



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Química Clínica Diagnóstica

“ Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos de *Klebsiella spp.* de interés clínico y epidemiológico obtenidos en hospitales de Querétaro ”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Química Clínica Diagnóstica

Presenta

Q.F.B Pedro Peralta Macotela

Dirigido por:

Dra. María Carlota García Gutiérrez

Co-dirigido por:

Dr. Jesús Ulises Garza Ramos Martínez

Presidente	Dra. María Carlota García Gutiérrez
Secretario	Dr. Jesús Ulises Garza Ramos Martínez
Vocal	Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea
Suplente	MSP. Juana Susana Flores Robles
Suplente	Dra. Karla Isabel Lira de León

Centro Universitario, Querétaro, Qro. México.
Marzo, 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos
de *Klebsiella* spp. de interés clínico y epidemiológico
obtenidos en hospitales de Querétaro

por

Pedro Peralta Macotela

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQMAC-300251-0223-323

DEDICATORIA:

El presente trabajo está dedicado a mis maestros y toda persona que tiene el gusto por la microbiología, las ciencias de la salud y por la ciencia en general.

AGRADECIMIENTOS:

Al laboratorio a cargo de la doctora María Carlota García Gutiérrez, a la Química Rocío Romero Mejía de la SESEQ, al Doctor Ulises Garza Ramos, su equipo de trabajo y el laboratorio CICEI del INSP de Cuernavaca donde se obtuvieron resultados y que me recibieron con mucho agrado y fueron parte clave para el desarrollo de los resultados.

A ti DIOS que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa. Con mucho cariño principalmente a mis padres y hermana que han estado conmigo en todo momento. Gracias por todo papá y mamá por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor, por todo esto les agradezco de todo corazón el que estén conmigo a mi lado. Los quiero con todo mi corazón y este trabajo que me llevó un tiempo hacerlo es para ustedes, solamente les estoy devolviendo lo que ustedes me dieron en un principio.

Gracias a todos aquellos amigos y/o compañeros que me han apoyado de alguna manera en el ramo de la ciencia, ciencias exactas, el gusto por el conocimiento y la verdad.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio el CICEI (Centro de investigación sobre enfermedades infecciosas) del INSP de Cuernavaca y el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, de la facultad de Medicina-UAQ.

Fue parcialmente financiado por los programas: FOPES de la facultad de Química de la UAQ, FOFIUAQ-2018 (registro FME-2018-09), FONDEC-2022 (registro FME-2022-04) y el apoyo al becario CONACYT 1075922.

*Tanto si piensas que puedes, como si piensas que no puedes,
estás en lo cierto – Henry Ford.*

Índice general

Índice general	4
Índice de tablas.....	6
Índice de figuras.....	7
Abreviaturas.....	9
Resumen	10
Summary	11
1. Introducción / Planteamiento del problema.....	12
1.1. Antecedentes.....	14
1.1.1. Importancia de IAAS.....	14
1.1.2. Introducción a ESKAPE.....	15
1.1.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
1.1.4. <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> :.....	21
1.1.5. <i>Klebsiella variicola (Kp3)</i> :	22
1.1.1. Estudios epidemiológicos del mundo y México	24
1.1.2. Antibióticos β Lactámicos.	26
1.1.3. Factores de resistencia	28
1.1.4. Factores de virulencia	33
1.1.5. Factores de virulencia descritos por especie.....	36
2 Objetivos.....	38
2.1 General.....	38
2.2 Particulares.....	38
3 Metodología.....	39
3.1 Diseño.....	39
3.1.1 Definición del Universo.....	39
3.1.2 Tamaño de muestra	39
3.1.3 Criterios de inclusión	39
3.1.4 Criterios de exclusión	39
3.1.5 Criterios de eliminación	39
3.2 Definición de variables y unidades de medida.....	40

3.3	Metodología	40
4	Resultados	49
4.1	Identificación molecular de especies del complejo de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	49
4.2	Determinación del fenotipo y genotipo de resistencia.....	51
4.2.1	Identificación de β -lactamasas	51
4.2.2	Identificación de Carbapenemasas	53
4.2.3	Determinación de resistencia a las polimixinas	54
4.3	Determinación del fenotipo y genotipo de virulencia.....	55
4.3.1	Prueba del filamento "string test".....	55
4.3.2	Prueba del Biofilm	56
4.3.3	Determinación de <i>rmpA</i> y <i>rmpA2</i>	57
4.3.4	Determinación de <i>iucA</i>	57
4.3.5	Determinación de antígenos capsulares K1 y K2.....	58
4.4	Descripción de las características de interés clínico relacionadas con la procedencia del aislamiento	60
5	Discusión de resultados	62
5.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> continua como las más prevalente del complejo.....	62
5.2	La resistencia a las cefalosporinas por parte de <i>Klebsiella spp.</i> es una realidad clínica	63
5.3	La presencia de ciertos factores de virulencia se correlaciona con el sitio anatómico de la muestra.....	65
6	Conclusiones.....	68
7	Anexos.....	69
8.-	Referencias (formato APA).....	83

Índice de tablas

		Pág.
Tabla 1	Grupos de antibióticos para categorizar la multirresistencia a <i>K. pneumoniae</i> .	16
Tabla 2	Características bioquímicas entre <i>Klebsiella spp.</i>	24
Tabla 3	Variables y unidades de medida del estudio.	41
Tabla 4	Condiciones de generales de reacción PCR (volumen final 25µL).	39
Tabla 5	Condiciones generales del termociclador para la prueba de PCR.	44
Tabla 6	Oligonucleótidos para identificación de especies <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. quasipneumoniae</i> y <i>K. variicola</i> .	46
Tabla 7	Oligonucleótidos específicos para genes de resistencia en <i>K. pneumoniae</i> .	48
Tabla 8	Resumen de los resultados fenotípicos y moleculares de las pruebas de resistencia.	56
Tabla 9	<i>Resumen de los resultados fenotípicos y moleculares para los genes de virulencia.</i>	60
Tabla 10	<i>Características más relevantes de las especies diferentes a <i>Klebsiella pneumoniae</i>.</i>	61
Tabla 11	<i>Resultados de resistencia y virulencia de todos los aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i>.</i>	62
Tabla 12	<i>Resumen de las características más importantes de los aislamientos de <i>K.pneumoniae</i> de interés clínico</i>	63
Tabla 13	<i>Frecuencia de miembros del complejo <i>Klebsiella pneumoniae</i> entre diversos estudios.</i>	64
Tabla 14	<i>Relación fenotípica y genotípica de la hipermucoviscosidad.</i>	66

Índice de figuras

		Pág.
Figura 1	Proporción de agentes asociados con la mayoría de las IAAS, Unidades RHOVE, México 2009-2015 (Secretaría de salud, 2017).	14
Figura 2	Árbol filogenético del complejo de especies de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21
Figura 3	Estructura química de los β -lactámicos	27
Figura 4	Principales mecanismos de resistencia a los β -lactámicos	31
Figura 5	Diseminación de <i>K. variicola</i> en los distintos países y sus genes asociados a la resistencia a los antimicrobianos	32
Figura 6	Principales factores de virulencia de <i>Klebsiella spp</i>	36
Figura 7	Esquema del procesamiento general de las muestras	40
Figura 8	Demostración de la prueba de String Test	46
Figura 9	Ejemplo de controles positivos en gel de electroforesis, resultado de la PCR Multiplex para la diferenciación del complejo de <i>K. pneumoniae</i>	49
Figura 10	Resultados porcentuales de la identificación molecular del complejo de especies de <i>K. pneumoniae</i> . Kp corresponde a <i>Klebsiella pneumoniae</i> , Kv a <i>Klebsiella variicola</i> y Kq a <i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	50
Figura 11	Ejemplificación de la electroforesis realizada para la amplificación de <i>bla</i> _{CTX-M-1} y <i>bla</i> _{CTX-M-2}	51
Figura 12	Representación gráfica del Fenotipo BLEE y la proporción total de los genes encontrados	53

Figura 13	Resultados de la prueba carba NP.	53
Figura 14	Electroforesis de los amplicones para la determinación de la carbapenemasa NDM en los aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	54
Figura 15	Resultados de la prueba polimixin NP	54
Figura 16	Cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> positivas en la prueba de filamento	56
Figura 17	Resultados de la producción de biofilm de los 83 aislamientos	56
Figura 18	Electroforesis de los amplicones para la determinación del gen <i>rmpA</i> y <i>rmpA2</i>	57
Figura 19	Resultado del control negativo (carril 2) y positivo (carril 3) para la PCR de <i>iucA</i>	57
Figura 20	PCR de los antígenos capsulares K1 y K2	58
Figura 21	Dendrogramas y metadatos de los resultados de secuenciación de tres cepas del complejo de especies de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	69
Figura 22	Perfil alélico y secuencia tipo del aislamiento número 80	70

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud.
RHOVE	Red hospitalaria para la Vigilancia Epidemiológica.
KPC	Carbapenemasa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .
HKPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> hipervirulenta.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
GLASS	Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos.
VP	Voges Proskauer.
ONPG	El orto-nitrofenil- β -galactósido.
LDC	Lisina descarboxilasa
ODC	Ornitina descarboxilasa
ADH	arginina deshidrolasa
DNAsa	Actividad Desoxirribonucleasa
MDR	Multirresistentes a fármacos
Kp-c	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Clásica
Kp-hv	<i>Klebsiella pneumoniae</i> hipervirulenta
Kp-hmv	<i>Klebsiella pneumoniae</i> hipermucoviscosa
CST	caldo soya tripticaseína
LB	agar Luria Bertani
DO	Desviación óptica
(cKv)	<i>Klebsiella variicola</i> clásica
(hvKv)	<i>Klebsiella variicola</i> hipervirulenta
(hmvKv)	<i>Klebsiella variicola</i> hipermucoviscosa
LPS	Lipopolisacáridos
NDM	Metalobetalactamasa de Nueva Delhi
IDSA	Sociedad americana de enfermedades infecciosas
MLST	MultiLocus Sequence Typing o Secuencia MultiLocus
ST	Tipo de secuencia
UCI	Unidad de cuidados intensivos
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
CISEI	Centro de investigación sobre enfermedades infecciosas

Resumen

Las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) son un problema de salud pública de gran trascendencia económica y social, entre las especies patógenas causales de IAAS más frecuentes en todo el mundo encontramos al grupo ESKAPE, las cuales se caracterizan por sus perfiles de multirresistencia a los fármacos. *Klebsiella spp.* como parte de este grupo es una especie importante de estudio ya que su diferenciación entre especies es difícil por métodos bioquímicos tradicionales y se confirma con métodos moleculares, además posee mecanismos de virulencia y resistencia a los antimicrobianos los cuales son de gran importancia e interés clínico-epidemiológico.

La elevada tasa de letalidad causada por *Klebsiella pneumoniae* que va en aumento año con año, la escasa información de estudios endémicos y la necesidad por controlar las IAAS son algunos de los factores que representan un reto en la práctica clínica. El propósito de este estudio es caracterizar molecular y fenotípicamente los aislamientos de *Klebsiella spp.* que tienen interés clínico y epidemiológico obtenidos en hospitales de Querétaro. El diseño de este estudio es observacional, transversal y retrospectivo a partir de aislamientos de *Klebsiella spp.* los cuales se van a caracterizar molecularmente por especie (PCR Multiplex) y después se identificarán características genotípicas y fenotípicas de los principales mecanismos de virulencia y resistencia, utilizando las pruebas de: Carba NP, string test, producción de biofilm en placas de poliestireno y PCR para la identificación de genes responsables a dichos factores.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, Factores de virulencia, Factores de resistencia.

Summary

Healthcare Associated Infections (HAI) are a public health problem of great economic and social significance, among the most frequent pathogenic species causing HAI worldwide we find the E.S.K.A.P.E group, which is characterized by its multidrug resistance profiles. *Klebsiella spp.* as part of this group is an important genus to study because its differentiation between species is difficult by traditional biochemical methods and is confirmed by molecular methods, it also has virulence and antimicrobial resistance mechanisms which are of great importance and clinical-epidemiological interest. The high lethality rate caused by *Klebsiella pneumoniae*, which is increasing year after year, the scarce information of endemic studies and the need to control HAIs are some of the factors that represent a challenge in clinical practice. The purpose of this study is to characterize molecularly and phenotypically *Klebsiella spp.* isolates of clinical and epidemiological interest obtained in hospitals in Querétaro. The design of this study is observational, cross-sectional and retrospective based on *Klebsiella spp.* isolates, which will be molecularly characterized by species and after by their genotypic and phenotypic characteristics of the main virulence and resistance mechanisms will be identified, using the following tests: Carba NP, string test, biofilm production in polystyrene plates and PCR for the identification of genes responsible to those factors.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, *Virulence factors*, *Resistance factors*.

DECLARACION DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis en forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cuál declaro y doy reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentada en este documento.

1. Introducción / Planteamiento del problema

Las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) son un problema de salud pública de gran trascendencia económica y social, en la actualidad se registran altas tasas de morbilidad y mortalidad y conllevan un importante aumento en los costos de atención hospitalaria (Gutiérrez Muñoz et al., 2017).

De acuerdo con los reportes nacionales de la secretaría de salud, la tasa global de IAAS en 2015 fue de 4.7%, lo que representa un aumento respecto al año anterior con 4.1%. (Secretaría de salud, 2017). No obstante, en las unidades de cuidados intensivos (UCI), el panorama es más crítico, con una prevalencia entre 20% y 25% (Secretaría de Salud, 2019).

Entre los agentes causales de IAAS con mayor frecuencia en el mundo, encontramos al grupo ESKAPE (Santajit & Sirijan, 2016). La diseminación de *Klebsiella spp.* como miembro de este grupo es un ejemplo de adaptación al medio, ya que existen reportes en todo el mundo sobre los distintos mecanismos de resistencia a los antimicrobianos y distintas formas de virulencia adquiridos por transferencia de genes. Este microorganismo forma parte de la

microbiota habitual en el tracto gastrointestinal sin embargo, se le considera como un patógeno oportunista, que representa un reto para la práctica químico-clínica en cuanto a la diferenciación entre especies por métodos bioquímicos convencionales, lo que conlleva a confirmar sus distintos genotipos por técnicas moleculares (Ernst et al., 2020).

En México, *Klebsiella pneumoniae* forma parte de los 3 principales agentes etiológicos asociados a las IAAS con un 9.5 % y presenta una frecuencia de aislamientos ascendentes en los reportes de salud, ocupando el primer lugar en la unidad de cuidados intensivos neonatal y el segundo en cuidados intensivos pediátricos (Secretaria de salud, 2017).

Para conocer más sobre el panorama general de esta situación, la mejor herramienta de consulta, son los estudios epidemiológicos moleculares. Sin embargo, en Querétaro se encuentran en ciernes; es por ello que el propósito de este estudio, es evaluar los factores de resistencia a los antimicrobianos y la virulencia en aislamientos del género *Klebsiella spp* de personas que recibieron atención médica en centros de salud, ya que al tener caracterizados estos factores: se tendrán nuevas propuestas de diagnóstico, que llevará a un tratamiento más oportuno y certero, se podrán implementar estrategias para evitar la propagación masiva y por último, el incremento del conocimiento local de este microorganismo y así ser un referente de comparación a nivel regional y nacional e internacional (Secretaria de salud, 2017).

1.1. Antecedentes

1.1.1. Importancia de IAAS

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) como “a las infecciones que afectan a un paciente hospitalizado u otro centro sanitario, que no estaba presente ni incubándose al momento del ingreso”. Incluyen también las infecciones que se contraen en el hospital, pero se manifiestan después del alta, así como las infecciones ocupacionales del personal del centro sanitario (OMS, 2017).

De acuerdo con el Reporte hospitalario de vigilancia epidemiológica (RHOVE) del año 2015, el microorganismo *Klebsiella pneumoniae* se encuentra en el tercer lugar como agente etiológico de IAAS, justo por debajo de los microorganismos *Escherichia coli* (primer lugar) y *Pseudomonas aeruginosa* (segundo lugar). Sin embargo, En los últimos 5 años, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *A. baumannii* han presentado una tendencia ascendente (ver figura 1) (Secretaria de salud, 2017).

