móvil que se pueden agregar, ya sea el cromosoma bacteriano o plásmido) puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y otros genes casetes unidos en equipo para expresión de un alguien en particular (integrones), los integrones tienen tres elementos necesarios 1) un gen *intI* que codifica a una integrasa la cual media genes de integración de casete y escisión en sitios de recombinación, 2)un sitio de recombinación *attI* donde se encuentran una gran variedad de genes y 3)un promotor de orientación externa PC-pant capaz de direccionar la transcripción. Hay más de nueve clases (Figura 5 recuadro 3). Es decir, los genes que codifican a las  $\beta$ -lactamasas, están en elementos móviles como casetes, estos a su vez insertados en integrones de clase 1 o clase 3, que por ende están dentro de transposones, los cuales se diseminan en plásmidos conjugativos (Figura 6)<sup>16,17,19,21</sup>.

Figura 6. Ejemplo de una movilización del gen CTX-M por integrones<sup>22</sup>.



Un estudio realizado en Bogotá habla que el primer mecanismo que más ocupan las bacterias es la inactivación de antibióticos por medio de  $\beta$ -lactamasas, seguido por modificación del sitio blanco, en tercer lugar la disminución de la permeabilidad de la pared y por último bombas de flujos<sup>23</sup>.

Para *Klebsiella pneumoniae* el mecanismo de resistencia más importante, es el de los genes que codifican a enzimas que inactivan a los antibióticos, hay varios tipos un ejemplo sería resistencia a las quinolonas pero este trabajo se enfocó en las  $\beta$ -lactamasas que van en contra de los  $\beta$ -lactámicos que se describen a continuación.

## 2.5 Historia y tipos de $\beta$ -lactamasas

Después de que se descubriera la penicilina y se diera como método contra las infecciones, en 1940 se descubrió la resistencia bacteriana cuando Abraham y Chain observaron que en cultivos de *E. coli* inactivaban a la penicilina y ahí es donde se conocen las primeras enzimas, penicilinasas. Las primeras  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se encontraron por primera vez en *Klebsiella pneumoniae*, en Alemania, en 1982, en la actualidad están esparcidas en muchas regiones del mundo y se sabe que hay más de 300 variantes, ahora las que más prevalecen son SHV, TEM y CTX-M<sup>5,9,10,24</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas, son un grupo muy heterogéneo de enzimas que degradan a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, en la actualidad hay más de 700, su estructura está compuesta por hojas  $\beta$ -plegadas y hélices  $\alpha$ , su función la realizan en el espacio periplásmico antes de que llegue el fármaco a su sitio blanco<sup>4</sup>. La familia *Enterobacteriaceae* que son asociadas a IAAS presenta un alta porcentaje para este tipo de mecanismo de resistencia<sup>16</sup>.

El mecanismo de estas enzimas consiste en hidrolizar el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico ya que se une a él con un enlace no covalente y así adiciona una molécula de agua, lo que provoca la hidrólisis del anillo, lo inactiva y este pierde la función de unirse a las proteínas captadoras de penicilina (PBP)<sup>4,25</sup>.

En el grupo de las enzimas importantes se encuentran las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido cuya función es desactivar antibióticos como penicilinas, monobactámicos y cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación, son inhibidas in vitro por el ácido clavulánico y no afectan a las cefamicinas, el segundo grupo de enzimas importantes son las carbapenemasas<sup>4,16</sup>.

Se han descrito dos sistemas de clasificación para estas enzimas; la clasificación de Ambler que apareció en 1980 y se basa en la estructura molecular y la secuencia de aminoácidos (aa) de las enzimas; los grupos A, C y D tienen en su estructura el aa serina y se llaman por eso serina- $\beta$ -lactamasa, los antibióticos a los que atacan son las penicilinas, cefalosporinas y oxacilina respectivamente. El grupo B se denominan como metalo- $\beta$ -lactamasa (metaloenzima es una enzima que utiliza como cofactor un ion metálico y está fuertemente retenido) y se diferencia porque utiliza un cofactor (el ion zinc), los antibióticos sobre los que ejerce su función son penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos pero no sobre los monobactámicos<sup>4</sup>.

La clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros surgió en 1995, se basa en las similitudes de la función de las enzimas, la afinidad de las enzimas por diferentes sustratos o en qué tanto son inhibidas por el ácido clavulánico<sup>4</sup>.

Dentro de todas las  $\beta$ -lactamasas, las que destacan por su interés médico son:

- 1)  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE); grupos 2be, 2ber y 2de.
- 2)  $\beta$ -lactamasas resistentes a inhibidores; grupo 2br
- 3)  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC; grupo 1
- 4) Carbapenemasas; grupo 2f, 2df y 3<sup>26</sup>.

Hay diversos genes que codifican enzimas contra varios antibióticos, nos enfocaremos en las que se analizaron en este trabajo.

- \* TEM: es una BLEE, clasificada como clase A, es mediada por plásmidos, a través de transposones e integrones. Se descubrió en Alemania en 1960, a partir de una cepa de *E. coli*, aislada de una paciente griega llamada Temoniera, lo que originó su nombre TEM. Hay variaciones en los genes porque cambian un aa, lo que provoca que haya *bla*TEM-1, *bla*TEM-2 y así sucesivamente. Se han detectado aproximadamente 75 mutaciones para esta enzima, lo que hace que existan diferentes fenotipos. Es capaz de hidrolizar a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera generación<sup>4,22,25,27,28</sup>.
- \* SHV; es transferible por el cromosoma o por un plásmido, está clasificada en clase A, su nombre viene de las propiedades bioquímicas de la enzima (sulfhydryl variable) SHV-2. Fue la primera BLEE en aislarse en 1983 en Alemania a partir de una cepa de *Klebsiella ozaenae* su nombre fue SHV-2, SHV-1 es responsable de más del 20% de la resistencia a la ampicilina. La mayoría de las variantes de esta cepa tiene un fenotipo que es caracterizado por la sustitución de una serina por una glicina en la posición 238 de su cadena polipeptídica. En México, la variante que más se encuentra en *K. pneumoniae* es SHV-5<sup>5,22,25,27,29,30</sup>.
- \* OXA; su nombre es oxacilin-hidrólisis- $\beta$ -lactamasa, OXA-48 fue aislada en Turquía, Israel y otros países del Mediterráneo, es de la clase D, confiere resistencia a la ampicilina y cefalotina, tiene una alta actividad de hidrolizar a oxacilina y cloxacilinas, pero pueden ser inhibida por el ácido clavulánico. Se menciona en la literatura, que si está junto a una enzima que puede hidrolizar carbapenémicos, la bacteria puede tener resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos<sup>27,31,32,33</sup>.

Se adquiere por transferencia horizontal, ya sea de información cromosómica que existe en el genoma y que sólo requiere activarse o por plásmido<sup>34</sup>.

- \* CTX-M; su nombre largo es cefotaximasas, ya que tiene gran actividad contra cefotaxima. Se descubrió en 1989, de un aislamiento de *E. coli*, está en el grupo de BLEE y es clase A. Fue encontrada en Sudamérica y Europa, hay varios tipos como CTX-M-27, CTX-M-28, CTXM-15, CTX-M-16, puede ser transferida por plásmidos conjugativos, que estos portan transposones donde el gen está inserto, los genes portadores son IS, In y Tn, procedente de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas del género *Kluyvera sp*, pero también está relacionado con el cromosoma AmpC, la variante CTX-M-2 fue detectada en Argentina en 1990, en un aislamiento de *Salmonella spp*. Puede hidrolizar las cefalosporinas de la tercera y cuarta generación, monobactámicos pero no cefamicinas ni carbapenémicos<sup>9,22,25,26,30,31,35-38</sup>.
- \* IMP; su nombre es Imipenem hidrólisis  $\beta$ -lactamasa, es una metalo- $\beta$ -lactamasa clase B, de grupo 3. Es transferible por un plásmido que tiene un integrón con el gen, hasta el momento se han encontrado más de 29 variaciones, se encuentra más comúnmente en *Pseudomonas aeruginosa*<sup>26,33</sup>.
- \* VIM; es una carbapenemasa; se adquiere por integrones de clase 1, se identificó en *Pseudomonas aeruginosa*, en 1997 en Italia y es clase B. Su nombre es Verona integron-codificado metalo- $\beta$ -lactamasa, se han encontrado menos de 27 variantes<sup>26,33,39</sup>.

- \* KPC; se aisló en 1996, de una cepa de *K. pneumoniae* por eso su nombre (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa), en un hospital de Carolina del Norte. Es una serina-carbapenemasa clase A, su diseminación se asocia por clones, mediada por plásmidos en el transposón Tn 4401, se da por transferencia horizontal<sup>4,33,35,37,39,40</sup>.
- \* GES; su nombre largo es  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido Guiana, es una enzima que fue descubierta en Francia, en *K. pneumoniae* aislada de una paciente femenina hospitalizada en la ciudad de Guiana, Francia. De acuerdo a Bush y Jacoby esa enzima pertenece al grupo 2f, y de acuerdo a Ambler es clase A. Tiene cerca de 26 variantes, su actividad contra los carbapenémicos está en aumento, hidroliza fácilmente penicilinas y cefalosporinas. Es mediada por plásmidos o enzimas de clase A asociadas a integrón<sup>22,26,31,41</sup>.
- \* PER; fue encontrada en Turquía (PER 1) y en Sudamérica (PER-2), tiene homología con las BLEE en 25 al 27%, hidroliza fácilmente penicilina y cefalosporinas, es sensible a la inhibición del ácido clavulánico<sup>31,36</sup>.
- \* VEB; VEB-1 fue encontrada en Vietnam y Tailandia, es mediada por plásmidos o enzimas de clase A asociadas a integrón, confiere resistencia a ceftazidima, cefotaxina y aztreonam<sup>22,26,31</sup>.
- \* SME; es una serina-carbapenemasa, se identificó en 1982 en un aislamiento de *Serratia marcescens* en Londres, por ese motivo su nombre es SME, existen al menos 3 variantes, hidroliza carbapenémicos donde incluye al aztreonam, no son inhibidas por el EDTA pero si es inhibida parcialmente por tazobactam<sup>4,26</sup>.
- \* IMI; se descubre en 1984 en el sur de California, en un aislamiento de *Enterobacter cloacae* y es una serina-carbapenemasa, se transfiere por plásmidos o codificado por el cromosoma, es clase A<sup>4,42,43</sup>.



- \* GIM; es una metalo- $\beta$ -lactamasa, los genes móviles se encuentra en forma de casetes genéticos en integron clase 1, su localización está en plásmido o cromosoma, es clase B, su nombre es German imipenemasa-1, fue descubierta en *Pseudomonas aeruginosa*, en Dusseldorf en 2002<sup>19,44,45,46</sup>.
- \* SIM; es una metalo-- $\beta$ -lactamasa, se puede transferir por casetes, fue identificada en *Acinetobacter spp.*, de Corea del Sur en 2005, puede transferirse por plásmidos pero también es parte del cromosoma<sup>44,45,47</sup>.
- \* NDM; es transferible por un plásmido, su nombre es Nueva Dheli metalo-carbapenemasa y se describió en 2008 en Suecia en una cepa de *K. pneumoniae* que se adquirió en Nueva Dheli, India; en la clasificación de Ambler es clase B, la vía más cómoda para transferirse es la transferencia horizontal, su dispersión de esta enzima se debe principalmente a los plásmidos, integrones, secuencia de inserción, la cual su región común es ISCR y brotes clonales, no sé une tan fuertemente a los carbapenémicos, no hidroliza el aztreonam<sup>5,33,45,48</sup>.
- \* SPM; es una metalo-carbapenemasa, pertenece a la clase B, se relaciona a casetes en el integron clase 1 y se transfiere por plásmido, su nombre viene de Sao Paulo metalo-  $\beta$ -lactamasa<sup>19,44,49,50</sup>.