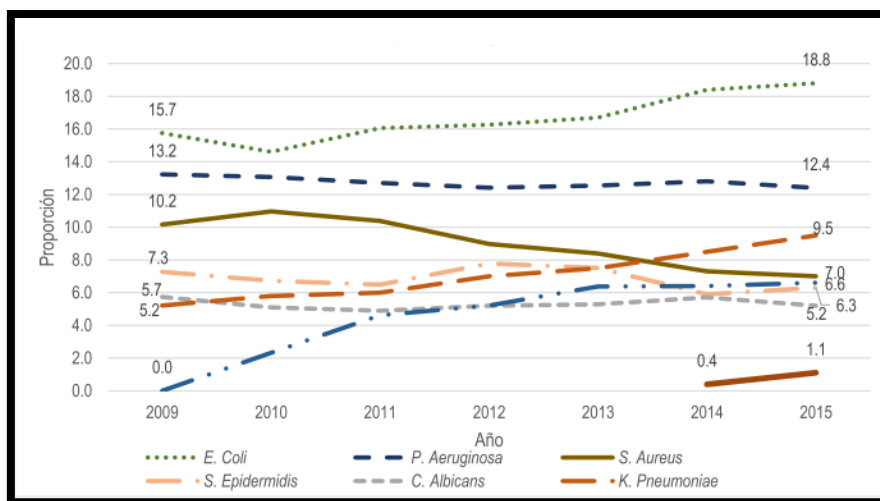


Figura 1 Proporción de agentes asociados con la mayoría de las IAAS, Unidades RHOVE, México 2009-2015 (Secretaria de salud, 2017).

En México, para el año 2015, los principales microorganismos aislados en brotes de IAAS fueron *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* que concentran el 43.5% de los brotes notificados (Secretaría de salud, 2017). Además de tener una estimación de IAAS que varía del 2.1% al 21 % debido a que los hospitales pueden tener variaciones en cuanto a la frecuencia en el uso de procedimientos invasivos, se puede realizar una comparación entre las instituciones mediante tasas por procedimiento aplicado en la instancia de salud (ejemplo: infección asociada a catéter por 1000 días catéter) con la finalidad de homologar las condiciones del paciente (Secretaría de Salud, 2019).

Actualmente, las IAAS ocasionadas por el grupo bacteriano ESKAPE son una causa importante de morbimortalidad que conllevan una trascendencia socioeconómico, ya que conlleva un gasto para los sistemas de salud, pacientes y familiares (Marlenne & Salgado, 2018).

1.1.2. Introducción a ESKAPE

De acuerdo con Rice en 2009, tanto en los hospitales de países desarrollados como en vías de desarrollo, existe un grupo de microorganismos denominado ESKAPE nombrado así por la primera letra de cada especie (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter spp.*). que son particularmente importantes ya que presentan alta frecuencia a nivel mundial en IAAS y perfiles altos de resistencia a los antimicrobianos. Es por ello que se convierten en un grupo muy importante de estudio ya que prevalece en los hospitales y cada vez más son resistentes a muchos de los agentes antimicrobianos. Debido a la notable incidencia bacteriana en los

hospitales principalmente, la sociedad americana de enfermedades infecciosas (IDSA) acuñó el término de ESKAPE que actualmente es de uso común para este grupo de bacterias, además presentó un reporte de los principales mecanismos de resistencia (Boucher et al., 2009). Una de las características de estos microorganismos es su alta multiresistencia a los fármacos.

Tabla 1 Grupos de antibióticos para categorizar la multiresistencia a *K. pneumoniae* (Jiménez Pearson et al., 2020)

Grado de resistencia de <i>K. pneumoniae</i> :	Grupos de antibióticos
	Amoxicilina- ácido clavulánico o Ampicilina- sulbactam
MDR: Resistente a 3 de los 12 Grupos de antibióticos.	Piperacilina, tazobactam Ceftazidima, Cefotaxima/ceftriazona o cefepima
XDR: Resistente a 10 u 11 de los 12 Grupos de antibióticos.	Imipenem o meropenem Aztreonam Gentamicina
PDR: Resistente todos los grupos de antibióticos	Amikacina Tigeciclina Colistina Fosfomicina Ciprofloxacino Trimetoprima-sulfametoxazol

Los microorganismos multiresistentes a los fármacos (MDR por sus siglas en inglés), se define como la resistencia adquirida a al menos 3 de los 12 grupos de antibióticos (ver tabla 1) (Jiménez Pearson et al., 2020).

Las IAAS por microorganismos MDR han ido en aumento, ya que las deficientes prácticas del lavado de manos en trabajadores de salud, la

transmisión de genes de resistencia y la falta en la limpieza y desinfección del ambiente hospitalario son factores que contribuyen a la etiología del fenómeno (Sosa et al., 2019).

Durante la 68.^a Asamblea Mundial de la Salud realizada en mayo de 2015, se dictaminó el plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos, el cual hace énfasis en la amenaza de estas resistencias para la salud humana. Dentro de los objetivos estratégicos enunciados en el plan, se considera reforzar los conocimientos a través de la vigilancia e investigación.

La vigilancia epidemiológica de la resistencia a los antimicrobianos permite determinar la carga que suponen estas resistencias y aportar la información necesaria para pasar a una acción sólida y conjunta desde lo local, nacional y Mundial (World Health Organization, 2017).

Por su parte la OMS fundó el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (GLASS) en octubre de 2015, el cual se está desarrollando para respaldar el plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos y publicó un listado de bacterias con los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana y para las cuales se necesitan nuevos antibióticos (Tacconelli & Magrini, 2018). El objetivo es coadyuvar a la vigilancia y la investigación mundiales para fortalecer la base de pruebas sobre la resistencia a los antimicrobianos y ayudar a informar las decisiones realizar e impulsar acciones nacionales, regionales y globales (OMS, 2018).

Por su parte, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) publicó las amenazas de la resistencia antimicrobiana en estados unidos, donde *K. pneumoniae* se encuentra en la lista de las principales enterobacterias con mecanismos de multiresistencia a los antibióticos (CDC, 2019). Con esta información, se puede determinar que la multiresistencia constituye una amenaza

creciente para la salud pública mundial, ya que este hecho necesita ser trabajado en conjunto desde distintas áreas de salud y gobierno (Secretaría de Salud, 2019).

Históricamente, *Klebsiella spp* ha causado serias patologías tales como infecciones en tracto urinario, neumonías y bacteriemias, además de tener una estrecha relación con las IAAS en individuos cuyo sistema inmune se encuentra comprometido (Paczosa & Mecsas, 2016).

1.1.3. *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae, fue descrita por microbiólogo alemán Theodor Albrecht Edwin Klebs en 1875 de pacientes que presentaban neumonía, sin embargo, fue hasta 1882, cuando Carl Friedländer la reconoció como bacteria. Morfológicamente, es un microorganismo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, presenta cápsula, es no móvil, fermentador de la lactosa y glucosa a las 24 horas, es positiva para las pruebas de urea, Voges Proskauer (VP), o-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG), citrato, descarboxilación de la lisina (LDC), descarboxilación de la ornitina (ODC) y catalasa. Mientras que es negativa para las pruebas de indol, DNAsa y arginina dihidrolasa (ADH) (Lopardo et al., 2016).

Esta bacteria se encuentra en aguas residuales, efluentes industriales, suelo, vegetación y agua; forma parte del microbiota habitual de los individuos y es capaz de colonizar distintas partes del cuerpo como las mucosas (Lai et al., 2019).

Actualmente se han descrito tres fenotipos: *K. pneumoniae* clásica (Kp-c), *K. pneumoniae* hiper mucoviscosa (Kp-hmv) y *K. pneumoniae* hipervirulenta (Kp-hv). Por lo tanto, aunque pertenezcan al mismo

género y especie tienen diferencias orientadas principalmente en los factores de virulencia, lo que representa su etiología en distintos hábitats incorporando un reto para la práctica clínica la distinción de estos, por medio de las pruebas bioquímicas convencionales (Russo & Marr, 2019).

Kp-c puede ocasionar infecciones graves en pacientes críticamente enfermos, recién nacidos, individuos inmunodeprimidos o aquellos con otros factores de riesgo en los establecimientos sanitarios (Follador et al., 2016).

Kp-hmv fue reportada por primera vez en un absceso primario de hígado. A diferencia del fenotipo hipervirulento, no puede causar infecciones en individuos sanos, además este fenotipo presenta una mucoviscosidad de la colonia, evidenciando la característica hipermucoviscosa (Catalán-Nájera et al., 2017; Rodríguez Medina et al., 2019).

Kp-hv, es un fenotipo en evolución que se caracteriza por ser más virulenta que la Kp-c e incluso puede llegar a infectar a los individuos de la comunidad que se encuentren sanos (Lai et al., 2019). Se documentó su aparición desde 1986 en Taiwán, China; como resultado de absceso hepático asociado con endoftalmitis séptica, sin embargo, su diseminación por todo el mundo es inevitable (Catalán-Nájera et al., 2017). Si bien es cierto que este microorganismo se encuentra en el intestino, es capaz de colonizar otros tejidos causando meningitis, abscesos epidurales, endoftalmitis, neumonía, bacteriemia absceso hepático y necrosis en piel y hueso (Choby et al., 2020). Entre los factores asociados a su hipervirulencia destacan los serotipos capsulares (K1 y K2) y plásmidos de virulencia (pLVPK) dentro del cual, contiene genes asociados para la hipermucoviscosidad como *mpA* y *wabG* adicionalmente, las cepas con este fenotipo se han identificado

por la tipificación de multilocus de secuencias (MLST) como las secuencias tipo (ST) 23 y 163.

Actualmente en la práctica clínica, no se puede tener la certeza para determinar un fenotipo de hipervirulencia hasta que un método molecular confirme la expresión de los genes (Lee et al., 2017).

Por otra parte, a través de técnicas moleculares y de secuenciación, se han identificado nuevas especies dentro del género *Klebsiella spp*, que no es posible diferenciar de *K. pneumoniae* mediante técnicas bioquímicas convencionales; Esta identificación se ha basado en su filogenia como se observa en la figura 2 (Martínez-Romero et al., 2018). Dentro de éstas, las especies más comunes son *K. quasipneumoniae* y *K. variicola*, lo que hace que las técnicas moleculares sean las más adecuadas para una correcta clasificación.

Recientemente gracias a las tecnologías de secuenciación, la taxonomía del género *Klebsiella* se ha expandido, lo que ha permitido la caracterización nuevas especies y subespecies como se muestra en la figura 2 (Wyres et al., 2020):

- I. *Klebsiella pneumoniae* (Kp1)
- II. *Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae* (Kp2)
- III. *Klebsiella variicola subsp. variicola* (Kp3)
- IV. *Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoniae* (Kp4)
- V. *Klebsiella variicola subsp. tropica* (Kp5)
- VI. *Klebsiella quasivariicola* (Kp6)
- VII. *Klebsiella africana* (Kp7)

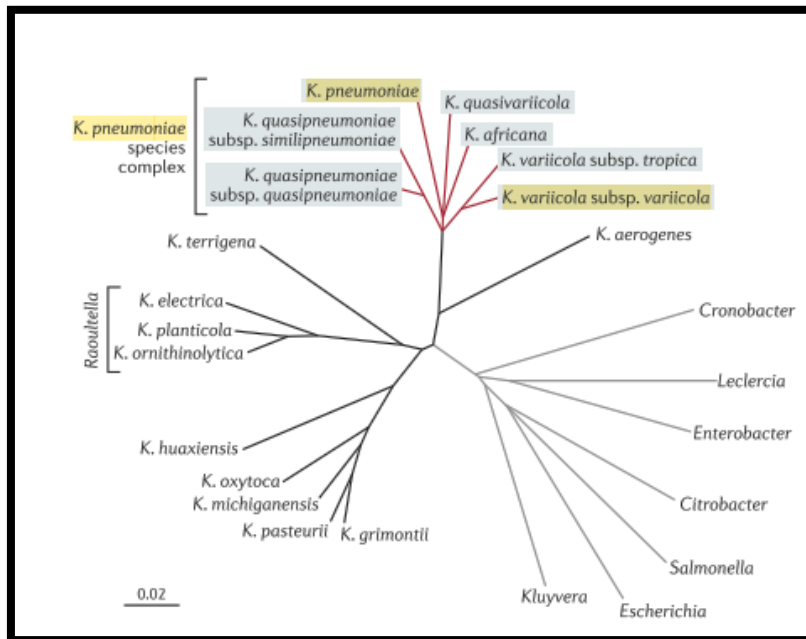


Figura 2 Árbol filogenético de *Klebsiella* spp. (Wyres et al., 2020)

1.1.4. *Klebsiella quasipneumoniae*:

El aislamiento inicial de *K. quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae* y *K. quasipneumoniae subsp. similipneumoniae* se limitaba en gran medida a la agricultura y medio ambiente (agua y suelo). Sin embargo, este microorganismo se encuentra como colonizador comensal del intestino, sistema respiratorio, vías urinarias, sangre y por ende en cualquier parte del ambiente hospitalario, incluso hay reportes donde se tiene una comorbilidad con pacientes con cáncer (Hala et al., 2019; Mathers et al., 2018). Antes de su caracterización como especie en 2014, de manera errónea se le identificaba como *K. pneumoniae* ya que los equipos automatizados no contaban con la capacidad para diferenciar la especie aún con los escasos datos bioquímicos diferenciadores (fermentación de adonitol L- sorbosa y 3-fenil propionato) (ver tabla 2) (Brisse et al., 2014).

Sin embargo, para resolver el problema el equipo de trabajo de Brisse en 2014, propuso un análisis filogenético basado en cinco genes (*rpoB*, *fusA*, *gapA*, *gyrA*, y *leuS*) para diferenciar con mayor facilidad las especies del

género *Klebsiella* (Brisse et al., 2014; Martínez-Romero et al., 2018). Hasta la fecha lo que se utiliza es la presencia y naturaleza de la beta-lactamasa cromosómica de tipo *bla-OKP*, característica de *K. quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae* (Fonseca et al., 2017).

1.1.5. *Klebsiella variicola* (Kp3):

De acuerdo a los datos, el nombre de *K. variicola* deriva del latín y significa "habitante de diferentes lugares" ya que como las demás integrantes del género *Klebsiella* son ubicuas en la naturaleza (Rodríguez Medina et al., 2019). Este género se encuentra en tres hábitats principalmente: ambiente (agua, suelo y plantas), superficies mucosas de los mamíferos y en simbiosis con insectos. En México, *K. variicola* fue descrita como una nueva especie bacteriana en 2004 basado en el análisis filogenético de seis genes house keeping: *rpoB*, *gyrA*, *nifH*, *infB* *phoE* y *mdh* (Ulises Garza-Ramos et al., 2015).

Los aislamientos de *K. variicola* y *K. pneumoniae* tienen características fenotípicas y bioquímicas similares (Martínez-Romero et al., 2018), De acuerdo al estudio realizado por Barrios Camacho en 2019, la prevalencia de *K. variicola* frente a *K. pneumoniae* es de 2.1% (Ulises Garza-Ramos et al., 2015). La diferenciación entre estas dos especies aún no se ha logrado utilizando pruebas bioquímicas convencionales o métodos automatizados. *K. variicola* ha sido aislada especialmente de sitios estériles, principalmente sangre y orina. No obstante, debido a su dificultad de diferenciación con otros géneros, se desconoce desde cuando pertenece al ambiente hospitalario. Su identificación puede sospecharse frente a una fermentación negativa al adonitol, sin embargo debe ser confirmada por secuenciación del gen *rpoB* (codifica a la sub unidad B de la ARN polimerasa)(Lopardo et al., 2016).

Al igual que *K. pneumoniae*, se considera un patógeno oportunista capaz de colonizar otros tejidos en condiciones de inmunosupresión y es responsable

de infecciones en tracto urinario, respiratorio y bacteriemias (Rodríguez Medina et al., 2019). En términos de virulencia, de acuerdo con el estudio de Rodríguez en 2019, se abordan tres fenotipos para este microorganismo: Clásica (cKv), Hipervirulenta (hvKv) e hipermucoviscosa (hmvKv) (Rodríguez Medina et al., 2019). Además, una característica interesante que se reportó sobre la frecuencia de aislamiento de *K. variicola*, es la asociación con pacientes mayores de 80 años (Imai et al., 2019).