La resistencia a los aminoglucósidos que presenta las BLEE se dice que puede ser dada por la expresión de enzimas modificantes tipo N-6'-acetiltransferasas y N-2'-nucleotiditransferasas<sup>29</sup>. Los genes que codifican para metalo- $\beta$ -lactamasas hidrolizan muchos antibióticos, entre ellos están los de espectro extendido como cefotaxima, o carbapenems como el imipenem, una factor importante es que no hidrolizan aztreonam, pero su actividad no es inhibida por el ácido clavulánico; pero si son inhibidas por quelantes de cationes como el EDTA<sup>21</sup>. Pertenecen al grupo 2b de la clasificación de Bush y Jacoby<sup>8</sup>. Las BLEEs se encuentran en plásmidos conjugativos lo que hace más fácil la diseminación de este mecanismo, incluso entre cepas que no sean de la misma especie, sin embargo también puede generarse por trasposones o integrones<sup>27</sup>.

Las carbapenemasas SME e IMI tienen la capacidad de hidrolizar las amino-carboxi-penicilinas como cefalotina, imipenem y aztreonam, su actividad es inhibida parcialmente por el ácido clavulánico<sup>4</sup>.

Las enzimas IMP y VIM hidrolizan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos menos el aztreonam y no se inhiben por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, pero si se inhiben por agentes quelantes como el EDTA<sup>26</sup>.

Se ha detectado a nivel mundial que *Klebsiella pneumoniae* adquiere con facilidad a las  $\beta$ -lactamasas de clase B y clase A<sup>39</sup>, los genes de mayor frecuencia son *bla*NDM-1, *bla*VIM-2, *bla*KPC-2, *bla*OXA-048, *bla*SHV-5, *bla*TEM-1 y *bla*CTX-M, por lo que se sabe que están dando más resistencia a los antibióticos carbapenémicos<sup>9,10,23,32,33,39,51</sup>.

## 2.6 Epidemiología de *Klebsiella pneumoniae*

La organización mundial de la salud (OMS) publicó la lista de las bacterias con mayor resistencia a los antibióticos, puesto que este problema se ha incrementado mucho en los últimos tiempos: Desde el 2014, *Klebsiella pneumoniae* ha sido catalogada como una de las primeras bacterias de interés internacional por su alta resistencia a los antibióticos. En México, como productora de BLEE; tiene una prevalencia de 71.4%<sup>52</sup>, en la actualidad la OMS la tiene catalogada como de situación crítica por su multirresistencia a antibióticos en especial a carbapenémicos y cefalosporinas, lo que ocasiona que los pacientes reciban sólo tratamientos con tigeciclina o colistina, los cuales son poco efectivos y tóxicos. Estas bacterias multirresistentes son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos, tiene una prevalencia de mortalidad de 40 al 50% de los pacientes<sup>5,10,17,35,53,54</sup>.

Como bacteria de estudio ha progresado a un problema endémico y en IAAS especialmente en unidad neonatal y en particular es el patógeno más común para una sepsis neonatal<sup>55,56,57</sup>, con una prevalencia del 63.24% entre la UCI neonatal (UCIN) y pediátrica (UCIP) en Túnez en 2014, en India el 97% de las infecciones en sangre en la UCIN y UCIP fue producida por *K. pneumoniae* resistente a BLEE en 2016 causando muerte, 72% de los aislados de *K. pneumoniae* en el área de neonatología fueron resistentes a ertapenem y 65% resistencia a meropenem e imipenem en Venezuela 2016<sup>9,39,57</sup>.

En un trabajo realizado en el Hospital Infantil de México Federico Gómez en 2015 se encontró que el área que tiene el mayor número de aislamientos de *Enterobacteriaceae* con resistencia a las BLEE's fue la unidad de cuidados intensivos neonatales<sup>27</sup>. Otro trabajo en el 2016 reveló que el 75% de los aislamientos en la UCIN corresponden a *Klebsiella pneumoniae*<sup>12</sup>, que da como finalidad el interés del estudio de su ADN.

## **2.7 Fundamento de la extracción de ADN**

Para su estudio, los ácidos nucleicos deben aislarse del resto de los componentes celulares, como lípidos y proteínas, más abundantes que los ácidos nucleicos. Para este procedimiento ya existen estuches comerciales, sin embargo, todos se basan en las mismas características físicas y químicas de DNA<sup>58</sup>.

1. El primer paso es la lisis de las células y liberación del ADN para esto se utiliza algún detergente como el docedil sulfato sódico.
2. Extracción de proteínas y lípidos con solventes orgánicos, se utiliza fenol-cloroformo esta solución desnaturaliza las proteínas (entre ellas las nucleasas) y mantiene la separación de la fase orgánica y acuosa tras la centrifugación de la muestra. El DNA se encuentra en la fase acuosa.
3. Precipitación de DNA: Se utiliza alcohol absoluto como isopropanol o etílico, ya que los ácidos nucleicos son insolubles en estos líquidos.
4. Lavado de DNA: este se lava con etanol al 70%, el contenido de alcohol de esta solución mantiene al ADN precipitado y el H<sub>2</sub>O permite la solución de las sales presentes.
5. Después de eliminar el exceso de alcohol, el ADN se disuelve en soluciones que aseguren su estabilidad<sup>58</sup>.

## 2.8 Reacción en cadena de la polimerasa

Esta técnica se basa en una replicación exponencial *in vitro* de una molécula de ADN genómico (ADNg) o ADN complementario (ADNc), mediante ciclos repetitivos, que constan de tres temperaturas. En cada uno de los ciclos las moléculas se duplican hasta que los reactivos se agotan. La longitud del producto amplificado la delimitan los iniciadores, también llamados *primers* u *oligonucleótidos*, de cuyo diseño adecuado depende del éxito de la PCR. Los iniciadores deben ser específicos, no formar estructuras secundarias entre ellos ni hibridaciones inespecíficas entre ellos u otra parte de la cadena<sup>58</sup>.

La amplificación *in vitro* de la PCR se apega a las mismas reglas de la replicación, esto es, se basa en una secuencia que le sirve de molde y, por complementariedad, sintetiza la cadena antiparalela. También, la síntesis de la cadena sigue la dirección 5'-3', ya que requiere de un nucleótido con el extremo 3' libre que proporcione el grupo OH para la adición del siguiente nucleótido, con lo que se forma el enlace fosfodiéster. Para que se lleve a cabo la PCR se requiere:

- ADN polimerasa: La Taq ADN polimerasa es la enzima más empleada para la PCR, tiene como función polimerizar una nueva cadena de ADN tomado como molde otra ya existente. Debido a que en cada ciclo de la PCR se lleva la mezcla de reacción a temperaturas de 95°C, se requiere de una ADN polimerasa capaz de soportar dichas temperaturas.
- ADN molde: es una secuencia que sirve de molde para la amplificación, ya sea de ADN o ADN genómico. El ADN se puede obtener de cualquier muestra biológica.

- Desoxinucleótidos: para que la polimerasa lleve a cabo su función necesita que existan desoxinucleótidos (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en la mezcla de reacción para poder sintetizar la nueva hebra del ADN.
- Amortiguador: proporciona el pH y concentraciones de sales adecuadas para la correcta función de la ADN polimerasa.
- Cloruro de magnesio: actúa como cofactor de la ADN polimerasa y se suplementa a una concentración de entre 1.0 y 1.5 mM.
- Iniciadores: son oligonucleótidos con secuencia específica, se utilizan para reconocer por complementariedad secuencias blanco en el ADN molde<sup>58</sup>.

#### -Esquema de la PCR

La PCR se realiza en un termociclador el cual es capaz de cambiar la temperatura de la muestra en cuestión de segundos, lo que por lo general se logra mediante calentamiento/enfriamiento por resistencia eléctrica de una placa metálica, que distribuye la temperatura de manera homogénea durante tiempo programados en el rango de segundos a minutos, los pasos de la PCR son<sup>59</sup>.

1. Inicio de la desnaturalización: temperatura 95°C para desnaturalizar la doble cadena de ADN.
2. Ciclos de amplificación:
  - temperatura de desnaturalización: se realiza a 95°C y tiene como objetivo desnaturalizar la doble cadena de ADN y/o destruir las estructuras secundarias de ADN.
  - temperatura de alineamiento: la temperatura se encuentra en un rango de 55 y 60°C, en el cual la mayoría de los iniciadores hibridan; esto es, se genera la energía cinética

necesaria para que los iniciadores busquen en las cadenas de ADN su secuencia complementaria y formen los puentes de hidrógeno con la cadena molde.

-temperatura de extensión: se produce a la temperatura óptima para el funcionamiento de la ADN polimerasa empleada, por lo que dependerá ésta para la PCR. En el caso de la Taq polimerasa, la más utilizada es de 72°C. Este ciclo de temperatura se repite continuamente por 30 a 35 ocasiones.

3. Amplificación final: una vez terminados los ciclos designados para la PCR, la temperatura de extensión (72°C) se mantiene por cinco minutos, lo que permite que la polimerasa termine la extensión de los productos a los cuales se encuentra unida.
4. Almacenamiento temporal: es un ciclo final a 4°C por varias horas, lo que permite conservar los productos de PCR hasta que se retiren los tubos de reacción del equipo<sup>59</sup>.

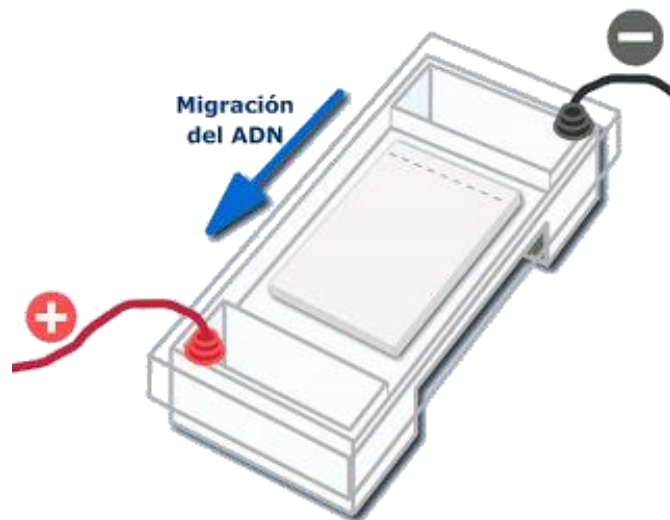
Hay varias modalidades de la técnica de PCR como la convencional, cualitativa, semicuantitativa, cuantitativa, punto final o tiempo real, sin embargo; en este proyecto se realizará la PCR múltiple. En este tipo de PCR, se realiza la amplificación de más de un fragmento de ADN en una sola reacción de PCR con dos o más juegos de primers (cada juego para un gen en particular). Se emplea para la búsqueda de varias detecciones, mutaciones y polimorfismos en un solo gen o en múltiples<sup>58,59</sup>.