Tabla 2 Características bioquímicas entre *Klebsiella* spp.

	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	<i>K. variiicola</i> .	<i>K. quasipneumoniae</i> sp.	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>
Hidrólisis de urea	+	+	+	-	-
ONPG	+	+	+	+	-
Voges Proskauer	+	+	+	-	-
Malonato	+	+	+	-	+
Descarboxilación de lisina	+	+	+	v	-
Acidificación de Adonitol	+	-	v	+	+
Acidificación de L-sorbose	-	+	v	-	-
Uso de 3-fenilpropionato	-	-	v	-	-
Uso de 5-ceto-D-gluconato (48 h)	-	+	-	-	-
Uso de ácido tricarbálico	-	+	+	-	-

Nota: v representa la variabilidad entre el 20 y 80 %, modificado de Brisse et al., 2014

1.1.1. Estudios epidemiológicos del mundo y México

Por medio de los estudios epidemiológicos endémicos, se pueden establecer medidas que conlleven a la prevención, control y la poca dispersión de cepas resistentes a los antimicrobianos. Las IAAS atribuidas a *K. pneumoniae*, representan un problema en las unidades pediátricas, neonatos, unidades de quemados y de cuidados intensivos (UCI) principalmente, debido a la inmunosupresión de los pacientes en dichas áreas y la presencia de cepas

multirresistentes (Cubero González, 2015). Por este motivo en 2018 la OMS se publicó un listado donde se muestran los microorganismos patógenos prioritarios cuyos perfiles de resistencia a los antibióticos es alto a nivel mundial, con el fin de dar prioridad a la investigación y desarrollo de nuevos y eficaces tratamientos con antibióticos. Dentro del listado, existen 3 categorías: media, alta y crítica donde *K. pneumoniae* se encuentra catalogada como prioridad crítica con base en la urgencia (Tacconelli & Magrini, 2018). Por otra parte, esta especie productora de carbapenemasas representa un serio problema emergente, ya que aunque hay variaciones por zona geográfica en el mundo, la mayoría de estas se encuentran en ambientes hospitalarios con tasas de 44% en Latinoamérica, 6.7% en Estados Unidos, 22.4% en Asia y 13.3% en Europa (Espino et al., 2018).

En México, gracias a los estudios epidemiológicos, se sabe que *K. pneumoniae* es una de las 3 primeras causas de IAAS, lo cual representa el 9.5%. Representando el primer lugar dentro terapia intensiva neonatal, segundo lugar en unidades de terapia intensiva pediátrica. además es el segundo agente etiológico más común de las bacteriemias y asociadas a algún proceso invasivo, el tercero en neumonía asociada a la atención de salud y ventilador, cuarto en infección de vías urinarias y asociación de infección quirúrgica (Secretaría de salud, 2017).

El tratamiento de primera elección en infecciones relacionadas a bacilos Gram negativos se basa en el uso de antibióticos beta-lactámicos ya que mantienen su actividad bactericida por 24 horas además de ser la prescripción del 65 % de los antibióticos en Estados Unidos (Espino et al., 2018).

1.1.2. Antibióticos β Lactámicos.

Los antibióticos β -lactámicos, constituyen una familia de antimicrobianos muy numerosa y bastante utilizada en la práctica clínica, además tienen una toxicidad baja a comparación de otros grupos (Suárez & Gudiol, 2009).

El mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de la última etapa de la pared celular bacteriana (peptidoglicano), esto ocurre debido a que las transpeptidasas y carboxipeptidasas que son enzimas responsables de la transpeptidación se unen covalentemente a la penicilina y a los otros antibióticos del grupo (Eyler & Shvets, 2019). Otro mecanismo de acción de estos antimicrobianos es la activación de una autolisina bacteriana endógena que elimina toda la capa del peptidoglucano, además las cepas que no poseen la autolisina tienden a dejar de crecer en presencia del antibiótico β -lactámico, sin embargo no se destruyen en su totalidad (Peña, 2016).

A continuación, se muestra en la figura 3 la estructura química de los antibióticos β -lactámicos los cuales se constituyen por un anillo principal (anillo β -lactámicos constante) y un anillo secundario (variable):

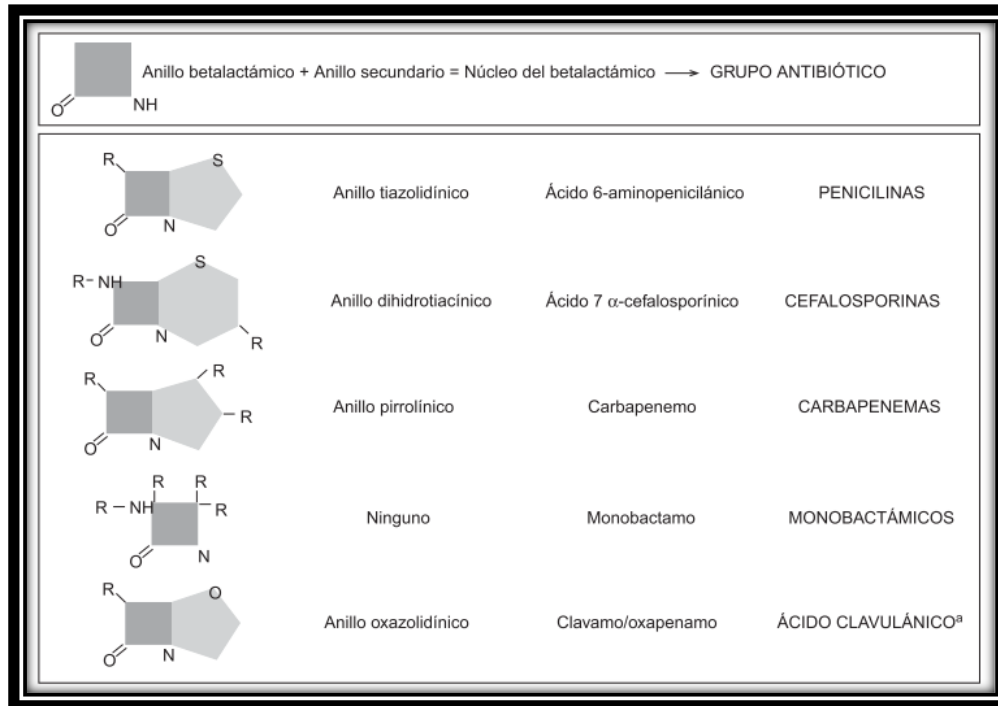


Figura 3 Estructura química de los β -lactámicos (Suárez & Gudiol, 2009)

La presencia del anillo β -lactámico define químicamente a esta familia de antibióticos y además le confiere su mecanismo de acción. Actualmente existen distintos grupos de β -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos y ácido clavulánico (Suárez & Gudiol, 2009).

Este tipo de antibióticos se ha usado para el tratamiento de IAAS por mucho tiempo por lo que actualmente se encuentra registrada su resistencia a lo largo del mundo (Lee et al., 2016).

1.1.3. Factores de resistencia

El descubrimiento de agentes antimicrobianos potentes y seguros es posiblemente el mayor avance en la atención de la salud de la historia, reduciendo la morbilidad y mortalidad considerablemente y aumentando la esperanza de vida. La resistencia a los antimicrobianos de *K. pneumoniae* es un tema anterior al siglo XXI tanto para México (Silva et al., 2000), como para otros países (china) (Schooneveldt et al., 1998), Estados Unidos (Nordmann et al., 2011), Colombia (Villegas et al., 2006), Canadá, Italia, sin embargo al transcurrir los años se han realizado más investigaciones que logran reforzar y aumentar el conocimiento de estos mecanismos.

En 1996 se registró la primera cepa con enzima carbapenemasa (KPC) en un hospital de Carolina del Norte en Estados Unidos, la cual fue presentada a CDC como parte de un proyecto epidemiológico (Munoz-Price et al., 2013). El tratamiento de elección para las infecciones asociadas a *Klebsiella spp* normalmente son las cefalosporinas (Rosenthal, 2013); sin embargo, el empleo tan frecuente de estos antibióticos en las últimas décadas ha propiciado en la transmisión de mecanismos de resistencia mediada por elementos genéticos móviles como los plásmidos, transposones e integrones (Martínez R. et al., 2016).

Los antibióticos β -lactámicos son ampliamente utilizados para tratar infecciones causadas principalmente por el grupo *Enterobacteriaceae*, sin embargo, el uso o mal uso de tales antibióticos ha contribuido a la aparición de cepas resistentes a carbapenémicos (Reyes et al., 2019).

El uso excesivo de antibióticos β -lactámicos ha originado la aparición de diversos mecanismos de resistencia bacteriana que limitan su uso en la práctica clínica (Aires-De-Sousa et al., 2019). A continuación, se describen los cuatro principales mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos (Cubero González, 2015):

a) Bombas de expulsión activa:

El sistema de transporte está conformado por proteínas presentes en la membrana especializadas que tienen la función de capturar y expulsar activamente los antibióticos del citoplasma a la membrana celular para que no ejerzan su efecto en los sitios diana dentro de la bacteria. Este proceso se lleva a cabo gracias a la energía de protones o sistemas relacionados con ATP. Las bombas de salida activas AcrAB y OqxAB se detectan con frecuencia en *Klebsiella pneumoniae* (Li et al., 2020).

b) Modificación de la permeabilidad de la membrana externa:

La membrana externa de las bacterias Gram negativas supone para los antibióticos β -lactámicos una barrera que deben atravesar antes de unirse a las PBPs. Al ser hidrófilos los antibióticos β -lactámicos, no se difunden bien a través de la membrana externa y deben utilizar canales proteicos inespecíficos para atravesarla, denominados porinas. La resistencia a antibióticos β -lactámicos puede producirse por pérdida total o parcial de las porinas y modificación de las mismas. Normalmente, este mecanismo se asocia a la producción de β -lactamasas o la presencia de bombas de eflujo que bombean el antibiótico al exterior. En *K. pneumoniae* se han identificado dos porinas principales: OmpK35 y OmpK36 (Moreno-Monge, 2013).

c) Alteraciones en las proteínas fijadoras de penicilina (PBP's) o penicillin binding proteins:

Las enzimas PBP's tienen la función de favorecer la síntesis de peptidoglicano, sin embargo, también son el objetivo específico de los antibióticos β -lactámicos. Las modificaciones en su estructura impiden las interacciones normales con los antibióticos, lo que hace que las PBP pierdan su afinidad por los antibióticos β -lactámicos, lo que conlleva a una mayor resistencia bacteriana a los mismos. La sobreproducción de PBP también

conduce a una susceptibilidad reducida de las bacterias a los antibióticos β -lactámicos porque no hay suficientes moléculas antibióticas para saturar el exceso de PBP producido. (Santajit & Sirijan, 2016).

d) Producción de enzimas β -lactamasas:

Las β -lactamasas son enzimas hidrolíticas que destruyen el enlace amida existente en el anillo β -lactámico, de esta manera se activa el antibiótico de forma irreversible. Dentro de las enterobacterias, la síntesis de las β -lactamasas constituye el mecanismo de mayor importancia ante la resistencia a los antibióticos β -lactámicos y de adaptación bacteriana a los nuevos antibióticos β -lactámicos (Peña, 2016).

Estas enzimas se clasifican de acuerdo a la escala de Ambler según su estructura molecular de acuerdo al aminoácido localizado en el centro activo ya sea serina para A, C, D y Cisteína para los del grupo B. Dentro de la clase A existen familias de β -lactamasas denominadas TEM-1, SHV, KPC y CTX-M (Silveira et al., 2018).

Las β -lactamasas de la clase B presentan la característica que, además de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas, también hidrolizan al grupo de los carbapenémicos. Estas enzimas requieren zinc para realizar la inactivación del antibiótico, por lo que se conocen como metalo- β -lactamasas (M β L) y se pueden catalogar en este grupo de enzimas NDM, VIM, IMP, GIM, SPM, y SIM (Garza Ramos et al., 2009).

Las β -lactamasas de la clase D son las más comúnmente encontradas en aislamientos de IAAS donde se encuentra el grupo de enzimas OXA-48, OXA-1 y OXA-19 (Nordmann et al., 2011). En la figura 4 se muestran los principales mecanismos de resistencia a los β -lactámicos

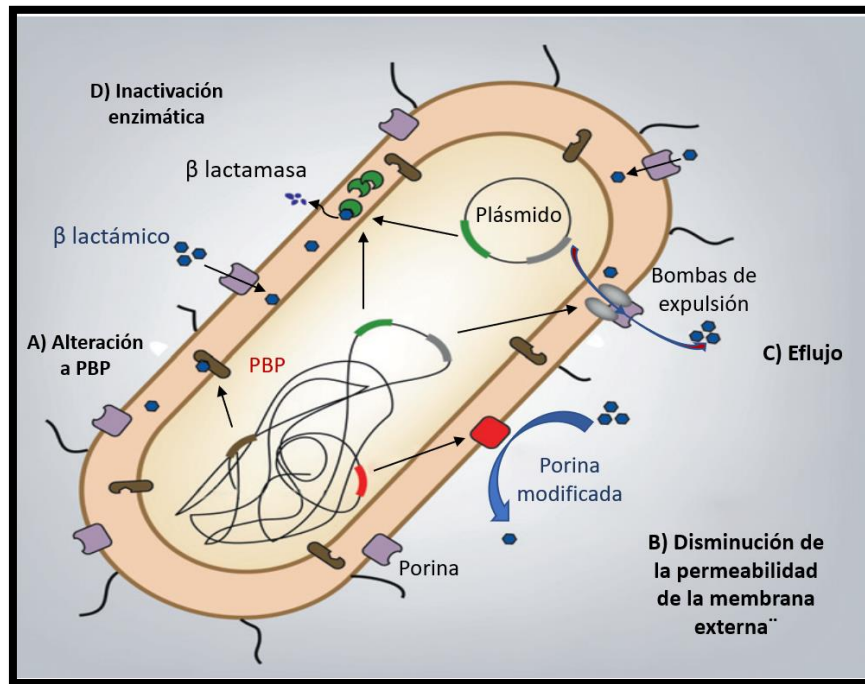


Figura 4 Principales mecanismos de resistencia a los β -lactámicos, traducido y modificado de (Cubero González, 2015).

Desde que *K. variicola* fue identificada en 2004 como nueva especie bacteriana, las investigaciones no se hicieron esperar para demostrar su rol como patógeno humano. En términos de la resistencia a los antimicrobianos, se han documentado cepas MDR como a la colistina relacionado a mecanismos cromosómicos (Rodríguez Medina et al., 2019).

Estudios moleculares demuestran que *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* y *K. variicola* comparten genes cromosómicos móviles codificantes para la resistencia a los antimicrobianos como: SHV, KPC, CXT-M, TEM y NDM que están distribuidos en todo el mundo (ver figura 5) (Rodríguez Medina et al., 2019).

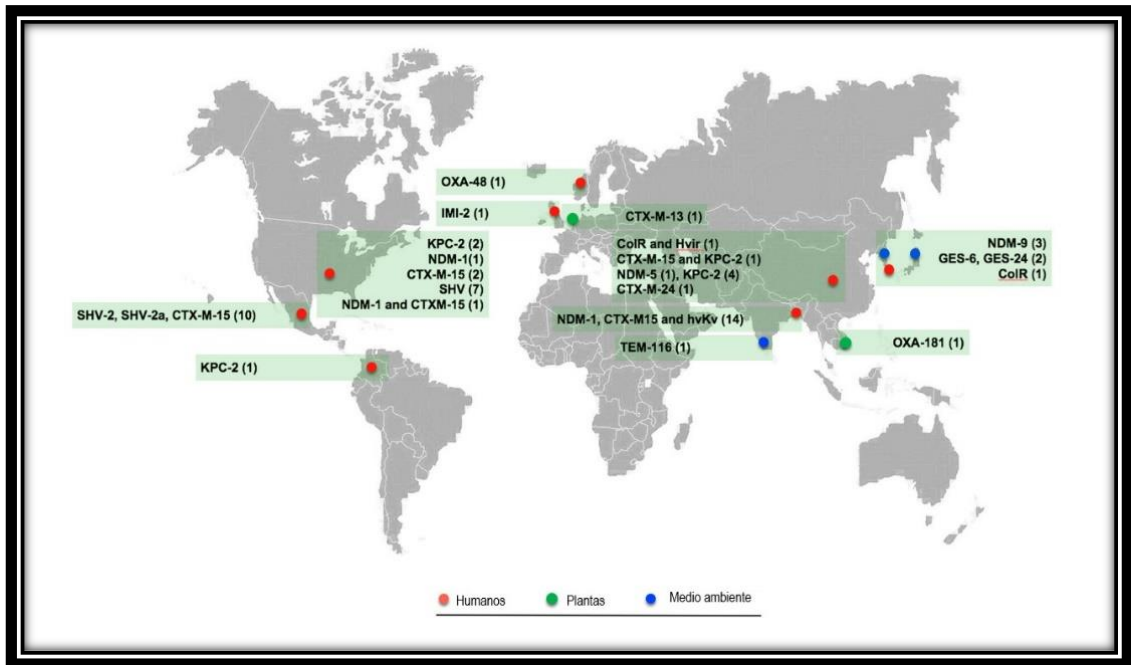


Figura 5 Diseminación de *K. variicola* en los distintos países y sus genes asociados a la resistencia a los antimicrobianos (Rodríguez Medina et al., 2019).