## 2.9 Electroforesis

Incluye las técnicas de separación que implican la separación en un campo eléctrico de partículas cargadas, es decir, la mayoría de las biomoléculas poseen una carga eléctrica cuya magnitud depende del pH del medio en el que se encuentran; como consecuencia, pueden desplazarse cuando se ven sometidas a un campo eléctrico hacia el polo de carga opuesta a la de la molécula a través de una matriz porosa (Figura 7)<sup>58,60</sup>.

Los ácidos nucleicos poseen una carga negativa por el esqueleto de fosfatos que tiene, entonces en una electroforesis migrarán hacia el polo positivo, es decir el ánodo<sup>58</sup>.

**Figura 7. Esquema de la cámara de una electroforesis con un gel de agarosa que contiene las muestras<sup>60</sup>.**





Elementos que lleva una electroforesis:

- ◆ Cámara de electroforesis; es un dispositivo que permite la generación de un campo eléctrico alrededor de un gel donde se depositan las muestras.
- ◆ Gel; es para colocar las muestras para que tengan un soporte en la separación y evitar perturbaciones. Comúnmente son de agarosa pero pueden ser de acrilamida.
- ◆ Buffer de corrimiento; proporciona el medio para la transmisión de la corriente eléctrica y mantiene el pH sin variaciones mientras se realiza el corrimiento.
- ◆ Marcador de peso molecular; son moléculas de ADN o proteínas que permiten determinar por comparación el tamaño de los fragmentos de ácidos nucleicos o proteínas contenidos en las muestras sometidas a electroforesis. Pueden ser de 100 pb o 1000 pb.
- ◆ Buffer de carga; tiene como fin brindar peso, densidad y color a la muestra, lo que facilita su depósito en el pocillo y evita su salida del gel.
- ◆ Transiluminador UV; transmite luz del espectro UV a través de la muestra, excitando la molécula cromogénica que emite energía fluorescente que permite visualizar<sup>58</sup>.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a la OMS, *Klebsiella pneumoniae* es una bacteria en situación crítica porque es de las bacterias que tiene más resistencia a los antibióticos, en especial a los carbapenémicos y cefalosporinas.

Se ha encontrado que con frecuencia presenta los genes *bla*NDM-1, *bla*VIM-2, *bla*KPC-2, *bla*OXA-048, *bla*SHV, *bla*TEM y *bla*CTX-M que codifican a varios tipos de  $\beta$ -lactamasas, lo que provoca el rompimiento de la estructura del antibiótico por lo que los hace inactivos. Por sus características de resistencia y virulencia, *Klebsiella pneumoniae* está infectando a los pacientes más delicados, es decir, a los que están susceptibles, inmunocomprometidos o inmunosuprimidos, ya que mayormente se ha aislado en la unidad de cuidados intensivos, en pacientes con ventiladores y sobre todo en niños y neonatos.

Debido a lo anterior, se consideró necesario conocer las características genéticas relacionadas con resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos de cepas de *K. pneumoniae* aisladas de neonatos del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG). Identificar cuál o cuáles son los genes codificantes de enzimas  $\beta$ -lactamasas presentes en nuestro entorno hospitalario, podría ser un apoyo en la elección de tratamientos con miras a la mejora de la salud del neonato.

Por lo anterior nos planteamos la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son los genes que codifican enzimas  $\beta$ -lactamasas que se encuentran en mayor frecuencia en las cepas de *Klebsiella pneumoniae*?

## HIPÓTESIS

Tomando en cuenta que *Klebsiella pneumoniae* es una bacteria resistente a una gran variedad de antibióticos, incluyendo carbapenémicos y cefalosporinas, suponemos que habrá mayor frecuencia en los genes de *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M, *bla*OXA-048, *bla*KPC-2, *bla*NDM-1 y *bla*VIM-2.

# OBJETIVOS

- **General**

Identificar qué tipo de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos tienen las cepas de *Klebsiella pneumoniae* obtenidas de pacientes hospitalizados de la UCIN y diagnosticados con IAAS, en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

- **Específicos**

-Realizar la extracción de DNA con el estuche comercial (Promega) de la bacteria *Klebsiella pneumoniae*.

-Determinar por el método de PCR multiplex, los genes que codifican para las enzimas  $\beta$ -lactamasas producidas por la bacteria *Klebsiella pneumoniae*.

-Observar el resultado de la PCR multiplex a través de una electroforesis.

-Determinar la frecuencia del tipo de gen que se encuentra en las cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 6.1 Diseño

Se llevó a cabo un estudio observacional, prolectivo, transversal y descriptivo.

## 6.2 Universo

El estudio se llevó a cabo con 96 cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas durante el periodo de 1 de enero del 2015 al 31 de diciembre del 2016 y provenientes de pacientes neonatos del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

- \* Criterios de inclusión

- Cepas que estén identificadas como *K. pneumoniae*.

- Cepas aisladas en caldo de la sala neonatal de HIMFG.

- \* Criterios de exclusión

- Cepas no identificadas como *K. pneumoniae*

- Cepas que al sembrar tengan alguna contaminación de otra bacteria o/y hongo.

- Cepas que no tengan la morfología colonial que caracteriza a *K. pneumoniae*.

- Cepas que al realizar pruebas bioquímicas no concuerden con *K. pneumoniae*.

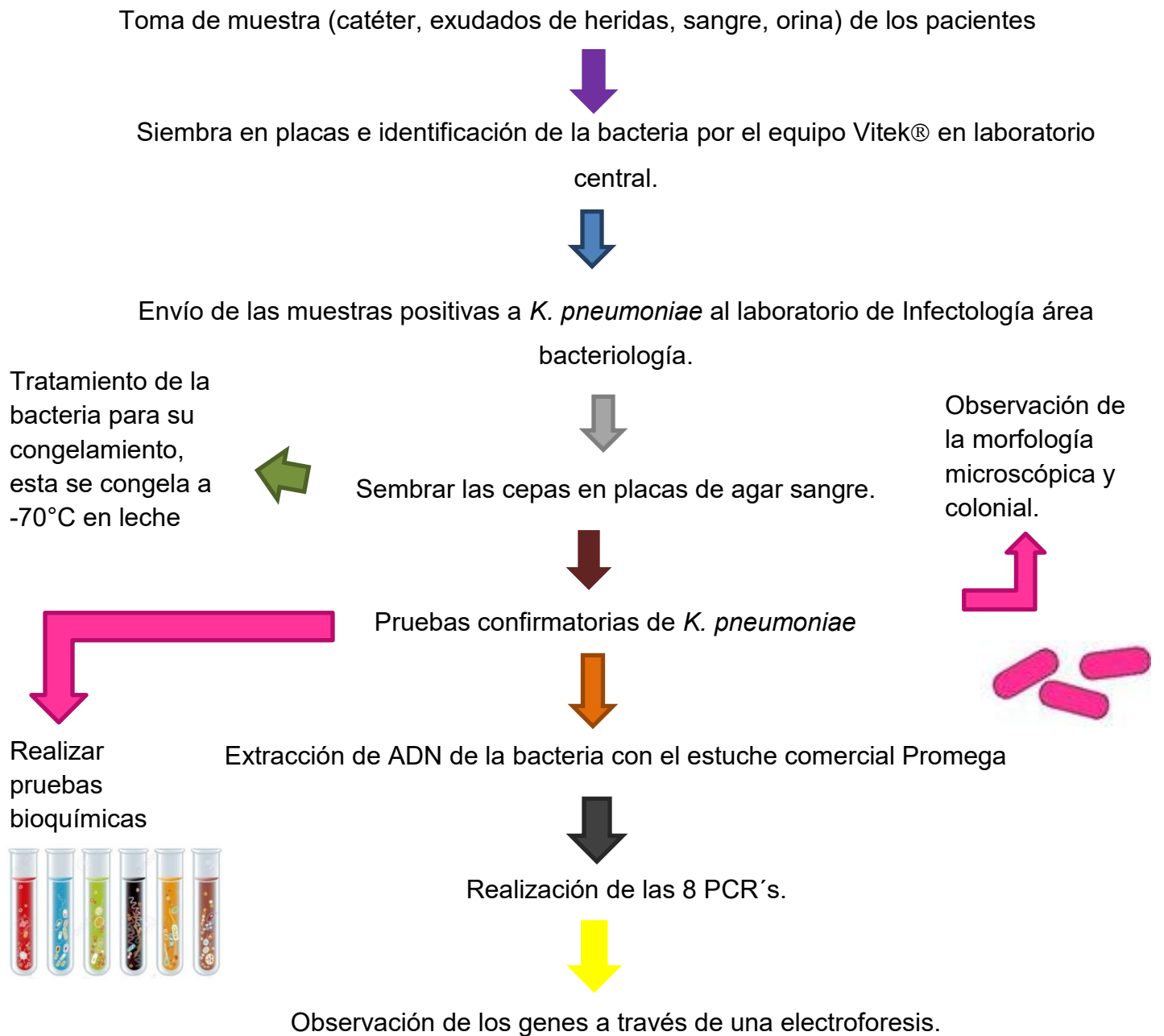
## 6.3 Variables

Independiente: cepa de *Klebsiella pneumoniae*.

Dependiente: Gen encontrado mediante la técnica de PCR.

## 6.4 Técnicas

Esquema General del trabajo realizado.



## Extracción de ADN

### Material

- Agar sangre
- Estuche comercial de extracción de ADN marca Promega Wizard Genomic DNA purification
- Tubos Eppendorf
- Microcentrífuga

### Método

1. Sembrar cada una de las cepas de *K. pneumoniae* en agar sangre y dejar encubar durante 24 horas.
2. Después de las 24 horas, añadir 1 mL de solución de lisis a un tubo Eppendorf y con un asa bacteriológica tomar colonias aisladas y colocarlas en la solución, agitar vigorosamente.
3. Centrifugar por 3 minutos a 10000 rpm (revoluciones por minuto) y tirar el sobrenadante, resuspender el botón y agregar otro mL de solución de lisis.
4. Centrifugar y tirar el sobrenadante, ahora colocar 600  $\mu$ L de solución de lisis de núcleos.
5. Incubar por 5 minutos a 80°C, entonces dejar enfriar a temperatura ambiente.
6. Añadir 3  $\mu$ L de solución de RNasas. Mezclar e incubar a 37°C por 15-16 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente.
7. Añadir 200  $\mu$ L de solución de precipitación de proteínas, Mezclar vigorosamente durante 10-15 segundos.

8. Incubar en hielo por 5 minutos.
9. Centrifugar a 10000 rpm por 3 minutos.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio que contenga 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar.
11. Centrifugar como en el paso 9 y decantar el sobrenadante.
12. Añadir 600  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% a temperatura ambiente y mezclar.
13. Centrifugar por 2 minutos a 10000 rpm.
14. Aspirar el etanol y secar el botón.
15. Rehidratar el ADN en 100  $\mu\text{L}$  de solución de rehidratación por 1 hora a 65°C o toda la noche a 4°C.