La disponibilidad para adquirir genes de resistencia por parte de *Klebsiella quasipneumoniae* apunta a la captación de plásmidos de otras especies de *Enterobacteriaceae* como por ejemplo el gen bla_{KPC} por medio de una transferencia horizontal (Mathers et al., 2019). Como evidencia de esto, hay reportes del gen bla_{KPC} en Arabia (Hala et al., 2019), la presencia de Metalo beta lactamasa en un hospital de neonatos en Nigeria (Brinkac et al., 2019) y bla_{KPC-2} en Singapur (Octavia et al., 2019).

1.1.4. Factores de virulencia

La capacidad para causar infecciones de *Klebsiella spp*, se centra especialmente a una serie de mecanismos implicados en la evasión del sistema inmune y en la invasión tisular. Entre los principales factores se encuentran (Cubero González, 2015):

1. Antígenos de superficie (antígeno K, antígeno O).
2. Las adhesinas (fimbrias o no fimbrias).
3. Los sideróforos.
4. Biofilm.
5. La actividad ureásica.
6. La hipermucoviscosidad.

1. Antígenos de superficie (antígeno K, antígeno O).

Los miembros al complejo de *Klebsiella pneumoniae* y todos los miembros del género *Klebsiella spp*. Como tal expresan dos tipos de antígenos en la superficie. El primero es el polisacárido capsular (antígeno K) y el otro es lipopolisacárido (LPS o antígeno O). Ambos antígenos contribuyen significativamente a la patogenicidad de las bacterias.

El antígeno O es el componente más externo de LPS en la membrana externa y consiste en polímeros de oligosacáridos repetidos, lo que le otorga una gran variabilidad química. La gran variabilidad encontrada en el antígeno O favorece la resistencia del complemento.

La resistencia al suero también está relacionada con el antígeno K y el número de cápsulas producidas, lo que conlleva una variabilidad en su composición. El polisacárido capsular es el factor de virulencia más importante, actúa como un elemento protector a las bacterias ante la fagocitosis por células polimorfonucleares y previene su muerte por factores séricos. (Paczosa & Mecsas, 2016).

2. Las adhesinas (fimbrias o no fimbrias).

Algunas de las enterobacterias producen cierto número de adhesinas que ayudan al organismo a adherirse/fijarse en las células huésped, lo cual es crucial para ejercer la infección en un sitio específico. Para la adhesión, *Klebsiella spp.* tiene fimbrias, que en su mayoría pueden pertenecer a dos tipos predominantes: tipo 1, sensible a manosa y tipo 3, resistente a la manosa, ambas tienen dos subunidades, las del tipo 1 tienen *Fim A* y *Fim H*, mientras que las del tipo 3 poseen *MrKD* (unión a matrices extracelulares, tejidos) *MrKA* (abióticas). (Lopardo et al., 2016).

3. Los sideróforos.

Un elemento vital para el desarrollo bacteriano es el hierro, sin embargo, en ocasiones, su disponibilidad puede ser limitada. Para solucionar este problema, *Klebsiella spp.* produce sideróforos, determinantes para la absorción de hierro, estos son quelantes que facilitan la extracción de hierro de la bacteria al unirse a las proteínas del huésped. Algunos de los sideróforos de *Klebsiella spp.* clasificados según su composición química, son enterobactina (*ent*), aerobactina (*iucA*), yersiniabactina (*ybtS*), u otros sideróforos como el codificado por *iutA* y el sistema de detección de hierro *kfu*.(Lopardo et al., 2016).

4. Biofilm.

El biofilm se define como una población de células unidas irreversiblemente, está recubierta por una matriz hidratada de sustancias exopoliméricas, proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos. Su formación es una evolución compleja que implica: en una primera instancia la fijación e inmovilización sobre una superficie, después se lleva a cabo la interacción entre células, se forman microcolonias en el sitio, se forma una capa confluyente organizada, y por último se lleva a cabo la lisis del conglomerado bacteriano desarrollando una estructura tridimensional. Además, existen

genes relacionados con el biofilm como: *fabZ* y *lpxC* para la homeostasis y para la formación de *yfgL* o *BamB*. (Chung, 2016; Wang et al., 2020).

5. La actividad ureásica.

Klebsiella spp. Tiene la habilidad para metabolizar urea como fuente de nitrógeno gracias a una enzima ureasa citoplasmática que descompone la urea en dióxido de carbono y amoníaco; este último puede alterar la estabilidad de los tejidos y juega un papel importante en la persistencia de algunos patógenos. Sin embargo, la incapacidad para metabolizar la urea puede reducir la capacidad de colonización y la persistencia de las bacterias en ambientes donde la urea es abundante, como el tracto digestivo. (Paczosa & Mecsas, 2016).

Los genes que son funcionales o estructurales son un trímero que se encuentra en los genes *ureA*, *ureB* y *ureC*. La generación de la enzima ureasa funcional requiere la presencia y expresión de algunos genes accesorios como: *ureD*, *ureF*, *ureG* y *ureE* (D. Kim et al., 2019).

6. La hipermucoviscosidad.

Las distintas cepas que son hipervirulentas de *Klebsiella spp.* con serotipos que se relacionan con una alta producción de polisacárido capsular, son capaces de infectar incluso a personas sanas (inmunocompetentes) ya que causan infecciones adquiridas en la comunidad como abscesos cerebrales piógenos, abscesos hepáticos, endoftalmítis y neumonía entre otras. Las cepas hipervirulentas suelen presentar un fenotipo hipermucoviscoso que puede ser debido a la expresión de dos genes: asociado a la mucoviscosidad (*magA*) y gen regulador del fenotipo mucoide A (*rmpA*, *rmpC* y *rmpD*) (Walker et al., 2020).

A continuación, se observa en la figura 6 los algunos de los factores de virulencia que posee *Klebsiella spp*

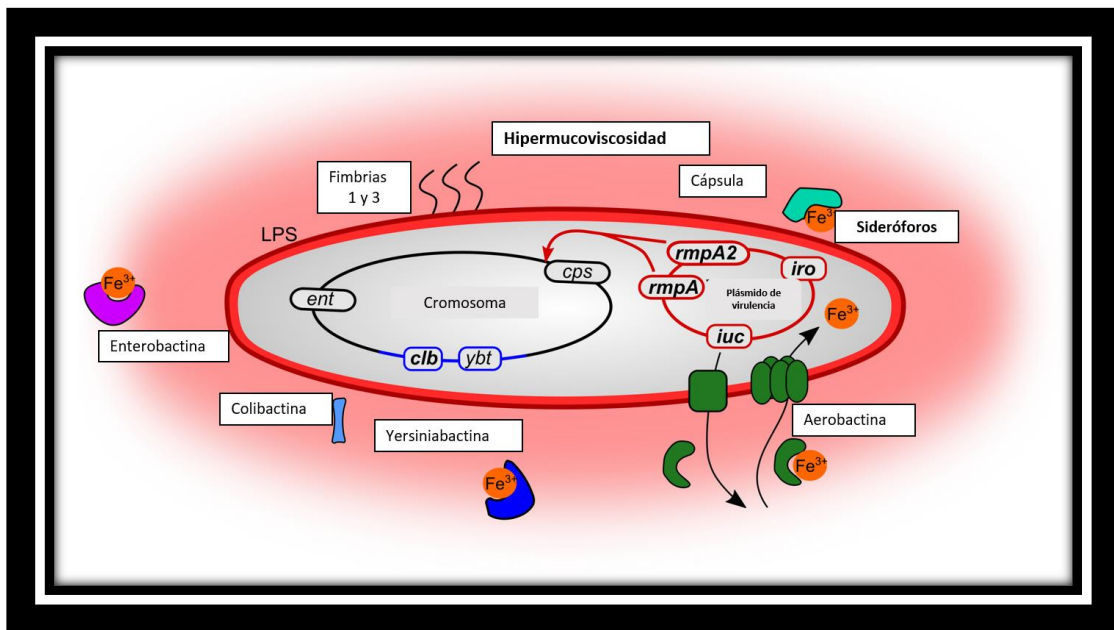


Figura 6 Principales factores de virulencia de *Klebsiella spp* traducido de (Choby et al., 2020).

1.1.5. Factores de virulencia descritos por especie

Los fenotipos de virulencia de *K. variicola* involucran genes de factores de virulencia como: *fimV*, *kvi*, *kva*, *iucA*, *iroB*, *rmpA2*, cápsula, LPS y fimbrias tipo 3 (Rodríguez Medina et al., 2019).

Análisis *in silico* de *K. pneumoniae* y *K. variicola* revelan que comparten una virulencia asociada en genes que codifican principalmente a sideróforos, metabolismo de urea, enzimas de biosíntesis del LPS y fimbrias. Por otro lado el gen *FimV* podría considerarse un carácter común en las cepas de *K. variicola* que las distingue de las de *K. pneumoniae*; ya que la mayoría de las cepas de *K. variicola* contienen este gen (Martínez Romero et al., 2018).

Un estudio realizado en 2020, demuestra la conjugación del plásmido pKV8917 de *K. pneumoniae* a *K. variicola* como portador de nuevos determinantes de hipermucoviscosidad y cápsula aunado a la capacidad intrínseca de *K. variicola* de contener plásmidos que conllevan a la

resistencia a los antibióticos y genes de virulencia (Rodríguez Medina et al., 2020).

Por parte de *K. quasipneumoniae* existen reportes entorno a los factores de virulencia reportados en ambiente hospitalario, tales como cápsula, proteínas de adhesión de fimbrias, sideróforos y sistemas de secreción tipo VI (Martínez Romero et al., 2018; Mathers et al., 2019).

Se reportó en Italia la primera cepa hipermucoviscosas de *K. quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae* por medio de la secuenciación del ADN genómico de *FI_HV_2014* donde cabe destacar que los genes *rmpA* y *rmpA2* no fueron encontrados mientras que el alelo capsular *wzi* sí se encontró (Arena et al., 2015).

2 Objetivos

2.1 General

Caracterizar molecular y fenotípicamente los aislamientos de *Klebsiella spp.* de interés clínico y epidemiológico obtenidos en hospitales de Querétaro.

2.2 Particulares

1. Identificar *K. pneumoniae*, *K. variicola* y *K. quasipneumoniae* por medio de PCR Multiplex en muestras provenientes de aislamientos clínicos.
2. Determinar el fenotipo y genotipo de resistencia de *Klebsiella spp.* provenientes de aislamientos clínicos.
3. Determinar el fenotipo y genotipo de virulencia de *Klebsiella spp.* provenientes de aislamientos clínicos.
4. Analizar las características relacionadas a la procedencia del aislamiento con su resistencia y virulencia.

3 Metodología

3.1 Diseño

El diseño de este proyecto de investigación es de tipo observacional, transversal, retrospectivo.

3.1.1 Definición del Universo

Aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* recolectadas en hospitales de SESEQ de Querétaro.

3.1.2 Tamaño de muestra

Todos los aislamientos de *K. pneumoniae* obtenidos durante el periodo de enero a octubre de 2019 que cumplan con los criterios de selección (axénicos y recuperables)

3.1.3 Criterios de inclusión

Microorganismos aislados e identificados como *K. pneumoniae* mediante pruebas bioquímicas en los departamentos de microbiología de laboratorios de los hospitales SESEQ, durante el periodo de muestreo.

3.1.4 Criterios de exclusión

Aislamientos que no cuenten con la información completa del informe de laboratorio.

3.1.5 Criterios de eliminación

Microorganismos que no lograron resistir a los procesos de conservación bacteriana durante el estudio o que se encuentre contaminados con una cepa de otra especie bacteriana.

3.2 Definición de variables y unidades de medida

Tabla 3 Variables y unidades de medida del estudio

Variable	Definición	Unidad de medida	Tipo de variable
Fenotipo de carbapenemasa	Expresa un fenotipo de carbapenemasa	Ausente o presente	Cualitativa/Nominal
Genotipo de carbapenemasa	Se identifican uno o varios genes codificantes para la enzima.	IMP, VIM, OXA,	Cualitativa/Nominal
Genotipo de β-lactamasas	Se identifican uno o varios genes codificantes para la enzima.	SHV, CTX-M, TEM y NDM	Cualitativa/Nominal
Cepa con Hipermucosidad ("String test")	Expresa el fenotípicamente la producción de hipermucoviscosidad	Se expresa o no se expresa.	Cualitativa/Nominal
Biofilm	Expresa fenotípicamente este tipo de estructura.	Ausente o presente	Cualitativa/Nominal
Genotipo de virulencia	Se identifican uno o varios genes de virulencia	<i>rmpA2</i> , <i>iucA</i> , <i>Irp2</i> , <i>wzyK1</i> , <i>wzyK2</i>	Cualitativa/Nominal

3.3 Metodología

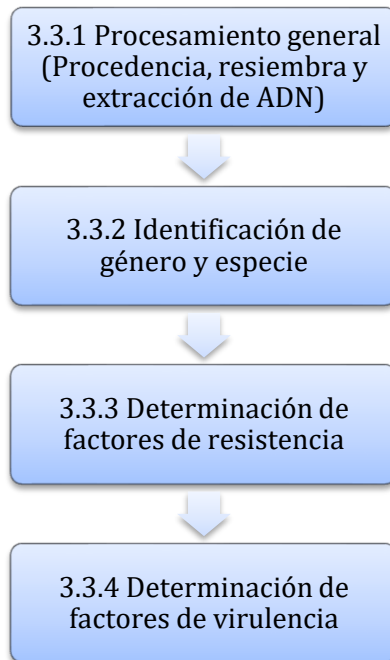


Figura 7: Esquema del procesamiento general de las muestras

3.3.1 Procesamiento general

Procedencia de los aislamientos.

Los aislamientos clínicos identificados como *K. pneumoniae*, fueron recolectados durante el periodo de enero a diciembre de 2019 como parte del proyecto de investigación registrado ante el Consejo Universitario (número de registro FME201809), por lo cual las cepas de trabajo ya se encontraban dentro del cepario del laboratorio de enfermedades infecciosas y microbiología clínica en la facultad de medicina de la UAQ. Las cepas fueron conservadas dentro del laboratorio en caldo BHI con 15% de glicerol a -70°C. Los resultados de susceptibilidad a antimicrobianos se determinaron en el laboratorio donde fueron procesadas e identificadas las muestras de origen, por medio del equipo semiautomatizado VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), utilizando la tarjeta AST-GN70 que corresponde para los microorganismos Gram negativos.

Condiciones de resiembra de los aislamientos

A partir de las cepas conservadas dentro del laboratorio en caldo BHI con 15% de glicerol a -70°C, se sacaron del congelador y se colocan en un termobloque frío para evitar el descongelamiento. Una vez en la campana de trabajo, se tomó una asada de esta (raspadora del congelado) y por el método de estría cruzada se sembró en toda la placa, la cual contiene agar Luria-Bertani y se regresó a congelación la cepa original. Posteriormente se incubó de 24 horas a 37 °C.