**Cuadro 3. Especificaciones de las 8 PCR múltiplex realizadas para la identificación de genes que codifican para enzimas  $\beta$ -lactamasas.**

PCR	Gen	Secuencia (5' → 3')	TA	T*	Referencia
1	<i>bla</i> TEM-SO	F: CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT C R: CGT TCA TCC ATA GTT GCC TGA C	800 pb	60°C	<sup>61</sup> Dallene, et al. 2010
	<i>bla</i> SHV-SO	F: AGC CGC TTG AGC AAA TTA AAC R: ATC CCG CAG ATA AAT CAC CAC	713 pb		
	<i>bla</i> OXA-SO	F: GGC ACC AGA TTC AAC TTT CAA G R: GAC CCC AAG TTT CCT GTA AGT G	564 pb		
2	<i>bla</i> CTXMGp1	F: TTA GGA ART GTG CCG CTG YA R: CGA TAT CGT TGG TGG TR*C CAT	688 pb	60°C	
	<i>bla</i> CTXMGp2	F: CGT TAA CGG CAC GAT GAC	404 pb		
	<i>bla</i> CTXMGp9	F: TCA AGC CTG CCG ATC TGGT R: TGA TTC TCG CCG CTG AAG	561 pb		
	<i>bla</i> CTXMGp8/25	F: AAC R*CR* CAG ACG CTC TAC R: TCG AGC CGG AA5GTG TYAT	326 pb		
	<i>bla</i> IMP	F: TTG ACA CTC CAT TTA CDG R: GAT YGA GAA TTA AGC CAC YCT	139 pb		55°C
	<i>bla</i> VIM	F: GAT GGT GTT TGG TCG CAT A R: CGA ATG CGC AGC ACC AG	390 pb		
	<i>bla</i> KPC	F: CAT TCA AGG GCT TTC TTG CTG C R: ACG ACG GCA TAG TCA TTT CG	538 pb		
4	<i>bla</i> GES-1,9,11	F: AGT CGG CTA GAC CGG AAA G R: TTT GTC CGT GCT CAG GAT	399 pb	57°C	
	<i>bla</i> PER – 1y3	F: GCT CCG ATA ATG AAA GCG T	520 pb		

---

		R: TTC GGC TTG ACT CGG CTG A			
	<i>bla</i> VEB-1,6	F: CAT TTC CGG ATG CAA AGC GT	648 pb		
		R: CGA AGT TTC TTT GGA CTC TG			
<b>5</b>	<i>bla</i> SME-GAM	F: GAG GAA GAC TTT GAT GGG AGGAT	334 pb	60°C	<sup>44</sup> Voets, et al.
		R: TCC CCT CAG GAC CGC CAA G			2011
	<i>bla</i> IMI-GS	F: GGT GTC TAC GCT TTA GAC ACT	536 pb		
		GGC TC			
		R: GCA CGA ATA CGC GCT GCA CCG G			
<b>6</b>	<i>bla</i> GIM-GBM	F: CGT TGC CAG CTT TAG CTC AGG	279 pb	58°C	
		R: GCA ACT TGA TAC CAG CAG TGC G			
	<i>bla</i> SIM-GBM	F: TTG CGG AAG AAG CCC AGC CAG	613 pb	61°C	
		R: GCG TCT CCG ATT TCA CTG TGG C			
	<i>bla</i> NDM-GBM	F: CCC GGC CAC ACC AGT GAC A	129 pb	60°C	
		R: GTA GTG CTC AGT GTC GGC AT			
	<i>bla</i> SPM-GBM	F: GGG TGG CTA AGA CTATGA AGC C	447 pb		
		R: GCC GCC GAG CTG AAT CGG			
<b>7</b>	<i>bla</i> O23-GDM	F: CCT GAT CGG ATT GGA GAA CCA G	516 pb	59°C	
		R: GAT GCC GGC ATT TCT GAC CG			
	<i>bla</i> O24-GDM	F: GGT CGA TAA TTT TTG GTT AGT	237 pb		
		TGG CCC			
		R: CCA TTA GCT TGC TCC ACC CAA			
		CCA			
	<i>bla</i> O48-GDM	F: CCA AGC ATT TTT ACC CGC ATC	389 pb		
		KAC C			
		R: GYT TGA CCA TAC GCT GRCT GC G			
<b>8</b>	<i>bla</i> O1-GD2M	F: CAA CGG ATT AAC AGA AGC ATG	198 pb	60°C	
		GCT CG			
		R: GCT GTR* AAT CCT GCA CCA GTT			
		TTC CC			

---

---

<i>blaO2</i> -GD2M	F: GAC CAA GAT TTG CGA TCA GCA	256 pb
	ATG CG	
	R: CYT TGA CCA ABC GCT GAT GTT	
	CYA CC	
<i>blaO51</i> -GD2M	F: GAC CGA GTA TGT ACC TGC TTC	497 pb
	GAC C	
	R: GAG GCT GAA CAA CCC ATC CAG	
	TTA ACC	

---

AT: tamaño de amplicón

pb: pares de bases

T\*: temperatura de alineamiento

Secuencia:

F: forward

R: reverse

A: adenina, G: guanina, C: citosina, T: timina

Y: TC (pirimidina)

R\*: GA (purina)

D: GAT (cualquier excepto C)

K: GT (ceto)

## Material

- Termociclador Axygen Modelo: Maxygen II
- Master mix Marca Promega: sus componentes son 50 unidades/mL de *Taq* DNA polimerasa que se encuentra en un buffer a pH 8.5, 400 $\mu$ M de cada uno de dATP, dGTP, dCTP y dTTP, así como 3 mM de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>).
- Primers de cada una de la diez PCR.
- Tubos eppendorf de 0.5 mL
- Pipetas semiautomáticas de 0.5 – 10  $\mu$ L, 5 - 50  $\mu$ L y de 10 – 100  $\mu$ L.

## Procedimiento:

1. Hacer una mezcla que contenga master mix, agua, los primers correspondientes a cada PCR (Cuadro 3), los cálculos se hacen dependiendo el número de muestras y se realiza para que cada reacción individual sea de 25  $\mu$ L.
2. Se divide la mezcla de reacción en diferentes tubos y el volumen se completa con 2  $\mu$ L de DNA de cada cepa.
3. Se llevan al termociclador y las condiciones se programan dependiendo de la PCR I-VIII.
4. Al finalizar los ciclos, se toman los tubos eppendorf y se llevan a un gel de electroforesis para observar la PCR. En caso de que no se pueda, se guardan las muestras a -20°C.

## Electroforesis

### Material:

- Una cámara de electroforesis
- Agarosa
- Fuente de poder eléctrica
- Transiluminador marca UVP
- Marcador de 100 pb (Promega)

### Procedimiento

1. Preparar el gel a la concentración de 2% (p/v). Agregar 5  $\mu$ L al 10% de bromuro de etidio al gel antes de gelificar.
2. Poner en la cámara de electroforesis, cubrir con TBE al 0.5%, rellenar el primer pozo con el marcador de 100 pb.
3. Enseguida, poner las muestras en los siguientes pozos.
4. Conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder, las condiciones del voltaje y tiempo depende del peso del primer.
5. Para finalizar, observar el gel sobre la luz UV.

### 6.5 Análisis estadístico

El análisis que se utilizó fue una estadística descriptiva con frecuencias y porcentajes.

Para la estadística con variables cuantitativas se utilizó  $\chi^2$  o prueba exacta de Fisher, según sea el caso. Se consideró una diferencia significativa  $p < 0.05$ . Los datos que se obtuvieron se capturaron en el paquete estadístico: Statistical Package for Social Sciences para Windows (SPSS versión 15.0) y los resultados se presentaron en figuras y cuadros.

## RESULTADOS

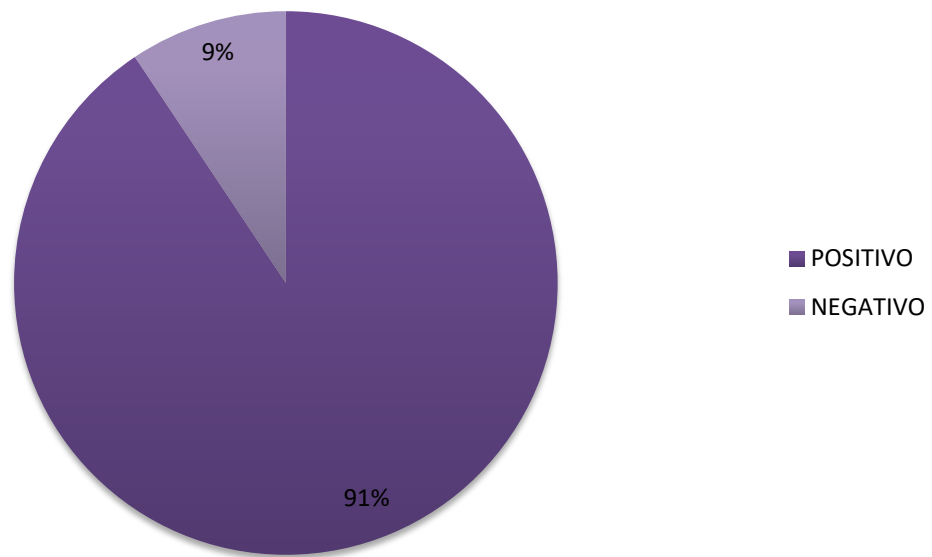
En el trabajo se realizó la determinación de genes que codifican  $\beta$ -lactamasas en 96 cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en muestras de neonatos en la UCIN del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Cincuenta de los aislamientos (52.1%) fueron obtenidos a partir de urocultivos, 29 (30.2%) de hemocultivos, 15 (15.6%) de diversos y 2 (2.1%) a partir de coprocultivos. Se registraron 28 (29.2%) neonatos femeninos y 68 (70.8%) masculinos (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Relación entre el sexo de los neonatos y el tipo de muestra donde se aislaron las cepas de *Klebsiella pneumoniae*.**

TIPO DE MUESTRA	FEMENINO	MASCULINO	TOTAL
HEMOCULTIVO	12 (42.9%)	17 (25.0%)	29 (30.2%)
UROCULTIVO	11 (39.3%)	39 (57.4%)	50 (52.1%)
DIVERSOS	5 (17.9%)	10 (14.7%)	15 (15.6%)
COPROCULTIVO	0	2 (2.9%)	2 (2.1%)
<b>TOTAL</b>	<b>28 (29.2%)</b>	<b>68 (70.8%)</b>	<b>96</b>

Aunque las cepas fueron identificadas por el sistema Vitek®, se realizaron pruebas bioquímicas en el laboratorio de Infectología como pruebas confirmatorias. Dentro de las pruebas de Vitek® se realiza la determinación de BLEE, el resultado fue de las 96 cepas, 87 (91%) fueron positivas y 9 (9%) negativas (Figura 8) así como la susceptibilidad a antibióticos, donde las 96 cepas que se analizaron fueron susceptibles a carbapenémicos.

**Figura 8. Relación de las cepas positivas y negativas a BLEE**



Al realizar las diferentes 8 PCR (Cuadro 3) las cepas sólo fueron positivas a la PCR I, PCR II y PCR VIII como se observa en las figuras 9, 10 y 11.