Extraction de ADN (Wizard® Genomic DNA Purification Kit)

Se centrifugó 1 mL de un cultivo de una noche en agar LB por 2 minutos entre 13000 y 16000 g y se descartó el sobrenadante. Lisado de células: Se añadieron 600 µL de solución de lisis y pipeteó hasta su mezclado, posteriormente se incubó por 5 minutos a 80 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se adicionaron 3 µL de la solución ARNasa, se

mezcló e incubó a 37°C por entre 15- 60 minutos, pasado el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Precipitación de proteínas: Se añadió 200 µL de la solución precipitadora de proteínas y mezcló en el vortex, se incubó en hielo por 5 minutos y posteriormente se centrifugó por 3 minutos a 13000 g. Precipitación y rehidratación del ADN: Se transfirió el sobrenadante del tubo a uno nuevo el cual contiene 600 µL de isopropanol y se mezcló. Se centrifugó y decantó el sobrenadante, añadiendo 600 µL de etanol al 70 % a temperatura ambiente y se mezcló. Se centrifugó por 2 minutos entre 13000 y 16000 g, se aspiró el etanol y se dejó secar el pellet por 10-15 minutos. Por último, se rehidrató el pellet de ADN con 100 µL de solución rehidratadora por una hora a 65 °C.

3.3.2 Confirmación de especie

Para la confirmación de especie de las cepas aisladas, se realizó una PCR-multiplex (Humberto et al., 2021) con el fin de diferenciar *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* y *K. variicola* en una reacción con un volumen final de 25 µL. A continuación, se muestra las condiciones generales de la PCR empleada (Tabla 4) y los oligonucleótidos necesarios para las diferentes especies (Tabla 5).

Tabla 4. Condiciones de generales de reacción PCR (volumen final 25 µL).

Reactivo	Volumen	[Final]
Agua	0.96 uL	----
Buffer	1 uL	1X
MgCl₂	1 uL	5 mM
dNTPs	1 uL	1 mM
*Oligonucleótidos-F/R	*0.4 uL	*0.4 pmol/uL
Taq polimerasa	0.04 uL	0.02 U
DNA templado	2uL	>50 ng
Etapa	Temperatura y tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	92°C/ 2 min	1x
Desnaturalización	92°C/ 30 s	30x
Alineación	60°C/ 30 s	
Extensión	72°C/ 40 s	
Extensión final	72°C/ 3 min	1x
Incubación	4°C / ∞	

Nota: * Se tendrán ajustes para el volumen únicamente de acuerdo con los cebadores utilizados.

Tabla 5. Oligonucleótidos para identificación de especies *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* y *K. variicola*.

Oligo	Gen	Secuencia	Tamaño	Especie
Kv275	Fosfoenolpiruvato mutasa	Kv275-F: ATTAATGTGCTGCCCGTCA Kv275-R: CCGACGGAAGTGGTAAACGA	275 pb	<i>K. variicola</i>
Kq372	Tripartite tricarboxilato transportador TctA	Kq372-F: GATCGCCCTGATCGGCTGCT Kq372-R: CCGAACGCCAGCGACCACTG	372 pb	<i>K. quasipneumoniae</i>
Kpn650	Diguanilato fosfodiesterasa	Kpn650-F: TGCTTGCCAATGTCTGGGAT Kpn650-R: TCTGGCCTGCGTCGCAGCAT	650 pb	<i>K. pneumoniae</i>

Nota: los controles positivos para la caracterización molecular:

- *K. pneumoniae* (13883)
- *K. variicola* (F2R9)
- *K. quasipneumoniae* (10441)

3.3.3 Determinación de Resistencia

Producción de carbapenemasas (Determinación fenotípica)

La detección de la presencia de carbapenemasas en las cepas aisladas se determinó por medio de la prueba bioquímica Carba NP descrito por el protocolo de Nordmann y Poirel (Nordmann et al., 2012).

Se resuspendieron entre 1 y 2 colonias de la cepa aislada (agar LB) en 100 μ L de buffer de lisis Tris-HCl 20 mmol / L, se agitó en vórtex por 1min y se incubó por 30 min a 25°C. Se centrifugó a 10,000 rpm, se mezclaron 30 μ L del sobrenadante en una microplaca de polietileno de 96 pocillos la cual contiene: 100 μ L de solución de 6 mg/ml de imipenem (6 mg/mL de monohidrato de imipenem, pH 7.8, rojo de fenol 0.05% y 0.1 mmol/L de ZnSO₄), y se incubó por dos horas a 37°C. La prueba se interpreta como positiva si hay un cambio de rojo a amarillo. Para el control positivo se realiza el mismo procedimiento colocando una cepa resistente a Imipenem (E. coli ATCC 15610 o 15704) y para el control del medio se realiza el mismo procedimiento mezclando la suspensión bacteriana con 100 μ L de una solución libre de Imipenem (Dortet et al., 2014).

Para preparar la solución de rojo de fenol, se mezclaron 2 ml de una solución de rojo fenol (Merck Millipore) al 0,5% (peso /vol) con 16,6 ml de agua destilada. Posteriormente se ajustó el a pH 7.8 adicionando gotas de NaOH 1 N.

Resistencia a polimixina (Determinación fenotípica)

La detección de la resistencia a las polimixinas en las cepas aisladas se determinó por medio de la prueba polimixin NP. Esta técnica permite la detección de la resistencia a colistina. Las bacterias fueron suspendidas en solución NaCl al 0.85% y se ajustó su absorbancia equivalente a 3 en la escala de McFarland (OD_{625nm} 0.38-0.45), para obtener una concentración aproximada de 9×10^8 UFC/mL. Posteriormente, en una placa de poliestireno de 96 pozos se inocularon 50 μ L de la suspensión bacteriana en 150 μ L de

medio de reacción (caldo Müller-Hinton adicionado con glucosa anhidra, rojo de fenol a un pH de 6.7) en presencia de colistina (5 µg/mL) y en ausencia de colistina. Se incubó por 2h a 37°C y un cambio de coloración de rojo a amarillo se consideró como positivo para la resistencia a colistina (Simar et al., 2017).

Determinación genotípica:

Para los genes relacionados con factores de resistencia a los antimicrobianos, Lo que se hizo fue tomar como punto de partida el gen más común y lo cuál en este trabajo nos enfocamos en los siguientes genes: *NDM*, *CTX-M1* y *CTX-M2* (Tabla 6) (Poirel et al., 2011).

Tabla 6. Oligonucleótidos específicos para genes de resistencia en *K. pneumoniae*.

	Oligo	Gen		Secuencia	Tamaño
Carbapenemasa	IMP	<i>bla_{IMP}</i>	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232
			IMP-R	GGTTTAAAYAAAACAACCACC	
	NDM	<i>bla_{NDM}</i>	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621
			NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC	
VIM	<i>bla_{VIM}</i>	VIM-F	GATGGTGTGGTTCGCATA	390	
		VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG		
OXA	<i>bla_{OXA}</i>	OXA-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	
		OXA-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG		
β-lactamasa	SHV	<i>bla_{SHV}</i>	SHV-F	ACT GAA TGA GGC GCT TCC	291
			SHV-R	TCT CAG CGC AAA TCC GCG	
	CTX-M1	<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M-F	GCTGTTGTTAGGAAGTGTGC	811
			CTX-M-R	GGTGACGATTTTAGCCGCC	
	CTX-M1	<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M-F	ATGATGACTCAGAGCATTCCG	884
			CTX-M-R	TTATTGCATCAGAAACCGTG	
TEM	<i>bla_{TEM}</i>	TEM-F	CAA CAT TTT CGT GTC GCC C	844	
		TEM-R	GCT TAA TCA GTG AGG CAC C		

Nota: Los controles positivos para las pruebas específicas de resistencia:

- Control NDM: cepa local del CICEI, INSP con número 15562
- Control *CTX-M-1*: cepa local del CICEI, INSP con número 11297

3.3.4 Determinación de virulencia

Determinación de hipermucoviscosidad (Determinación fenotípica)

El método para determinar la hipermucoviscosidad es el "string test", este método consiste en medir la viscosidad de una colonia que se encuentre en una placa de agar MacConkey. Por medio de un asa bacteriológica se picó la colonia y se levantó hasta ver el filamento/hilo máximo medido en milímetros. La prueba será considerada positiva si el filamento mide ≥ 5 mm como se muestra en la figura número 8 (Yang et al., 2020).

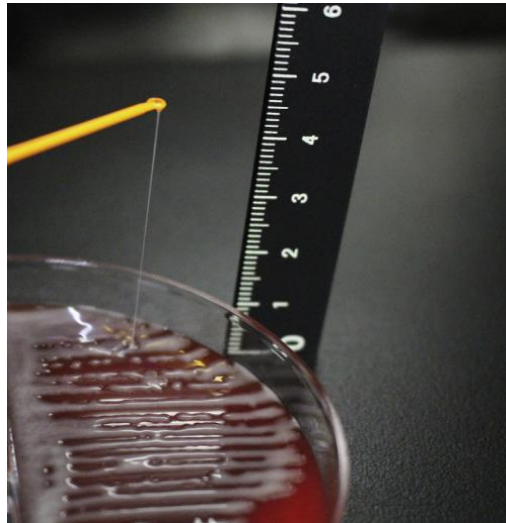


Figura 8 Demostración de la prueba de String Test (Kumabe & Kenzaka, 2014)

Producción de biofilm (Determinación fenotípica)

En un cultivo de una noche, se dejó incubando a 37 °C en agar LB. Se colocaron 180 μ L de caldo LB en un pocillo de la placa de poliestireno, se adicionaron 20 μ L de la suspensión bacteriana cultivada previamente en agar LB por una noche a concentración 0.5 McFarland para después incubarse por 18-20 h. a 37°C (por triplicado). Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados con 200 μ L PBS en inversión entre cada lavado, se dejó

secar y se adicionaron 200 μ L de safranina al 0.2% por 30 min. a 25°C. Se desecho el colorante y se lavó nuevamente con 200 μ L de PBS para secar por 20 min. Tras la adición del colorante sobre el biofilm, se solubilizaron la mezcla con 200 μ L de etanol: acetona (80:20 v/v) y se agitó suavemente durante 10 segundos para que posteriormente se leyera la densidad óptica a 492 nm en un lector de ELISA (Bandeira et al., 2014). La producción de biofilm se clasifica de la siguiente manera:

No productor = DO \leq DO control negativo.

Productor débil = DO \leq 2DO control negativo.

Productor moderado = 2DO control negativo < DO \leq 4DO control negativo.

Productor fuerte = 4DO control negativo < DO.

Determinación genotípica:

Para los genes relacionados con factores de virulencia, se realizó el análisis mediante PCR punto final (Candan & Aksöz, 2015), para las secuencias de *rmpA2*, *iucA*, *irp2*, serotipo capsular K1, K2 (Tabla 7).

Tabla 7. Oligonucleótidos específicos para genes de virulencia en *K. pneumoniae*.

Oligo	Gen	Secuencia	Tamaño
<i>rmpA2</i>	RmpA2 activador transcripcional	<i>rmpA2</i> -F: CTTTATGTGCAATAAGGATGTT <i>rmpA2</i> -R: CCTCCTGGAGAGTAAGCATT	450 pb
<i>iucA</i>	Aerobactina	<i>iucA</i> -F: AATCAATGGCTATTCCCCTG <i>iucA</i> -R: CGCTTCACTTCTTTCACTGACAGG	239 pb
<i>Irp2</i>	Yersiniabactina	<i>irp2</i> -F: GCTACAATGGGACAGCAACGAC <i>irp2</i> -R: GCAGAGCGATACGGAAAATGC	230 pb
<i>wzyK1</i>	Serotipo capsular K1	<i>wzyK1</i> -F: GGTGCTCTTTACATCATTGC <i>wzyK1</i> -R: GCAATGGCCATTTGCGTTAG	128 pb
<i>wzyK2</i>	Serotipo capsular K2	<i>wzyK2</i> -F: GACCCGATATTCATACTTGACAGAG <i>wzyK2</i> -R: CCTGAAGTAAATCGTAAATAGATGGC	641 pb

Nota: Los controles positivos específicos para cada prueba de virulencia son:

- Control *rmpA2*: cepa local del CICEI, INSP con número 10271
- Control *iucA*: cepa local del CICEI, INSP con número 13526
- Control *k1*: cepa local del CICEI, INSP con número 13526
- Control *k2*: cepa local del CICEI, INSP con número 15660

3.3.5 Analizar las características relacionadas a la procedencia del aislamiento con su resistencia y virulencia:

Con base en los resultados de virulencia y resistencia (fenotipo y genotipo), se analizó esta información con la hoja del reporte de laboratorio; tomando en cuenta los siguientes datos:

- Tipo de paciente (Consulta externa u hospitalizado)
- Tipo de muestra (Lugar de origen del muestreo)
- Patrones de resistencias a los antimicrobianos particularmente Cefotaxima, Ceftazidima y Carbapenémicos.

4 Resultados

4.1 Identificación molecular de especies del complejo de *Klebsiella pneumoniae*

Los aislamientos que cumplieron con los criterios de selección para este estudio fueron un total de 83, todos ellos procedentes de muestras clínicas. Todos los aislamientos fueron identificados de manera exitosa a través de la técnica de PCR multiplex, como se muestra de manera representativa en la figura 9.

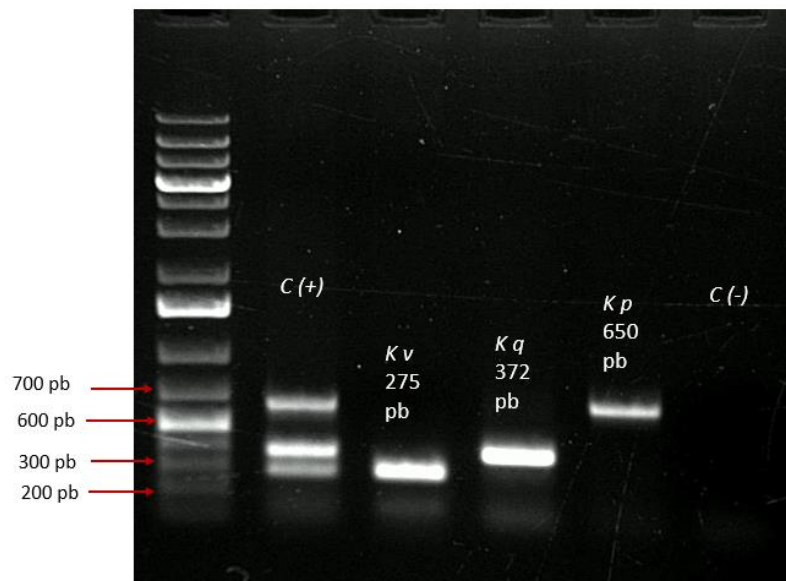


Figura 9 Ejemplo de controles positivos en gel de electroforesis al 1%, resultado de la PCR Multiplex para la diferenciación del complejo de *K. pneumoniae*: En el carril uno está el marcador de peso molecular, en el carril dos se encuentra el control positivo con las tres especies mezcladas. En el tercer carril está *K. variicola* (F2R9) DGC. En el cuarto carril se encuentra *K. quasipneumoniae* (10441) TctA y en el último carril se encuentra *K. pneumoniae* (13883) PepM,

La figura 10 muestra los resultados de la identificación molecular de los 83 aislamientos de interés, Del total de aislamientos, 78 (94%) pertenecen a la especie *K. pneumoniae*, 1 (1.2%) a *K. variicola* y 4 aislamientos (4.8%) *K. quasipneumoniae*.