**Figura 9. Electroforesis de amplificados positivos a PCR I de cepas de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* aisladas de neonatos que se encuentran en la UCIN del Hospital Infantil de México Federico Gómez.**

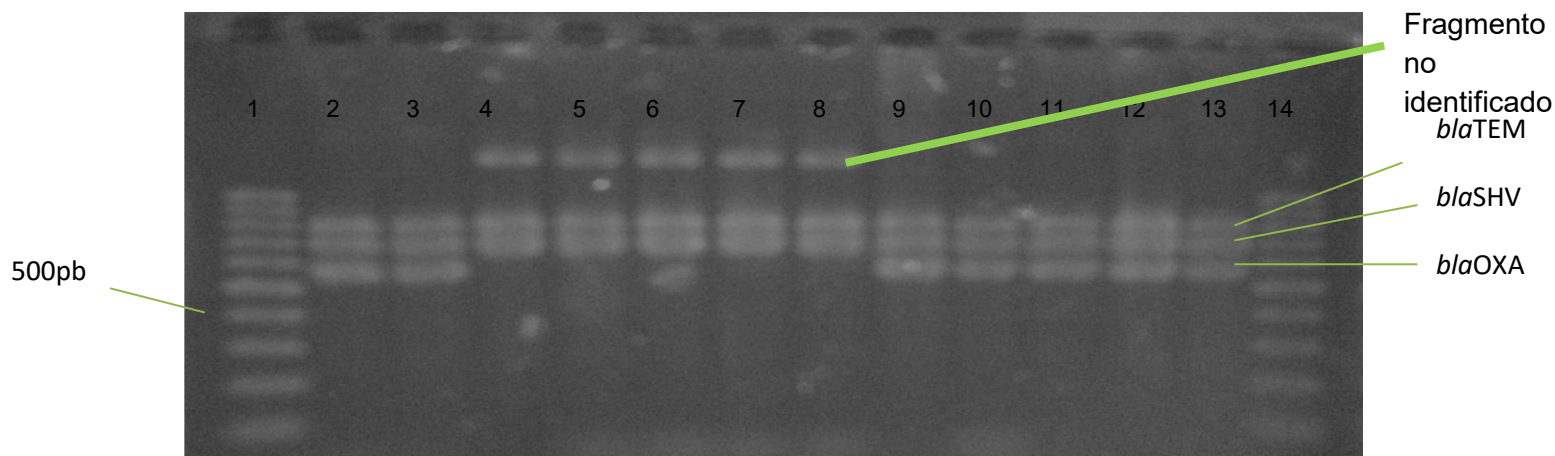


Fig 9. En el pozo 1 y 14 se encuentra el marcador de 100pb, los pozos 2, 3, 9 al 13 muestran las bandas de los tres genes *bla*TEM-SO con 800pb, *bla*SHV-SO con 713 pb *bla*OXA-SO con 564 pb y los pozos 4 al 8 son muestras solo positivas a los genes *bla*TEM-SO y *bla*SHV-SO.



Figura 10. Electroforesis de amplificados positivos a PCR II de cepas de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* aisladas de neonatos que se encuentran en la UCIN del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

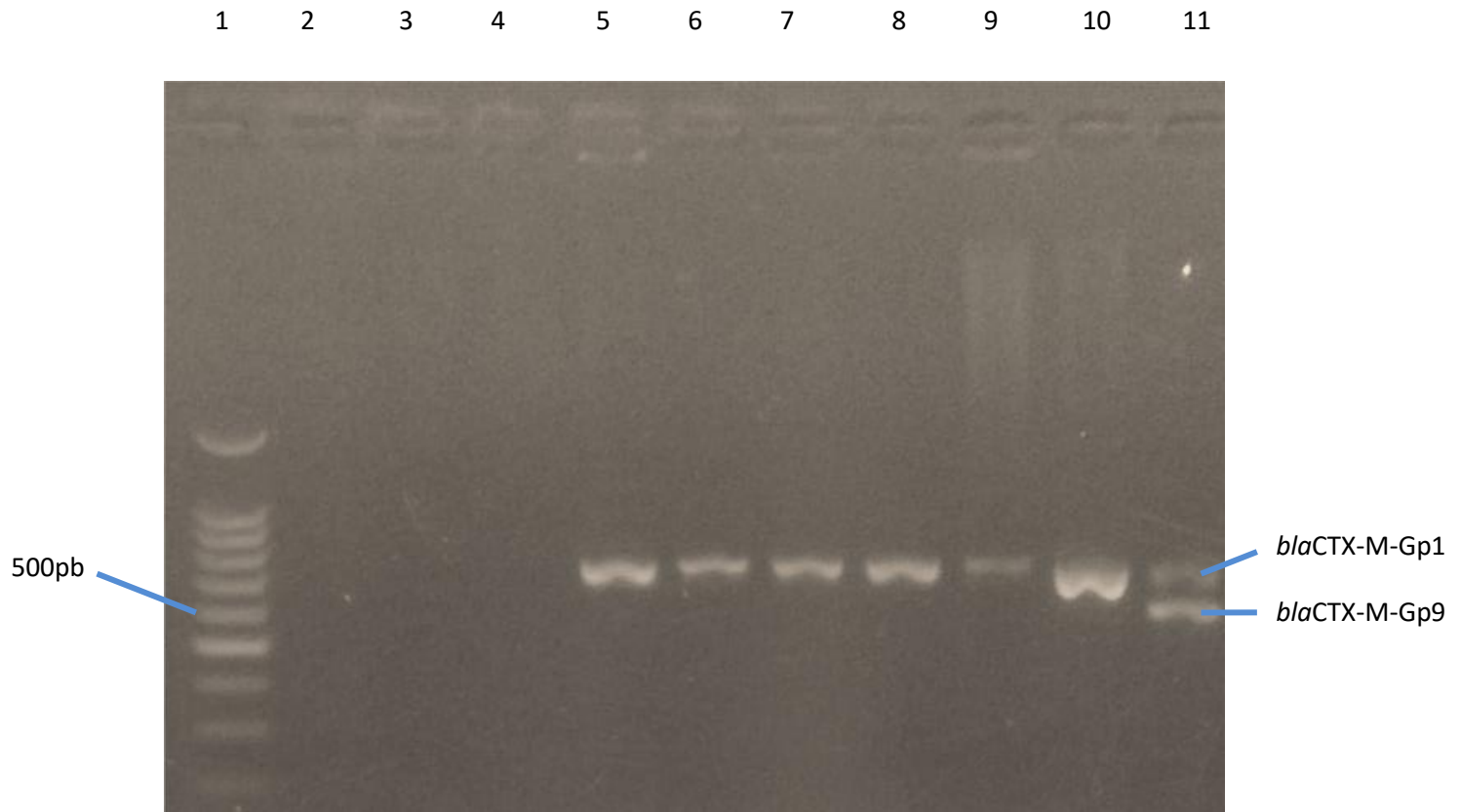


Fig 10. En el pozo 1 se encuentra el marcador de 100 pb, los pozos de 2 al 4 son cepas negativas a los genes que se identifican en esta PCR II, los pozos de 5 al 10 son cepas positivas a los genes son *bla*CTXMGp1 con 688pb, la cepa del pozo 11 muestra que es positiva a los genes *bla*CTXMGp1 y a *bla*CTXMGp9 con 561pb.

Figura 11. Electroforesis de amplificados positivos a PCR VIII de cepas de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* aisladas de neonatos que se encuentran en la UCIN del Hospital Infantil de México Federico Gómez

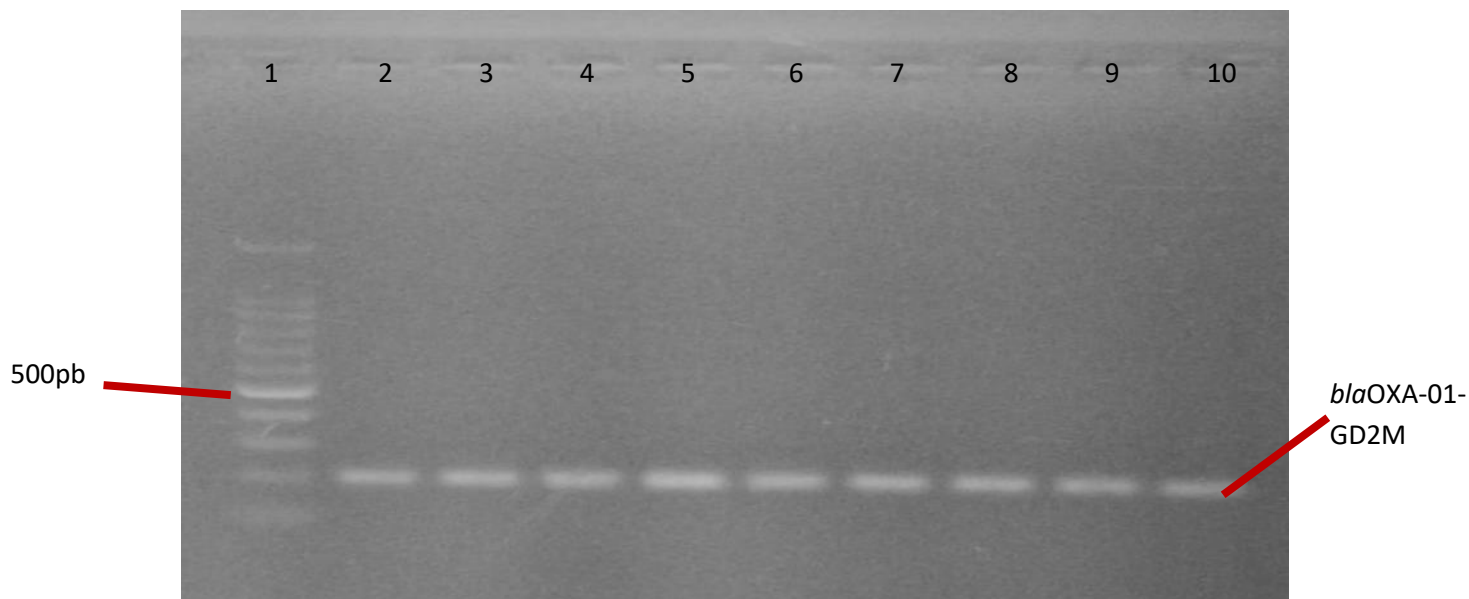


Fig 11. En el pozo 1 se encuentra el marcador de 100 pb, del pozo 2 al 10 son muestras positivas al gen *blaOXA-01-GD2M* con 198 pb.

En la PCR I se determinaron los genes *bla*TEM-SO observando 71 (n=71/96 74%) positivas, de *bla*SHV-SO; 88 cepas (n=88/96 91.7%) son positivas y de *bla*OXA-SO 52 cepas (n=52/96 54.2%) son positivas.

En la PCR II se identificaron los genes *bla*CTXGp1, -2,- 9 y -8/25, el comportamiento de las cepas fue que sólo dieron positivo a *bla*CTXMGp1 con 48 (n=48/96 50%) y *bla*CTXMGp9 con una sólo cepa positiva (1/96 1%) (Cuadro 5).

De los genes que se determinaron en las PCR III (IMP, VIM, KPC), IV (GES, PER, VEB), V (SME e IMI), VI (GIM, SIM, NDM, SOM) y VII (OXA-23, -24 y -48), no se identificaron amplificados, por lo que son negativas a estas (Cuadro 5).