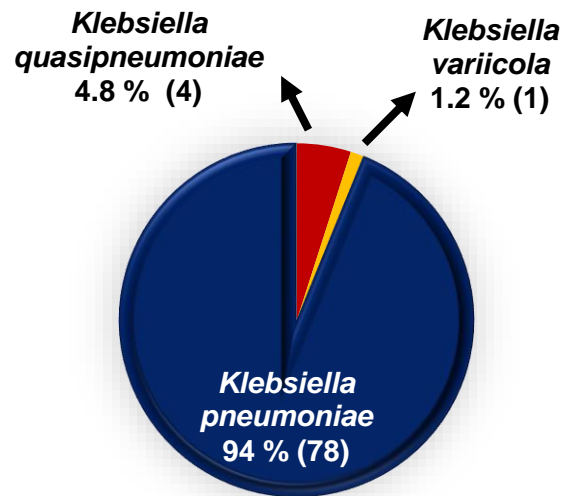


Figura 10 Frecuencias relativas y absolutas de las 3 especies del complejo *K. pneumoniae*, identificadas por un método molecular. Kp corresponde a *Klebsiella pneumoniae*, Kv a *Klebsiella variicola* y Kq a *Klebsiella quasipneumoniae*

4.2 Determinación del fenotipo y genotipo de resistencia

4.2.1 Identificación de β -lactamasas

De las 83 cepas clínicas estudiadas, 57 (69%) resultaron positivas de acuerdo con los resultados emitidos por el Vitek 2. Es importante mencionar que 2 aislamientos positivos corresponden al género *Klebsiella quasipneumoniae*. Todos los aislamientos con el fenotipo BLEE fueron analizados para la búsqueda e identificación de los genes responsables de dicho fenotipo, iniciando con *bla*_{CTX-M-1} que actualmente es el más común dentro de estos genes, seguido del *bla*_{CTX-M-2}. A continuación, se muestra en la figura 11, los resultados representativos de la PCR de punto final para la determinación de dichos genes.

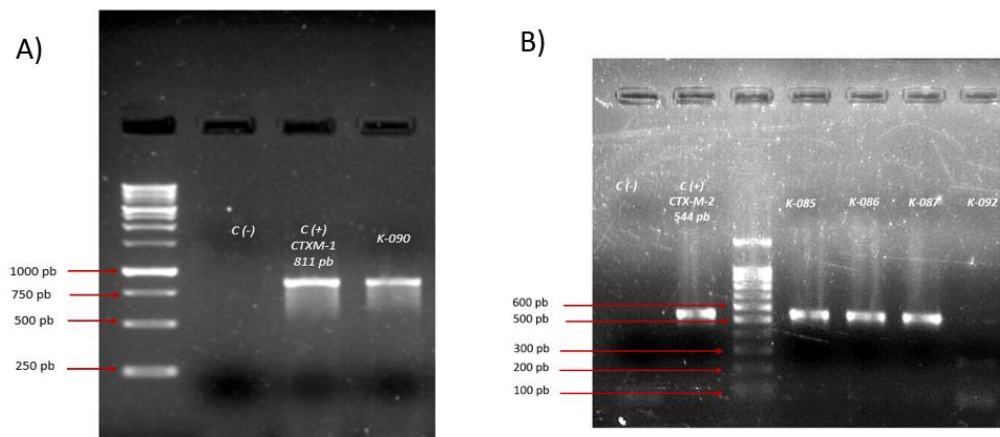


Figura 11 Ejemplificación de la electroforesis realizada para la amplificación de genes CTX-M-1 y CTX-M-2:

A) carril 1: marcador de pesos molecular de 10KB, carril 2: control Negativo, Carril 3: *bla*_{CTX-M-1} C (+) se usó con la cepa 11297 y el último carril corresponde a la cepa K-090 cuyo resultado es positivo.

B) Carril 1 control negativo, Carril 2: *bla*_{CTX-M-2} C (+) se usó con la cepa 15903, carril 3: marcador de peso molecular de 5 KB. Carril 4 en adelante: 3 muestras positivas y una negativa.

De las 57 BLEE positivas de acuerdo con el resultado del Vitek 2, se determinó una frecuencia de 70 % (40 aislamiento) del gen de la β -lactamasa *bla*_{CTX-M-1} dentro de los cuáles 2 aislamientos correspondían a *K. quasipneumoniae*. De igual forma, de las 17 muestras negativas para el gen *bla*_{CTX-M-1}, se hizo la búsqueda para el gen *bla*_{CTX-M-2} donde 14 muestras

(25%) que correspondieron en su totalidad a la especie *Klebsiella pneumoniae* resultaron positivas. Debido a limitaciones de tiempo y logística, no fue posible evaluar los 3 aislamientos BLEE positivos restantes. En la figura número 12, se pueden apreciar la distribución, proporción y los porcentajes del total de las muestras, así como los genes de resistencias encontrados.

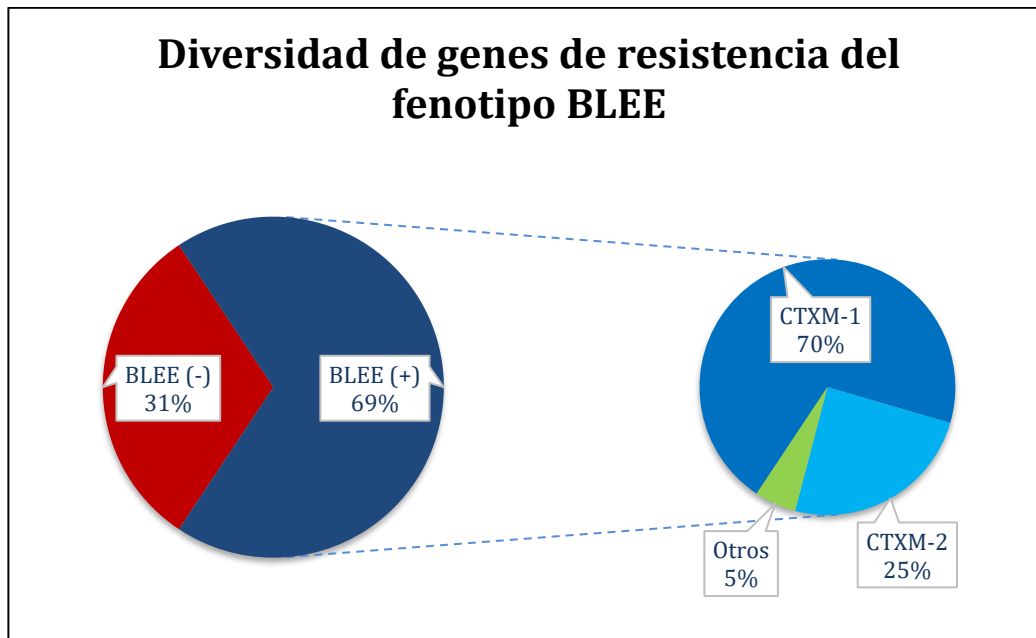


Figura 12 Representación gráfica del Fenotipo BLEE y la proporción total de los genes encontrados

4.2.2 Identificación de Carbapenemasas

En primer lugar, se realizó la prueba fenotípica de Carba NP al total de las cepas, encontrando 3 cepas positivas (3.6%), evidenciando por la hidrólisis del carbapenémico; cabe aclarar que las cepas positivas corresponden a la especie *Klebsiella pneumoniae* (ver figura 13).



Figura 13 Resultados de la prueba carba NP. De izquierda a derecha corresponde a C (+), K-200, K- 211 y K-241. Cada muestra tiene su blanco de reacción en la parte posterior.

Posterior al análisis fenotípico, la estrategia fue determinar mediante la PCR de punto final el gen de la carbapenemasa NDM (metalo-betalactamasa de

Nueva Delhi) ya que es el gen más común de carbapenemasas. El resultado fue que las 3 muestras fueron positivas, como se muestra en la figura 14.

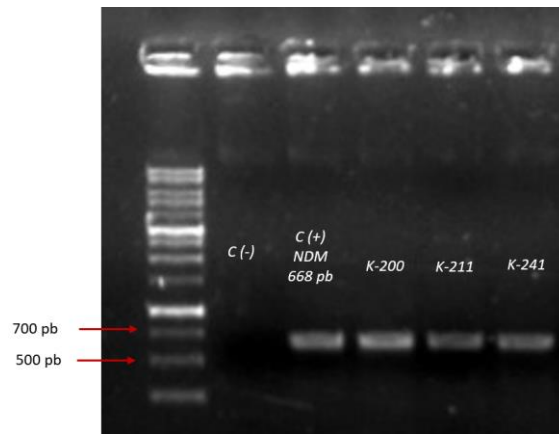


Figura 14 Electroforesis de los amplicones para la determinación de la carbapenemasa NDM en los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, en el carril 1 está el marcador de peso molecular hyperleader de 1KB, en el carril 2 se encuentra el control negativo, en el carril 3 se encuentra el control positivo que corresponde a *E. coli* (15562). Los 3 últimos carriles representan la positividad de la prueba para cada aislamiento para las muestras señaladas. Gel de agarosa al 1%.

4.2.3 Determinación de resistencia a las polimixinas

Ninguna cepa de las analizadas resultó positiva a la prueba de polimixin NP como se ve en los resultados de la figura 15.

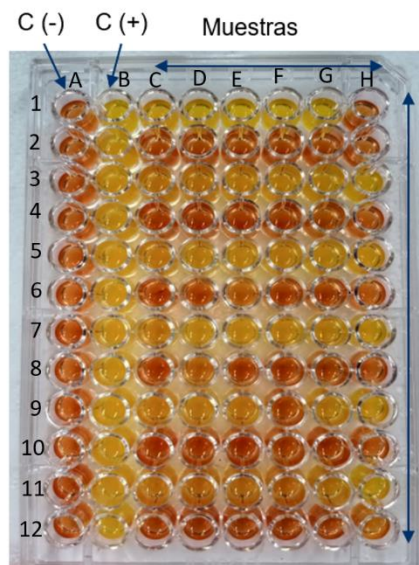


Figura 15 Resultados de la prueba polimixin NP. Las columnas A y B corresponden a los controles negativo y positivo respectivamente y a partir de la columna C a la H corresponden a muestras individuales con su blanco de reacción abajo. (C1,2 muestra 1, D1,2 muestra 2 y así sucesivamente).

Como síntesis final a la caracterización de la resistencia, se muestra en la tabla número 8 el resumen de los aspectos más importantes sobre resistencia encontrados en las 83 muestras, por especie y resaltando algunos aislamientos particulares. Se destacan dos aislamientos (K-200 y K-241) que tienen y expresan el genotipo *bla*_{CTX-M-1} y de carbapenemasa NDM. El caso de la cepa 246 con el genotipo *bla*_{CTX-M-1} se coloca dentro de la tabla ya que presenta interesantes resultados a la virulencia, los cuáles se presentarán más adelante. Así mismo, el aislamiento 211 fue positivo en el fenotipo BLEE y es portador de una carbapenemasa.

Tabla 8 Resumen de los resultados fenotípicos y moleculares de las pruebas de resistencia.

Aislamiento y especie		Fenotipo		Genotipo		
		BLEE	Carba NP	NDM	CTX-M-1	CTX-M-2
200	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	-
211	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	-	-
241	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	-
246	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	+	-
<i>K. pneumoniae</i> (78)		55	3	3	38	14
<i>K. quasipneumoniae</i> (4)		2	0	0	2	0
<i>K. variicola</i> (1)		0	0	0	0	0
Total		57	3	3	40	14

Nota: Las pruebas CarbaNP corresponde los resultados fenotípicos, Carbapenemasa NDM, CTX-M-1, CTX-M-2 corresponde a la amplificación del amplicón y por último la prueba para la determinación del BLEE se realizó con base en los resultados del Vitek 2 Las filas superiores indican las características individuales de aislamientos de interés. Las filas inferiores indican las características globales encontradas por especie

4.3 Determinación del fenotipo y genotipo de virulencia

4.3.1 Prueba del filamento "string test"

El resultado de la prueba del filamento o "string test", para las 83 cepas mostró dos aislamientos (2.4%) de *Klebsiella pneumoniae* con resultados positivos (K-96 y K-209), como se muestra en la figura 16, panel A. Así mismo, el panel B representa la positividad de la prueba con un filamento mayor a 5 mm, lo cual evidencia el fenotipo hipermucoviscoso.

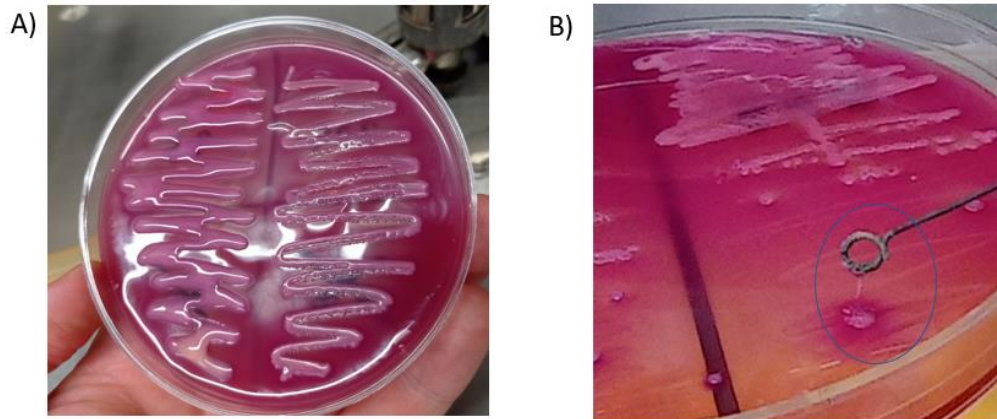


Figura 16 A) Cepas de *Klebsiella pneumoniae* positivas en la prueba de filamento, en la parte izquierda la cepa K-96 y en la derecha la K-209. B) Es el resultado positivo del aislamiento K-209

4.3.2 Prueba del Biofilm

A continuación, en la figura 17 se muestran los resultados que corresponden a la producción de biofilm de los 83 aislamientos; cabe destacarse que la cepa de la especie *K. variicola* resultó ser un no productor y las 4 cepas de *K. quasipneumoniae* correspondieron ser productores débiles. Por otra parte, el 18% y 4.8% de los aislamientos de *K. pneumoniae* presentaron producción de biofilm moderada y fuerte, respectivamente.

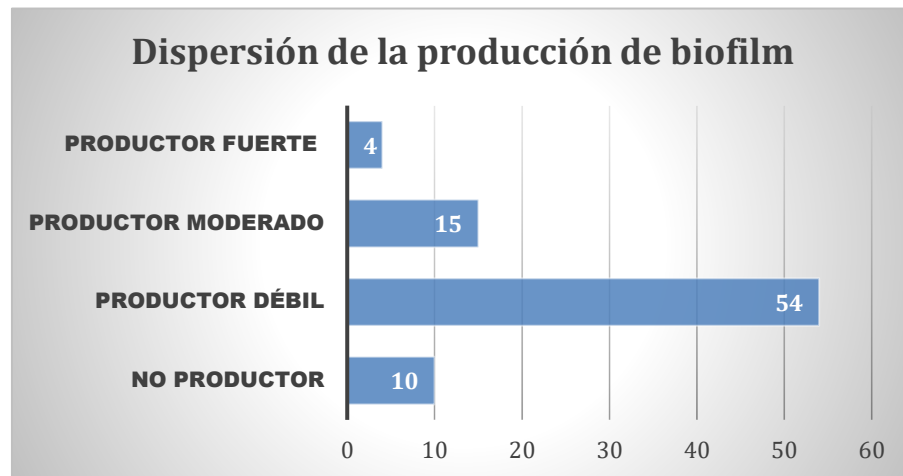


Figura 17: Resultados de la producción de biofilm de los 83 aislamientos

4.3.3 Determinación de *rmpA* y *rmpA2*

Tras el análisis de los 83 aislamientos, se determinaron 2 (2.4%) *Klebsiella pneumoniae* portadoras de los genes *rmpA* y *rmpA2*; se trata de K-246 y K-209. La figura 18 muestra los resultados de las pruebas de PCR:

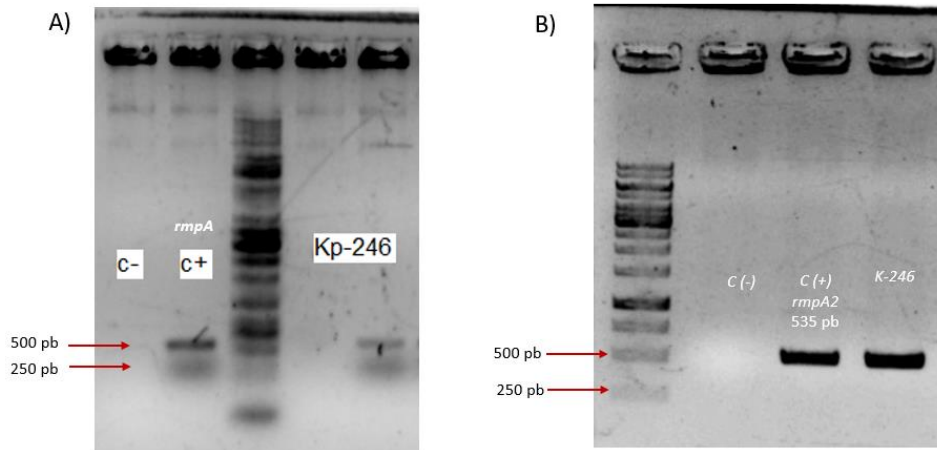


Figura 18 A) Electroforesis de los amplicones para la determinación del gen *rmpA*, el control positivo corresponde a *K. pneumoniae* (13526), el último carril corresponde al aislamiento K-246. B) Electroforesis de los amplicones para la determinación del gen *rmpA2*, el control positivo corresponde a *K. pneumoniae* (10271), el último carril corresponde al aislamiento K-246. Geles de agarosa al 1%

4.3.4 Determinación de *iucA*

Después de analizar los 83 aislamientos, se determinaron 5 (6%) portadoras del gen *iucA*, dicho sideróforo se encontró en las cepas K-209, K-239, K-241, K-242, K-246. La figura 19 muestra la electroforesis representativa de los amplicones obtenidos en 2 de los aislamientos.