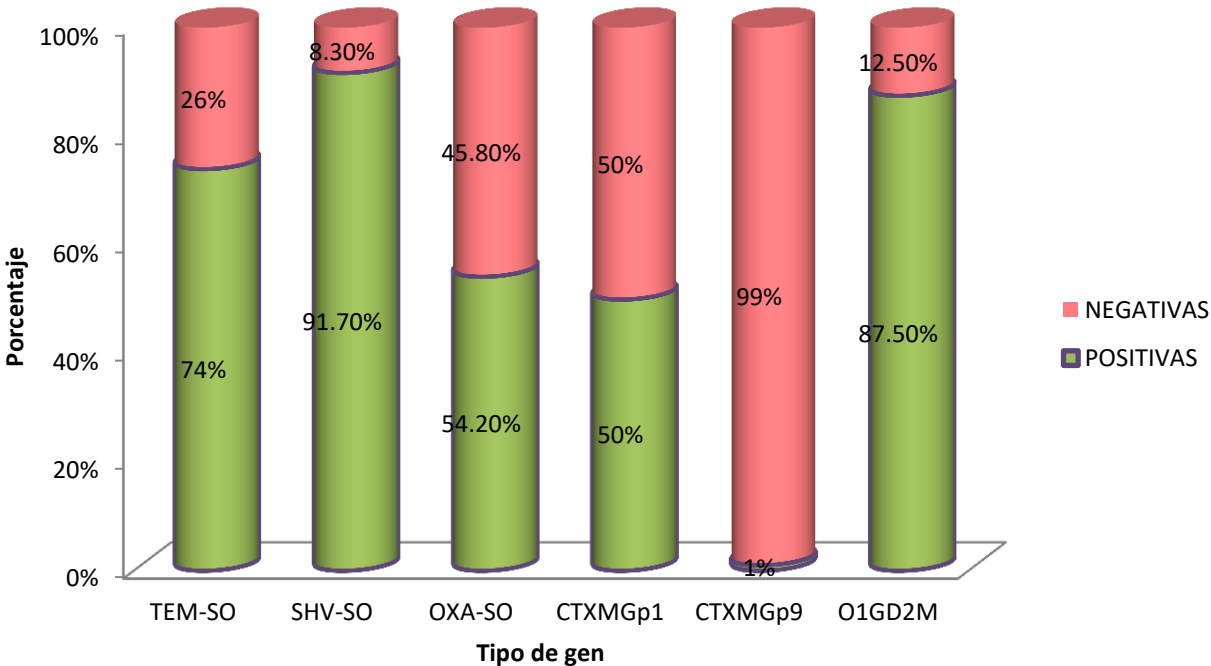
En la PCR VIII se determinaron los genes *bla*OXA-01, -02 y 51, donde se obtuvieron 84 (n=84/96 87.5%) cepas positivas para el gen *bla*OXA-01. Para mejor observación ver figura 12.

**Cuadro 5. Frecuencias de los genes identificados en las cepas de *Klebsiella pneumoniae* con respecto a las diferentes PCR (I a VIII).**

TIPO DE PCR	GEN	POSITIVO	NEGATIVO
<b>PCR I</b>	<i>bla</i> TEM-SO	71 (74%)	25 (26%)
	<i>bla</i> SHV-SO	88 (91.7%)	8 (8.3%)
	<i>bla</i> OXA-SO	52 (54.2%)	44 (45.8%)
<b>PCR II</b>	<i>bla</i> CTXMGp1	48 (50.0%)	48 (50.0%)
	<i>bla</i> CTXMGp2	0	0
	<i>bla</i> CTXMGp9	1 (1.0%)	95 (99.0%)
	<i>bla</i> CTXMGp8/25	0	0
<b>PCR III</b>	<i>bla</i> IMP	0	0

	<i>blaVIM</i>	0	0
	<i>blaKPC</i>	0	0
<b>PCR IV</b>	<i>blaGES-1,9,11</i>	0	0
	<i>blaPER-1y3</i>	0	0
	<i>blaVEB-1,6</i>	0	0
<b>PCR V</b>	<i>blaSME-GAM</i>	0	0
	<i>blaIMI-GS</i>	0	0
<b>PCR VI</b>	<i>blaGIM-GBM</i>	0	0
	<i>blaSIM-GBM</i>	0	0
	<i>blaNDM-GBM</i>	0	0
	<i>blaSPM-GBM</i>	0	0
<b>PCR VII</b>	<i>blaO23-GDM</i>	0	0
	<i>blaO24-GDM</i>	0	0
	<i>blaO48-GDM</i>	0	0
<b>PCR VIII</b>	<i>blaO1-GD2M</i>	84 (87.5%)	12 (12.5%)
	<i>blaO2-GD2M</i>	0	0
	<i>blaO51-GD2M</i>	0	0

Figura 12. Frecuencias de cepas positivas y negativas a genes que codifican a  $\beta$ -lactamasas



Para la prueba de comparación de grupos se compraron las cepas positivas con el tipo de muestra, se realizó una prueba de  $\chi^2$  obteniendo  $p > 0.05$  lo que indica que no hay significancia (Figura 13).

**Figura 13. Representación gráfica de la cepas positivas de *Klebsiella pneumoniae* a diferentes tipos de genes.**

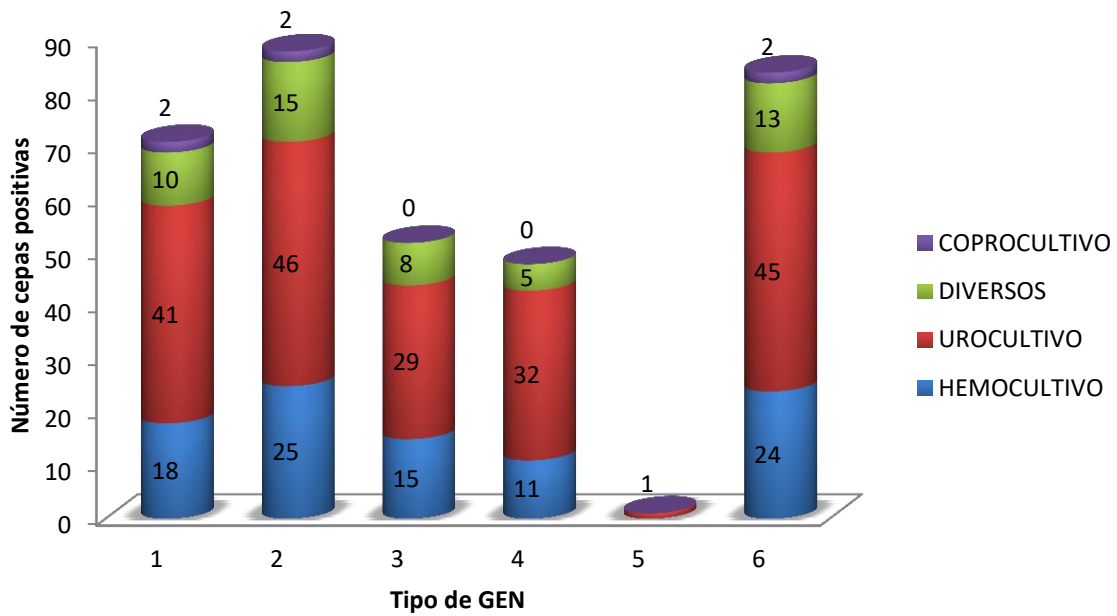


Figura 13. Eje horizontal: 1; *bla*TEM-SO, 2; *bla*SHV-SO, 3; *bla*OXA-SO, 4; *bla*CTXMGp1, 5; *bla*CTXMGp9, 6; *bla*O1GD2M

Sin embargo se encontró que en la mayoría de los aislamientos los patrones de genes que son más frecuentes son; con un 35.42% co-existen los *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*OXA-SO, *bla*OXA-01 y *bla*CTX-M-Gp1, 14.58% tienen los siguientes genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*OXA-01 y con el 9.38% están los genes *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*OXA-01 y *bla*CTX-M-Gp1, con 8.33% las cepas solo tienen *bla*SHV y con 7.29% *bla*SHV, *bla*OXA-SO y *bla*OXA-01, sin embargo en el Cuadro 6 se muestran los patrones identificados.

**Cuadro 6. Patrón que se repite entre las diferentes cepas con la cantidad de genes que tenga cada una.**

<b>PATRÓN</b>	<b>CANTIDAD DE CEPAS</b>	<b>PORCENTAJE (%)</b>
<b>TEM SHV OXA CTXMGp1 O1GD2M</b>	34	35.42
<b>CTXGp1 O1GD2M</b>	1	1.04
<b>TEM SHV OXA O1GD2M</b>	6	6.25
<b>TEM SHV CTXGp1</b>	1	1.04
<b>SHV CTXGp1 O1GD2M</b>	2	2.08
<b>TEM SHV CTXGp1 O1GD2M</b>	9	9.38
<b>TEM SHV O1GD2M</b>	14	14.58
<b>TEM SHV OXA O1GD2M</b>	5	5.21
<b>SHV OXA O1GD2M</b>	7	7.29
<b>SHV O1GD2M</b>	2	2.08
<b>TEM OXA O1GD2M</b>	1	1.04
<b>SHV</b>	8	8.33
<b>O1GD2M</b>	1	1.04
<b>TEM CTXMGp1 O1GD2M</b>	1	1.04
<b>CTXGp1 CTXMGp9 O1GD2M</b>	1	1.04

---

<b>NINGUNA</b>	3	3.13
<b>TOTAL</b>	96	100.00

---



## DISCUSIÓN

Un gran problema en México y en el mundo, es la resistencia a los antibióticos, la cual se debe en gran parte al mal manejo como lo es, el uso no justificado. Esto provoca que las bacterias desarrollen mecanismo de resistencia lo que conlleva a la inactivación del fármaco. El principal mecanismo de resistencia analizado en este estudio es la producción de  $\beta$ -lactamasas, ya que este proceso puede ser transferido de una bacteria a otra por plásmidos, transposones o integrones y porque los antibióticos que inactivan son  $\beta$ -lactámicos y son los principales medicamentos que se utilizan para combatir una infección.

*Klebsiella pneumoniae* es un patógeno asociado a IAAS, que con el tiempo ha incrementado la frecuencia de infecciones a neonatos que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos. La presencia de cepas productoras de BLEEs y carbapenemasas, están relacionadas con altos rangos de mortalidad<sup>62,63,64,65,66</sup>. Un estudio realizado en Madrid demostró que 78.9% de los aislamientos de enterobacterias que se obtuvieron fue *K. pneumoniae*, siendo la UCI la que presentó la mayor frecuencia de infecciones con 29.9%. Aunado a ello, reportaron que la UCI pediátrica es la sala con mayor porcentajes de bacterias resistentes (5.4%)<sup>51</sup>. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez, *Klebsiella pneumoniae* es uno de los microorganismos que más se aísla en la UCIN, con una frecuencia de 75%<sup>12</sup>, sin embargo; aunque se reportan los perfiles de susceptibilidad, se desconocen los mecanismos mediante los cuales se produce esta resistencia.

En este estudio se encontró que de los 96 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* analizados; 68 (70.8%) procedían de neonatos masculinos y 28 (29.2%) fueron femeninos, comparando con otros estudios en neonatos, en China de 27 pacientes, 17 son masculinos y 10 femeninos. Otro estudio, en el mismo país reportó de 22 neonatos, 17 correspondían a sexo masculino y 5 a femenino. Del mismo modo, en Pakistán un estudio encontró que la mayoría fueron masculinos<sup>63,65,67</sup>. Esta proporción se observa también en pacientes de otras edades, ya que un estudio realizado de resistencia bacteriana en México donde la población de estudio incluyó desde neonatos hasta pacientes de 85 años, mostró que la frecuencia de hombres correspondían al 56.4% y las mujeres de 43.6%<sup>68</sup>, lo que hace pensar que existe alguna predisposición a ser colonizados, debida a cuestiones genéticas o al sistema inmune.

En un estudio de Turquía en 2016, se reporta a *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, la mayoría aisladas de bacteriemias primarias (62.5%), neumonía asociada en ventilador (16.6%), ventriculitis (8.3%) e infecciones intraabdominales (4.1%)<sup>11</sup>. De igual manera en un artículo de Venezuela la mayoría de los aislamientos evaluados fueron obtenidos a partir de sangre y secreción bronquial<sup>39</sup>. Un trabajo en China que se realizó en neonatos el tipo de muestra donde se obtuvieron los aislamientos fueron de sangre 9/27, orina 8/27, catéter 5/27 y esputo 5/27<sup>65</sup>. En una publicación en Nepal de los aislamientos casi todas fueron en sangre (54) a excepción de una que fue de líquido cefalorraquídeo<sup>66</sup>. Comparando con la literatura mencionada, el presente trabajo difiere en cuanto al principal origen de los aislamientos, ya que, la mayoría (52.1%) fueron aisladas de urocultivos. En segundo lugar fueron los hemocultivos con una frecuencia de 29 (30.2%), seguido por los de origen diverso que se refiere a puntas de catéter, líquido pleural o líquido cefalorraquídeo con 15 muestras (15.6%) y por último coprocultivos 2 (2.1%). Aunque *K. pneumoniae* se puede encontrar en el tracto

urinario, ésta no es su área local, por lo que consideramos que los procedimientos en los que se involucra el tracto urinario aumentan la contaminación. De igual manera, la colocación de un catéter, ya sea central o periférico, son un factor que puede favorecer a la contaminación. Por ello la importancia que tiene el lavado de manos, el cambio de utensilios y de guantes para evitar la propagación de la infección entre los pacientes.

En este trabajo se encontró que las cepas de *K. pneumoniae* sólo dieron positivo a varios tipos de BLEE, a OXA (que es de clase D) pero no a enzimas que desactivan carbapenémicos. Con lo que respecta a BLEE, el gen que se encontró con mayor frecuencia fue *blaSHV* con 88 cepas (91.7%) de las 96 cepas que se analizaron, en segundo lugar *blaTEM* con 71 (74.1%), y en tercer lugar *blaCTX-M* con 49 cepas; de esta cantidad 48 (50%) fueron *blaCTX-M-Gp1* y solo una dió positivo a *blaCTX-M-Gp9*. En cuanto a la determinación de la familia OXA, *blaOXA-SO* obtuvo 52 (54.2%) y *blaOXA-01* 84 (87.5%). Comparando con otros estudios en neonatos<sup>39,65,67</sup>, el nuestro tiene similitud, ya que los genes encontrados con mayor frecuencia son los que codifican para BLEE en especial *blaTEM* y *blaCTX-M*. En cuanto a los resultados relacionados a  $\beta$ -lactamasas que inactivan carbapenémicos, diferimos con la literatura, ya que muestran que en la mayoría de los aislamientos se detectan los genes de *blaKPC* y *blaVIM-2* (hasta en 100% de los aislamientos), también se encuentra con una frecuencia considerable (más del 50%) a *blaNDM-1*.

Cabe recalcar, que como en la literatura revisada, la frecuencia de varios genes codificantes encontrados en una sola cepa es alta. En este trabajo se observó que la mayoría (35.42%) mostraban los 5 genes que dieron positivo, excepto *blaCTX-M-Gp9*, que sólo se encontró en un cepa, sin embargo en la mayoría de las cepas se encontró co-existencia de los genes

*bla*TEM y *bla*SHV, que comparado con la literatura<sup>9</sup> resultó similar puesto que también se encontró que estos dos genes junto con *bla*CTX-M coexisten en la mayoría de los aislamientos. Comparando los resultados con artículos que se hicieron de *K. pneumoniae* pero en adultos<sup>35,51,69,70</sup>, se nota similitud en los resultados, ya que en la mayoría de los aislamientos los genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M coexisten. En cuanto a la presencia del gen *bla*OXA, encontramos que a diferencia de otros estudios donde la variante más frecuente es *bla*OXA-48, en esta investigación fue *bla*OXA-01 la más común entre nuestros aislados. Con lo que respecta a las carbapenemasas, se ha observado que las cepas aisladas de adultos son más virulentas, puesto que muestran mayor resistencia a antibióticos porque se han podido amplificar los genes *bla*KPC, *bla*VIM y *bla*NDM-1. Como se sabe, el tener estos genes que les confiere resistencia a imipenem o meropenem, provoca que los pacientes, como única opción sean tratados con tigeciclina o colistina, que son nefrotóxicos.

Encontramos pocos estudios para comparar nuestros resultados, sobre todo en neonatos en México. Los trabajos publicados son con enterobacterias en general, pero no analizan alguna bacteria en particular. Este trabajo aporta resultados relevantes, ya que la mayoría de los reportes se centran en infecciones en adultos, a pesar de que la presencia de *K. pneumoniae* está en aumento en las UCIN de los hospitales de todo el mundo.

En el HIMFG, la gran mayoría fueron productoras de BLEE y no a carbapenemasas, esto puede deberse a que se han tomado las medidas necesarias para que las IAAS sean controladas y no provoquen a que las bacterias muten para ser resistentes a los carbapenémicos, una de las medidas que se han tomado es que las recetas con antibióticos siempre debe llevar el visto bueno de un médico infectólogo así como cambiar los tratamientos utilizando diferentes antibióticos provocando una resistencia selectiva y prácticamente “engañando” a las bacterias.

## CONCLUSIONES

Se detectó que las 96 cepas de *K. pneumoniae* no presentan resistencia a los carbapenémicos, lo que indica que en la UCIN del HIMFG, la resistencia bacteriana no es tan grave como en los demás hospitales o países, pero la mayoría presentó genes productores de BLEE por lo que se encienden las alertas para tener mucho más cuidado en el riesgo a las IAAS.

Sobre la hipótesis del trabajo se puede confirmar que la bacteria tiene con mayor porcentaje los genes *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M, sin embargo es negativa para *bla*OXA-048, *bla*KPC-2, *bla*NDM-1 y *bla*VIM-2.

## PERSPECTIVAS

Este es sólo una pauta para investigar más sobre *Klebsiella pneumoniae* ya que se podrían secuenciar los fragmentos amplificados y saber qué variedad de BLEE se produce en cada bacteria. Esto nos podría auxiliar para conocer más sobre ella, como por ejemplo; donde adquirió los genes, si fue por plásmidos, o qué tipo de plásmidos o si se encuentra en el cromosoma, ya que se encontraron fragmentos con mayor tamaño de lo esperado. También se recomienda realizar campos pulsados para determinar si existe alguna clona particular en la sala.

## REFERENCIAS

1. Puerta-García A, Mateos-Rodríguez F. Enterobacterias. *Medicine*. 2010;10(51): 3426-31.
2. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2004.
3. Koneman E, et al. Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. 6ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
4. Echeverri L, Cataño J. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *Latreria*. 2010 sep; 23(3): 240-249.
5. Henson S, Boinett C, Ellington M, et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* invasive infections over a decade at Kilifi Country Hospital in Kenya. *International Journal of Medical Microbiology*. 2017;307: 422-429.
6. Carrol K, et al. Microbiología médica. México: McGraw-Hill; 2016.
7. Díaz P, Bello H, Domínguez M, et al. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido. *RevMed Chile*. 2004;132: 1173-1178.
8. Escalante JC, Sime A, Díaz C. Características clínicas y epidemiológicas en pacientes con infección intrahospitalaria por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Epidemiología*. 2013 abril;17(1): 01-06.
9. Alibi S, Ferjani A, Boukadida J. Molecular characterization of extended spectrum beta-lactamases produced by *Klebsiella pneumoniae* clinical strains from a Tunisian Hospital. *Médecineet maladies infectieuses*. 2015;45: 139-143.

10. Ahemed A, Haneen M. Phenotypic and Molecular Characterization of Multidrug Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Different Clinical Sources in Al.Najaf Province-Iraq. Pak J. Biol. Sci. 2017;20(5): 217-232.
11. Akturk H, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in pediatric and neonatal intensive care units: risk factors for progression to infection. Braz J Infect Dis. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2015.12.004>
12. Vega GM. 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 [tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina; 2016.
13. Sandoval S. Evolución y herencia de la resistencia adaptativa a múltiples antibióticos en bacterias: un enfoque de la biología de sistemas [tesis doctoral]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ciencias Físicas; 2015.
14. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. EnfermInfeccMicrobiolClin. 2009;27(2):116-129.
15. Beloso W. Historia de los antibióticos. Rev Hosp Ital B.Aires. 2009;29(2):102-111.
16. Troncoso C, Pavez M, Santos A, Salazar R, Barrientos L. Implicancias estructurales y fisiológicas de la célula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiótica. Int J. Morphol. 2017; 35(4): 1214-1223.
17. Serra MA. La Resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. Revista Habanera de Ciencias Médicas [revista en Internet]. 2017 [consultado 19 marzo 2018; 16(3):[402-409]. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2013>.

18. Vuotto C. et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*. 2017;123: 1003-1008. Disponible en: <http://doi.org/10.1111/jam.13533>.
19. González CM. Mecanismos de Resistencia a carbapenemes en cepas de *Acinetobacter baumannii* causantes de infecciones intrahospitalarias [tesis]. México: Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2010.
20. Puerta B, Ureña C. Prácticas de biología molecular. 1ª ed. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana; 2005.
21. Ingold A, Castro M, Nabón A, et al. Detección del gen codificante de la metalo-beta-lactamasa VIM-2 en un integrón de clase 1 asociado con el gen bla<sub>CTX-M-2</sub> en un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* en Uruguay: primera comunicación. *Revista Argentina de Microbiología*. 2011;43:198-202.
22. Cantón R, et al. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in microbiology*. 2012;3(110): 1-19.
23. Castañeda J, Gómez K, Corrales L, Cortés S. A profile of resistance in bacteria and the mechanisms associated due to the presence of the enzyme NDM-1: a systematic review. *NOVA*. 2016; 13(25): 95-111.
24. Abarca Gabriela, Herrera Marco Luis. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños(Costa Rica)* [Internet]. 2001 Jan [cited 2018 June 05] ; 36( 1-2 ): 77-104. Available from: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S101785462001000100011&lng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101785462001000100011&lng=en).