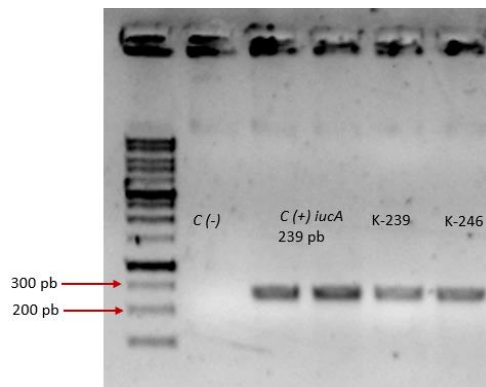


Figura 19: Resultado de la electroforesis con un gel al 1% de agarosa para la determinación del gen *iucA*. El carril uno corresponde al marcador de peso molecular de 1KB, en el carril número 2 se encuentra el control negativo, en el carril número 3 y 4 se encuentra el control positivo que corresponde a *K. pneumoniae* (13526), los últimos dos carriles corresponden a dos cepas positivas para este gen.

4.3.5 Determinación de antígenos capsulares K1 y K2

Posterior al análisis de las 83 cepas, se determinó que la cepa K-246 fue positiva para el antígeno capsular K1 (ver figura 20, panel A). Por otra parte, ninguna fue positiva para el antígeno capsular K2 (ver figura 20, panel B).

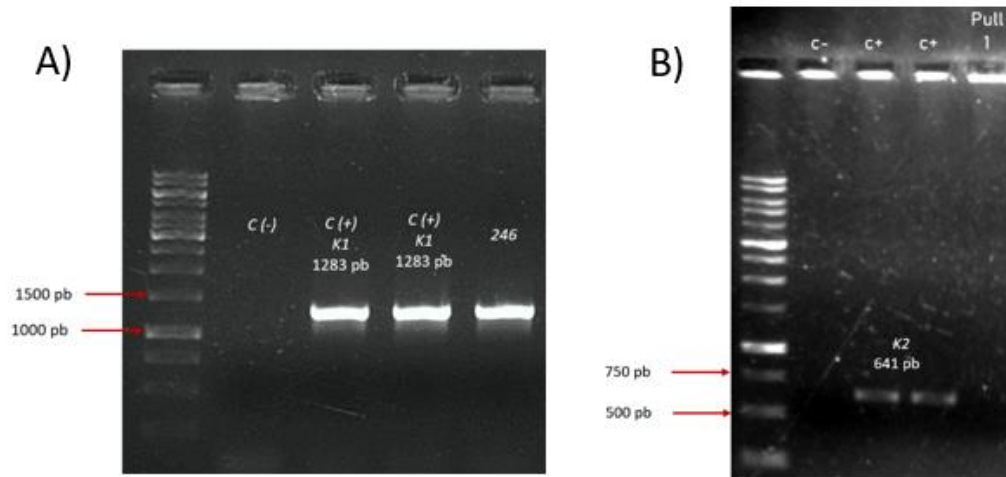


Figura 20: A) PCR de la identificación del serotipo capsular K1 y K2. En el panel A: en el primer carril se muestra el marcador de peso molecular de 5 KB, en el segundo carril se encuentra el control negativo, en el carril 3 y 4 se encuentra el control positivo (*K.pneumoniae* 13526) y en el último carril se observa el aislamiento K-246 B) PCR demostrativa para el antígeno capsular K2, en el primer carril se muestra el marcador de peso molecular de 5 KB, en el segundo carril se encuentra el control negativo, en el carril 3 y 4 se encuentra el control positivo (*K.pneumoniae* 13526) y en último carril no amplificó el pull para este gel.

En la tabla 9 se resumen los resultados globales de la virulencia de los aislamientos más interesantes y por especie.

Tabla 9. Resumen de los resultados fenotípicos y moleculares para los genes de virulencia.

Cepa	Especie	Srting test	Productor de biofilm				Gen			
			No productor	Débil	Moderado	Fuerte	rmpA	rmpA2	iucA	K1
80	<i>K. variicola</i>	-		X			-	-	-	-
88	<i>K. quasipneumoniae</i>	-	X				-	-	-	-
96	<i>K. pneumoniae</i>	+				X	-	-	-	-
200	<i>K. pneumoniae</i>	-	X				-	-	-	-
209	<i>K. pneumoniae</i>	+		X			+	+	+	-
211	<i>K. pneumoniae</i>	-		X			-	-	-	-
239	<i>K. pneumoniae</i>	-		X			-	-	+	-
241	<i>K. pneumoniae</i>	-		X			-	-	+	-
242	<i>K. pneumoniae</i>	-		X			-	-	+	-
246	<i>K. pneumoniae</i>	-			X		+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> (78)		2	9	53	12	4	2	2	5	1
<i>K. quasipneumoniae</i> (4)		0	0	4	0	0	0	0	0	0
<i>K. variicola</i> (1)		0	1	0	0	0	0	0	0	0

4.4 Descripción de las características de interés clínico relacionadas con la procedencia del aislamiento

Dentro de las cepas aisladas, en términos de su procedencia, las más comunes con 23 aislamientos fueron las muestras sanguíneas, seguido 12 aislamientos las secreciones y por último las de orina con 8. Del total de las muestras que se contaba con la información completa, se determinó que las unidades de mayor procedencia fueron UCIN (20 aislamientos), Medicina interna (9 aislamientos) y cirugía (8 aislamientos).

En la tabla 10 se muestran las características más relevantes en cuanto al servicio y la procedencia de las especies diferente a *K. pneumoniae*.

Tabla 10. Características más relevantes de las especies diferentes a *Klebsiella pneumoniae*

IDENTIFICACION	ID	Servicio	Procedencia	BLEE
<i>K. variicola</i>	80	Medicina interna	Hisopado rectal	-
	88	Traumatología	Hisopado rectal	-
<i>K. quasipneumoniae</i>	99	Medicina interna	Hisopado rectal	-
	231	Cirugía	Sangre	+
	210	Medicina interna	Sangre	+

La tabla número 11 resume de manera más concreta los resultados entorno a las características de resistencia y virulencia basados en la muestra de origen de los microorganismos

Tabla 11. Resultados de resistencia y virulencia de todos los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*.

Identificación molecular	No. De aislamientos	Muestra de origen	Resistencia		BLEE		Polimixin NP		Producción de biofilm			Fenotipo de hipermucoviscosidad	
			MDR	-	R	S	R	S	Alto/Modera do	Débil	% asociado	+	-
<i>K. pneumoniae</i>	23	Sangre	21	2	21	2	0	23	3	20	13.04	0	23
<i>K. pneumoniae</i>	12	Secreciones	8	4	8	4	0	12	3	20	25.00	1	11
<i>K. pneumoniae</i>	7	Orina	6	1	6	1	0	7	6	1	85.71	0	7
<i>K. pneumoniae</i>	28	Muestras Colonizantes	13	15	13	15	0	28	3	6	9.33	1	27
<i>K. pneumoniae</i>	13	otros	8	5	8	5	0	13	3	10	23.08	0	13
Total de aislamientos	83		56	27	56	27	0	83	18	57	100	2	54

La tabla 12, resume las características de resistencia y virulencia, así como los datos de la muestra de los aislamientos clínicos de mayor relevancia; así mismo, cabe señalar que todos los aislamientos de la tabla corresponden a *Klebsiella pneumoniae*

Tabla 12 Resumen de las características más importantes de los aislamientos de *K.pneumoniae* de interés clínico

Código de Cepa	Servicio	Lugar de la muestra	Hospital	Sexo y Edad
96	Medicina interna	Hisopado rectal	HGQ	No especificado
200	Medicina interna	Secreción bronquial	HGQ	Masculino 35 años
209	Medicina interna	Secreción bronquial	HGQ	Masculino 50 años
211	Centro estatal de diagnóstico	Secreción bronquial	HGQ	Femenina 57 años
239	UTIP	Orificio de Penrose	HENM	Femenina 9 meses
241	Cirugía	Líquido	HGQ	Masculino 26 años
242	Urgencias	Absceso	HGQ	Femenina 46 años
246	Cirugía	Secreción	HGQ	Femenina 36 años

5 Discusión de resultados

5.1 *Klebsiella pneumoniae* continua como las más prevalente del complejo

La identificación bacteriana bioquímica es la herramienta de uso diario en la mayoría de los laboratorios clínicos, sin embargo, en este trabajo, gracias a los métodos de identificación moleculares, se logró distinguir algunos miembros del complejo de especies de *Klebsiella pneumoniae* que también son de interés clínico. La tabla 13 resume los resultados propios en comparación a otros estudios realizados en otras partes de la república donde se realizó esta misma diferenciación de especies.

Tabla 13. Frecuencia de miembros del complejo *Klebsiella pneumoniae* entre diversos estudios

	Propios	(U. Garza-Ramos et al., 2018).	(Sagal Prado et al., 2018)	(Humberto et al., 2021)
<i>K.pneumoniae</i>	94%	92.4%	91 %	87.3%
<i>K.quasipneumoniae</i>	4.8%	5.1%	4.3%	6.7%
<i>K.variicola</i>	1.2%	2.5%	4%	5.9%
Total de muestras	83	36	400	552

Es importante mencionar que en todos los estudios las cepas proceden de ambientes clínicos, ya que otros reportes de *Klebsiella spp* ambientales u otros orígenes varían en su proporción (Getzeman y Faustino, 2016). Sin embargo, en cuanto a su incidencia, los resultados propios en comparación a los demás concuerdan en la posición de *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* y *K. variicola* como primer, segundo y tercer lugar, respectivamente, la prevalencia de las especies se mantiene en el mismo orden aun cuando las regiones son diferentes (Humberto et al., 2021). En la tabla número 13 se describen las características más relevantes de los aislamientos diferentes a *K. pneumoniae*.

La identificación inespecífica de los miembros del complejo *K. pneumoniae* impide conocer la importancia clínica de *K. quasipneumoniae* y *K. variicola*, subestima la prevalencia real por territorio y lleva a conclusiones epidemiológicas erróneas en este grupo de bacterias además de que la técnica para discernir entre especies es relativamente nueva y por tanto hay pocos estudios que lo han realizado en distintas regiones.

El servicio de atención donde se encontraron mayor diversidad de especies fue medicina interna, ya que 3 de los aislamientos diferentes *K. pneumoniae* provenían de dicho servicio. Por otra parte, es de resaltar que tres de los aislamientos de especie distinta a *K. pneumoniae* fueron obtenidos de muestras de hisopados rectales, consideradas como cepas colonizantes.

5.2 La resistencia a las cefalosporinas por parte de *Klebsiella spp.* es una realidad clínica

De las 83 cepas clínicas, 60 de ellas (74%) resultaron con el fenotipo BLEE positivo de acuerdo con los resultados emitidos por el Vitek 2, el cuál es un

valor similar respecto al 73.4% reportado por Bibiana-Flores et. al en el 2021, observado en la misma ciudad.

En general las Cefotaximasas más prevalentes fueron las de la familia 1 (CTXM-1 y CTXM-15) con una incidencia de 40/60, en segundo lugar, las de la familia 2 (CTXM-2) 14/60. En ese sentido, es de hacer mención que aun cuando no era el objetivo del trabajo se determinó que con base en los resultados del Vitek 2 reveló que la resistencia a las cefalosporinas de 1°, 2°, 3° y 4° generación fue mayor del 95% en el total de las cepas analizadas en este trabajo, en contraste la categoría con mejor sensibilidad fue del grupo de los carbapenémicos (Ertapenem, Imipenem y Meropenem) seguido de la cefamicina, lo cual se correlaciona en la práctica clínica ya que los carbapenémicos se reportan como el mejor tratamiento para infecciones producidas por enterobacterias (Patrier & Timsit, 2020).

De las 43 cepas BLEE positivas de las instancias que provenía de áreas hospitalarias como UCIN, UTIP y medicina interna, el 53.5% de los aislamientos (23/43), esto se corrobora, ya que dichas instancias hospitalarias representan un factor de riesgo en torno a los distintos procedimientos invasivos, el tiempo prolongado de hospitalización, la exposición a catéteres y la ventilación mecánica (Secretaria de salud, 2017). En el caso de la unidad de cuidados intensivos neonatales, el 84.2 % presenta el fenotipo BLEE positivo y un caso de un recién nacido aislado de una punta de catéter presentó resistencia a los carbapenémicos lo cuál es muy alarmante en pacientes pediátricos

Es de resaltar que los aislamientos positivos al fenotipo carbapenemasa dependiente del gen NDM, fueron obtenidos de un mismo hospital, lo cual representa una incidencia de carapenemasas del tipo B en un 3.6% respecto al fenotipo BLEE positivo reportado previamente. Las cepas 200 y 211 además de pertenecer al mismo hospital, provienen de secreciones bronquiales, pero de diferentes servicios de atención.

5.3 La presencia de ciertos factores de virulencia se correlaciona con el sitio anatómico de la muestra

De acuerdo con el estudio de Hera Nirwati, en 2019, encontró que el 85.63% de sus cepas (n=167) fueron productoras de biofilm. En este trabajo se encontraron 87.95% cepas productoras de biofilm donde predominó la producción débil de éste; así mismo, las cepas que fueron productoras fuertes de biofilm correspondieron al género *Klebsiella pneumoniae*, sin embargo, esto no indica que las otras especies del complejo puedan llegar a desarrollar este grado de producción. Así mismo y como se observa en la tabla 11, el mayor número de cepas relacionadas a una producción moderada o alta de biofilm fue en el caso de las muestras provenientes de muestras de orina.

Tabla 14: Relación fenotípica y genotípica de la hipermucoviscosidad

Cepa	Especie	Sring test	<i>rmpA</i>	<i>rmpA2</i>
96	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	-
209	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+
246	<i>K. pneumoniae</i>	-	+	+

La cepa 209 muestra un ejemplo claro entre la relación de la expresión fenotípica y genotípica de la hipermucoviscosidad. Caso contrario con la cepa 246 que, a pesar de tener estos genes responsables de la hipermucoviscosidad, no los expresó fenotípicamente durante las pruebas. Por otro lado, la cepa 96 muestra una expresión fenotípica de la hipermucoviscosidad a pesar de no tener genes *rmpA*, lo cual sugiere la producción de mucosidad por otros reguladores de ésta, por ejemplo las proteínas *RmpD* o la tirosin cinasa WZC, entre otras (Mike et al., 2022)(Walker et al., 2020)

La cepa 246 es un caso interesante de estudio, ya que tiene ciertas características que resaltan como Sideróforos (*iucA*), genes de hipermucoviscosidad (*rmpA* y *rmpA2*) y serotipo capsular K1. Estos datos son sugestivos de un fenotipo hipervirulento en la cepa, sin embargo, aún faltarían más estudios para corroborarlo, como ensayos de resistencia a suero, fagocitosis por neutrófilos o inoculaciones en modelos *in vivo*, así como la secuenciación del genoma.