25. García A, García E, Hernández A, Ruiz J, et al. Bacteriemias por *Escherichiacoli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. RevEspQuimioter. 2011; 24(2): 57-66.
26. Calvo J, Cantón R, Fernández F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. En: Cercenado E, Cantón R, editores. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2da ed. 2011 [citado 2 Nov 2012];(38); Disponible en: [http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/prcto\\_down.ht](http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/prcto_down.ht)
27. Robles N. Importancia Clínica de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez [tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina; 2015.
28. Lachmayr K, et al. Quantifying Nonspecific TEM  $\beta$ -lactamase (blaTEM) Genes in a Wastewater Stream. Appl Environ Microbiol. 2009;75(1):203-211.
29. González L, Ramos A, et al. Identificación fenotípica y molecular de beta-lactamasas de espectro extendido TEM y SHV producidas por *Escherichiacoli* y *Klebsiella spp.* aislados clínicos en hospitales. Rev Cubana MedTrop. 2007;59(1):52-8.
30. Morfín R, Mendoza S, et al. Characterization of *Enterobacteriaceae* isolates obtained from a Tertiary Care Hospital in México, which produces extended-spectrum beta-lactamase. Microbial Drug Resistance. 2013; 19(5):378-383.
31. Baquera A. Factores relacionados a morbilidad y mortalidad en pacientes con aislamientos de *Escherichiacoli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de

- betalactamasas de espectro extendido en líquidos estériles y no estériles. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina; 2015.
32. Herruzo R, et al. Bla-OXA48 gene microorganism's outbreak, in a tertiary Children's Hospital, Over 3 years. *Medicine*. 2017; 96(40): 1-6.
33. Petersen S, et al. New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM-1)- producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a burned patient. *Am J Case Rep*. 2017;18:805-809.
34. Raible K, et al. Molecular characterization of beta-lactamase genes in clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann ClinMicrobiolAntimicrob*. 2017;16(75):1-10.
35. Liang Y. et al. Clonal replacement of epidemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in China. *BMC Infectious Diseases*. 2017;17(363):1-7.
36. Martínez P, Espinal P, et al. Prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichiacoli* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), en el Hospital San Jerónimo de Montería. *Med UNAB*. 2005;5(1):15-22.
37. Bariani L. Detección y caracterización genética de betalactamasas y betalactamasas de espectro extendido en aislamientos de enterobacterias[tesina]. Uruguay: Universidad de la Republica. Facultad de Ciencias; 2015.
38. Ayarl K. et al. Dissemination and genetic support of broad-spectrum beta-lactam-resistant *Escherichia coli* strain isolated from two Tunisian hospitals during 2004-2012. 2017;17(2):346-355.
39. Falco A, et al. A clauser of KPC-2 and VIM-2 producing *Klebsiella pneumoniae* ST833 isolates from the pediatric service of a Venezuelan Hospital. *BMC infectiousdiseases*. 2016; 16(525): 1-9.

40. Gutierrez C. et al. Vigilancia de enterobacterias productoras de carbapenemasas en cultivos rectales en un hospital universitario de Santiago, Chile. *Rev Chilena Infectol.* 2013;30(1):103-106.
41. Silva V, et al. Detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring blaGES-1 and blaGES-11 in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(6):764-768.
42. Boyd D, Mataseje L, et al. *Enterobacter cloacae* complex isolates harboring blaNMC.A or blaIMI, type class A carbapenemase genes on novel chromosomal integrative elements and plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(5):1-12.
43. Naas T, et al. First Identification of blaIMI-1 in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2012;56(3):1664-1665.
44. Voets G, Fluit A, et al. A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC $\beta$ -lactamases and OXA  $\beta$ -lactamases. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2011;37:356-359.
45. Ayala B, León A. Carbapenemasa Nueva Delhi tipo 1 (NDM). Descripción fenotípica, epidemiológica y tratamiento. *Laboratorio actual.* 2013;44:24-31.
46. Wendel A, Ressina S, et al. Species Diversity of Environmental GIM-1 Producing Bacteria Collected during a Long-Term Outbreak. *Applied and Environmental Microbiology.* 2016 June;82(12):3605-3610.
47. Zhou Z, et al. Clinical Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baylyi* Strain Coharboring blaSIM-1 and blaOXA-23 from China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Nov;55(11):5347-5349.
48. Du N, et al. Transmission and characterization of blaNDM-1 in *Enterobacter cloacae* at a teaching hospital in Yunnan, China. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017;16(58):1-6.

49. Moosavian M, et al. Molecular detection of metallo- $\beta$ -lactamase genes, blaIMP-1, blaVIM-2 and blaSPM-1 in imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens in teaching hospitals of Ahvaz, Iran. Iran J Microbiol. 2015 February;7(1):2-6.
50. Araujo BF, Ferreira ML, et al. Clinical and Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *P. aeruginosa* Carrying aac(6')-Ib-cr, qnrS1 and blaSPM Genes in Brazil. 2016;11(5):1-15.
51. Brañas P, et al. Epidemiología molecular de las infecciones/colonizaciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital de Madrid. EnfermInfeccMicrobiolClin. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.10.004>.
52. Eftekhar F, et al. Detection of Extended Spectrum B-lactamases in Urinary Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Relation to BlaSHV, BlaTEM and BlaCTX-M Gene Carriage. Iranian J Publ Health. 2012;41(3):127-132.
53. Organización Mundial de la Salud [homepage on the internet]. Ginebra: OMS; c2018 [actualizada 27 febrero 2017; consultado 19 marzo 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
54. Gen, et al. High-dose tigecycline for the treatment of nosocomial carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. Medicine. 2018; 97(8): 1- 6.
55. Timi Martelius, Jari Jalava, Tommi Kärki, Teemu Möttönen, Jukka Ollgren, Outi Lyytikäinen & the Hospital Infection Surveillance team (2015): Nosocomial bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins, Finland, 1999–2013: Trends, patient characteristics and mortality, Infectious Diseases, DOI: 10.3109/23744235.2015.1109135.

56. Ovalle M, et al. Resultados de la vigilancia nacional de la Resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gramnegativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014. *Biomédica*. 2017; 37: 473-485.
57. Kumar S, Gupta M. blaOXA-48 carrying clonal colistin resistant-carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in neonate intensive care unit, India. *Microbial Pathogenesis*. 2016;100:75-77.
58. Salazar A, Sandoval A, Armendáriz J. *Biología molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. México: Mc Graw Hill interamericana; 2013.
59. Dios T, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic*. 2013; 2(2): 70-78.
60. Fuente A, Rodríguez J, Capdevila E. Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western blot). *Piel*. 2007; 22(5): 252-258.
61. Dallene C, Da Costa A, et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:490-495.
62. Cantey J, et al. Prompt Control of an Outbreak Caused by Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae* in a Neonatal Intensive Care Unit. *The Journal of Pediatrics*. 2013 september;163(3):672-679.
63. Saleem A, Qamar F, et al. Trends in antibiotic susceptibility and incidence of late-onset *Klebsiella pneumoniae* neonatal sepsis over a six-year period in a neonatal intensive care unit in Karachi, Pakistan. *International Journal of Infectious Diseases*. Fottincoming. 2013.

64. Szél B, et al. Successful elimination of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing nosocomial bacteria at a neonatal intensive care unit. *World J Pediatr.* 2016 november;1:1-7. DOI: [10.1007/s12519-016-0069-z](https://doi.org/10.1007/s12519-016-0069-z).
65. Yu J, Tan K, et al. Nosocomial outbreak of KPC-2- and NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal ward: a retrospective study. *BMC Infectious Diseases.* 2016;16(563):1-6.
66. Stoesser N, et al. Genome Sequencing of an Extended Series of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Neonatal Infections in a Nepali Hospital Characterizes the Extent of Community-versus Hospital-Associated Transmission in an Endemic Setting. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2014 december;58(12):7347-7357.
67. Zhu J, et al. Outbreak of NDM-1- producing *Klebsiella pneumoniae* ST76 and ST37 isolates in neonates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016. DOI [10.1007/s10096-016-2578-z](https://doi.org/10.1007/s10096-016-2578-z).
68. Gutierrez J, et al. Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Infectología pediátrica.* 2017;30(2):68-75.
69. González A, Nieves B, et al. Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. *Rev Chilena Infectol.* 2013;30(4):374-380.
70. Veeraraghavan B, et al. Carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from bloodstream infection: Indian experience. *Indian experience, Pathogens and Global Health.* 2017. DOI: [10.1080/20477724-2017.1340128](https://doi.org/10.1080/20477724-2017.1340128).

# ANEXO I

## Pruebas bioquímicas<sup>2</sup>

Al identificar una bacteria, después de saber morfología microscópica con una tinción de Gram y morfología colonial a través de su crecimiento en agar sangre, se realizan diferentes pruebas, entre ellas están, las pruebas bioquímicas y a continuación se da el fundamento de las principales pruebas para la identificación de *K. pneumoniae* (Cuadro 7).

Cuadro 7. Esquema de identificación para *Klebsiella pneumoniae* por pruebas bioquímicas<sup>2</sup>.

Prueba	Resultado
NO <sub>3</sub> → NO <sub>2</sub>	+
O/F de glucosa	F
TSI	ALC/A sin H <sub>2</sub> S
Fermentación de glucosa y gas	A y gas
Indol	-
Rojo de metilo (MR)	V-
Voges-Proskauer (VP)	+
Citrato de Simmons	+
Ureasa	+

<sup>+</sup>positivo, <sup>-</sup>negativo, <sup>F</sup>fermentación, <sup>ALC</sup> alcalino, <sup>A</sup>ácido, <sup>V</sup>variable

➤ Reducción de nitratos

Determinar la capacidad de un microorganismo de reducir los nitratos a nitritos o gas nitrógeno libre, por medio de enzimas reductoras llamadas nitrato y nitrito reductasa.

➤ O/F de glucosa

Las bacterias utilizan los hidratos de carbono por uno de dos procesos metabólicos, fermentativo u oxidativo. Las bacterias que pueden crecer, realizar su metabolismo y reproducirse en condiciones ya sea aerobias (presencia de oxígeno atmosférico) o anaerobias (ausencia de oxígeno atmosférico) se denominan anaerobios facultativos.

En la fermentación, un hidrato de carbono es hidrolizado en dos moléculas de triosa que con posterioridad son convertidas a una cantidad de compuestos con 1, 2, 3 o 4 carbonos; el principal intermediario es el ácido pirúvico y requiere un compuesto orgánico como aceptor terminal de electrones

➤ TSI

Identifica la capacidad de un microorganismo para atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de desarrollo basal, con producción de gas o sin ella, junto con la determinación de la posible producción de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S).

➤ Fermentación de glucosa y gas

Comprobar la capacidad de un microorganismo para fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado en un medio basal y producir ácido o ácido con gas visible.

Indicador de pH + CHO bacteria → CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, aldehídos + cambio de color



➤ Ureasa

Determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar la urea en dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa, con la resultante alcalinidad.

- Reacciones IMVic

➤ Indol

Determinar la capacidad de un microorganismo para producir indol a partir del triptófano, este es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias, la encargada de hacer la reacción es la enzima triptofanasa. Su función es la desaminación de la molécula de triptófano.

➤ Rojo de metilo (MR)

Probar la capacidad de un microorganismo para producir y mantener estables los productos finales ácidos a partir de la fermentación de la glucosa y para vencer la capacidad de buffer del sistema, y es una prueba cuantitativa.

➤ Voges-Proskauer (VP)

Determinar la capacidad de algunos microorganismos para producir un producto final neutro, acetilcarbinol, a partir de la fermentación de la glucosa.