Ambas cepas con la prueba de String test positiva, (96 y 209) provienen del mismo hospital y servicio de atención (Medicina interna), sin embargo, los

sitios anatómicos de aislamiento fueron distintos. Por otro lado, las cepas positivas a los genes *rmpA* y *rmpA2* (209 y 246) provienen de secreciones bronquiales, lo cual concuerda con la noción de que la bacteria, para establecerse en el sitio anatómico, produce estos factores de virulencia. Por último, una explicación para el caso de la cepa 246 es que pudiera tener alguna mutación o supresión del gen que le impide demostrar el fenotipo hipermucoviscoso.

Coexistencia relacionada a resistencia y virulencia

En cuanto al fenotipo hipervirulento en los últimos años, se han registrado un mayor número de cepas con perfiles hipervirulentos en coexistencia con resistencia a los carbapenémicos. Estudios de tipificación molecular en Asia, muestran que las secuencia tipo de hvKp más comunes son los ST23, ST11, ST65 y ST86 (Lin et al., 2018). En contraste a los países del continente asiático, en América, la ST23 no es la combinación más frecuente para el fenotipo hipervirulento. La combinación con mayor prevalencia en los últimos reportes de América fue ST86-K2, junto con las carbapenemasas NDM y KPC.

En el presente estudio las cepas 241 y 246 fueron las únicas en presentar una coexistencia entre genes de virulencia y resistencia, como se ve en la tabla 12, provienen del mismo hospital y servicio de atención, sin embargo, tienen distinta procedencia anatómica entre pacientes.

En la tabla número 11 se evidencian las características de virulencia, resistencia y procedencia de los aislamientos, donde se destaca la mayor proporción de biofilm en muestras de procedencia urinaria y la mayor presencia de muestras MDR en las muestras sanguíneas.

En México como en el resto de América existe un n mayor número de reportes entorno al resistoma que al viruloma de las especies del complejo *Klebsiella pneumoniae*, sin embargo, el fenotipo hipervirulento no está restringido al género *Klebsiella pneumoniae*, ya que existen reportes en otros países de *K. variicola* hipervirulentas, las cuáles podrían llegar a presentarse en ambientes hospitalarios

La coexistencia de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia aún es un terreno que se puede explorar y que en el caso de este trabajo si se encontraron como los aislamientos K-246 y K-241.

Las unidades de atención hospitalaria se pueden considerar como un factor de riesgo:

Para determinar la posible relación entre la frecuencia de aislamientos BLEE positivos y el servicio de procedencia, Se realizó una prueba estadística de χ^2 cuadrada (agrupando los aislamientos obtenidos de los servicios de donde se determinó la relación que tuvieron las unidades de servicio de UTIP, UCIN y medicina interna, respecto a todo el resto de servicios médicos, frente al fenotipo BLEE positivo, lo cual indica que los pacientes en estas instancias que generalmente son prolongadas y con distintos procedimientos invasivos al aislar las *Klebsiella pneumoniae* presentan una tendencia al fenotipo BLEE positivo ($P=0.057$).

Las tres unidades donde se concentró más del 50% de la muestra fueron: UCIN, Medicina interna y Cirugía. Así mismo, más de la mitad de la procedencia de los aislamientos correspondieron a Muestras de Sangre, Secreciones y Orina lo cual se corrobora de acuerdo al reporte hospitalario del 2015 (Secretaría de salud, 2017).

Del total de las muestras clínicas que se cuentan con el reporte hospitalario, el 50% corresponde a pacientes menores de 5 años y personas de la tercera edad corroborando así la importancia del estado inmunológico del paciente para evitar que bacterias de este género colonicen y generen una disbiosis en otros sitios donde no son microbiota habitual (Liu et al., 2018 y Solomon et al., 2021).

6 Conclusiones

Con el presente estudio, se logró la caracterización molecular del complejo de especies de *Klebsiella pneumoniae*, así como la determinación genes de resistencia y virulencia vinculados con estas mismas, en aislamientos provenientes de hospitales de la ciudad de Querétaro. Además, se corrobora la alta distribución del *Klebsiella pneumoniae* dentro del complejo con una prevalencia mayor al 95%, no obstante, también se identificaron aislamientos de *K. variicola* y *K. quasipneumoniae*.

En esta colección de cepas, la resistencia a las cefalosporinas se identificó con mayor frecuencia en comparación con la resistencia a los carbapenémicos. No obstante, se destaca que la carbapenemasa tipo NDM fue la única carbapenemasa identificada; la cual, es de importancia clínica debido a que estos genes confieren resistencia a diversas clases de antibióticos β -lactámicos.

Con respecto al fenotipo de virulencia, se identificaron factores de virulencia asociados a cepas hipervirulentas, como lo son el serotipo capsular K1 y el *rmpA* y el gen *iucA* poniendo en mayor riesgo las infecciones ocasionadas por este tipo de bacterias en ambientes hospitalarios y comunitarios. Una de las limitantes del estudio fue el no haber podido realizar la tipificación molecular de las cepas con mayor número de genes representativos de virulencia y resistencia; ya que de esta manera se podría haber confirmado si alguna de estas cepas pertenecía a un tipo de secuencia pandémico o hipervirulento.

El análisis genómico de algunos aislamientos confirma, por una parte, la identificación de especies del complejo *K. pneumoniae* y permitió la identificación de su viruloma y resistoma el cuál puede considerarse como nuevas preguntas de investigación en términos clínico, epidemiológicos y moleculares. Sin embargo, es importante para llevar un mejor control de los hospitales para además de tener un control epidemiológico, estar al tanto de las nuevas terapias de tratamiento de antibióticos y no seguir administrando medicamentos a los que ya está reportada la resistencia en ciertos lugares.

7 Anexos.

Anexo 1	Resultados de la secuenciación de tres cepas
Anexo 2	Evidencia del nuevo tipo de secuencia para <i>K. variicola</i>
Anexo 3	Carta de aceptación bioética
Anexo 4	Registro del protocolo de tesis
Anexo 5	Autorización de grado por tesis individual
Anexo 6	Aprobación y registro del proyecto FOPES
Anexo 7	Aprobación del informe final del proyecto FOPES
Anexo 8	Evidencia de difusión
Anexo 9	Reconocimiento al tercer lugar en la presentación de ponencia
Anexo 10	Participación en el segundo coloquio en ciencias biomédicas y diagnóstico molecular.
Anexo 11	Constancia de participación de una ponencia ante el colegio de químicos clínicos del estado de Querétaro.
Anexo 12	Constancia de la participación en el XLVI congreso Nacional de infectología y microbiología clínica.
Anexo 13	Constancia de participación del taller Microbiología Clínica.
Anexo 14	Carta de aceptación de movilidad al CICEI del INSP

Anexo 1: Resultados de la secuenciación de tres cepas

Con la finalidad de profundizar en la caracterización de los aislamientos estudiados, se seleccionaron 6 cepas para su secuenciación, de las cuales se logró la secuenciación exitosa de 3 de ellas. Para la construcción del dendrogramas, la parte metodológica fue extraer en una primera instancia el ADN de las muestras implicadas, mandarlo para su secuenciación (Macrogen a Seoul, Korea) Para que posteriormente se realizara el análisis bioinformático construyendo las librerías, ensamblar el genoma y buscar mediante distintos softwares la existencia de genes asociados a la virulencia, resistencia y otras características importantes como su secuencia tipo para *K. variicola* (nueva 317) y para *K. quasipneumoniae* no hay base de datos aún para definir su perfil alélico.

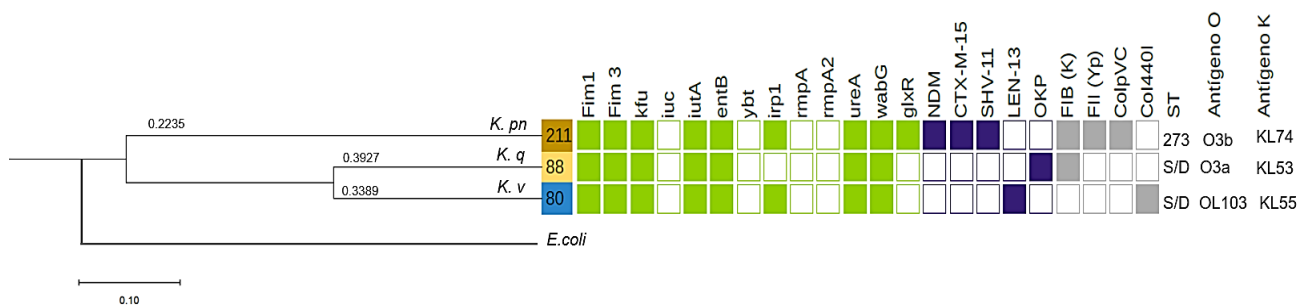




Figura 21 Dendrogramas y metadatos de los resultados de secuenciación de tres cepas del complejo de especies de *Klebsiella pneumoniae* Cepas (K-211, K-88 y K-80). Con color verde se observan factores asociados a la virulencia, con azul los asociados a resistencia y con color gris los plásmidos.

Anexo 2: Evidencia del nuevo tipo de secuencia para *K. variicola*

A continuación, se presenta la evidencia de la nueva cepa de *K. variicola* con el nuevo tipo de secuencia 317 cargado en la base de datos MLST de *Klebsiella variicola* del INSP



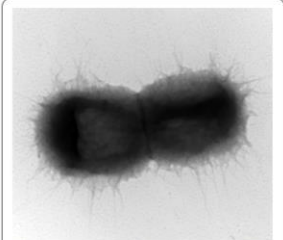
Home MLST Info. Downloads *K. variicola* Info. Contact Curator Release

Allelic profile: RESET

<i>leuS</i>	<i>pgi</i>	<i>pgk</i>	<i>phoE</i>	<i>pyrG</i>	<i>rpoB</i>	<i>fusA</i>
19	69	6	20	1	1	4

ST	317
Origin	Human
Sample	FecalSwab
ESBL/Carbapenemase	Unknown
Country	Mexico
Strain	80

Which ST profile has your sequence?, Select your fasta file:



Database developed by the Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) in collaboration with the Centro de Ciencias Genómicas (CCG-UNAM). This site has been funded by the Instituto Nacional de Salud Pública (INSP).

Reference for citations of MLST of *K. variicola*:
Barrios-Camacho Humberto, Aquilar-Vera Alejandro,

Figura 22 Perfil Alélico y secuencia tipo del aislamiento número 80 que corresponde a *K. variicola* registrado en la base de datos del INSP (<https://mlstkv.insp.mx>)

ANEXO 3: Carta de aceptación bioética

Santiago de Querétaro, Qro., 30 de enero del 2019

31 ENE 2019

Dra. en C. María Carlota García Gutiérrez
Investigadora de la Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Querétaro
Presente.

Estimada Dra. García:

Esperando se encuentre muy bien y con la finalidad de informarle a Usted que su trabajo, titulado: "Estudio epidemiológico molecular de microorganismos ESKAPE obtenidos en hospitales de salud pública del estado de Querétaro" y que posterior a la revisión por el Comité Estatal de Investigación en Salud fue APROBADO, con registro: 1053/ Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro /08-11-2018/ Dra. en C. María Carlota García Gutiérrez.

Derivado de la recolección de datos que se plantea en su trabajo, si fuera tan amable de contactar a los Jefes de Enseñanza: Dr. Yamil Matuk Pérez, del Hospital General de Querétaro, Dr. Luis Nelson Bautista García del Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer y Dr. Gustavo Coello Ugaldé del Hospital General de San Juan del Río, para establecer logística de trabajo.

De igual manera, para dar cumplimiento a la Norma Oficial Mexicana 012, se solicita Informe Técnico Parcial del avance de su trabajo en 6 meses posteriores a la recepción del presente.

Saludos cordiales.

Atentamente,



Dra. Silvia de los Angeles Santoyo Cristiani
Subdirectora de Enseñanza



C.c.p. Dr. Yamil Matuk Pérez, del Hospital General de Querétaro
C.c.p. Dr. Luis Nelson Bautista García Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer
C.c.p. Dr. Gustavo Coello Ugaldé, Jefe de Enseñanza del Hospital General de San Juan del Río.
C.c.p. Dra. Ivette Mata Moqueda, Coordinadora Estatal de Residencias Médicas, SESEQ.

Unidad de Servicios de Salud - SESEQ
República No. 51 Oriente
C.P. 76000, Querétaro, Qro.
Tel: 251 5000 ext. 7017

QUERÉTARO
GOBIERNO DEL ESTADO

ANEXO 4: Registro del protocolo de tesis

Universidad Autónoma de Querétaro
 Dirección de Investigación y Posgrado
 Registro del Protocolo de Investigación del Estudiante de Posgrado

Espacio exclusivo para la Dirección

No. Registro de Proyecto*	<u>12680</u>	
Fecha de Registro*	<u>10-08-2021</u>	
Fecha de inicio de proyecto:	<u>Agosto del 2020</u>	
Fecha de termino de proyecto:	<u>Junio del 2022</u>	

1. Datos del solicitante:

No. de expediente: 300251

Nombre: _____

Peralta Macotela Pedro

Apellido Paterno Apellido Materno Nombre(s)

Dirección: _____

José de San Martín #22 Independencia 61512

Calle y número Colonia C.P.

Michoacán (722) 611 0951

Estado Teléfono (incluir lada)

2. Datos del proyecto:

Facultad: Facultad de Química

(Escribir el nombre completo del posgrado en el que está inscrito)

Especialidad: _____

Maestría: Maestría en Química Clínica Diagnóstica

Doctorado: _____

Tema específico del proyecto: Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos de *Klebsiella spp.* de interés clínico y epidemiológico obtenidos en hospitales de Querétaro.

Universidad Autónoma
de Querétaro

RECIBIDO

10 AGO, 2021

DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

<p><u>Dra. María Carlota García</u> Gutiérrez Director de tesis¹</p> <p><u>Q.F.B Pedro Peralta</u> Macotela Alumno¹</p>	<p><u>Dr. Jesús Ulises Garza</u> Ramos Martínez Co-director¹</p> <p><u>Dra. Silvia Lorena Amaya</u> Llano Director de Facultad¹</p>	<p><u>Dr. Gerardo Manuel Nava Morales</u> Jefe de Investigación y Posgrado de la Facultad¹</p> <p><u>Dra. en C. Ma. Guadalupe</u> Flavia Lanza Piña Director de Investigación y Posgrado¹</p>
---	---	---

¹ Escribir nombre completo y firma.

ANEXO 5: Autorización de grado por tesis individual.

		<p>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO FACULTAD DE QUÍMICA DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO</p>	
<p>JPFQ-OFIC.113/2022</p>			
<p>C.U. junio 7, 2022</p>			
<p>C. PEDRO PERALTA MACOTELO MAESTRÍA EN QUÍMICA CLÍNICA DIAGNÓSTICA P R E S E N T E .</p>			
<p>Informo a usted, que en sesión de Consejo Académico de la Facultad de Química celebrada el día 7 de junio se autorizó su opción de obtención de grado por TESIS INDIVIDUAL de acuerdo al artículo 95, fracción IX del Reglamento de Titulación vigente.</p>			
<p>Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.</p>			
<p>A T E N T A M E N T E “EDUCO EN LA VERDAD Y EN EL HONOR”</p>			
<p> DRA. SILVIA LORENA AMAYA LLANO PRESIDENTA DEL CONSEJO ACADÉMICO FACULTAD DE QUÍMICA</p>			
<p>c.c. archivo atl.</p>			
<p>SOMOS UAQ EDUCAR CRECER CONSOLIDAR</p>	<p>Centro Universitario, Cerro de las Campanas s/n. Sorongo de Querétaro, Qro., México C.F. 76010 A.P., 184 C.P. Tels: 01 442 192 13 04 y 442 192 13 07</p>		

ANEXO 6: Aprobación y registro del proyecto FOPES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



JPFQ-OFIC.268/2022

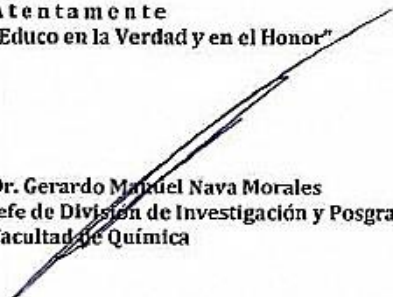
C.U. agosto 2, 2022.

Q.F.B. Pedro Peralta Macotela
Presente


Informo a usted que en el Consejo de Investigación y Posgrado de esta Facultad, celebrado el 29 de julio así como en el Consejo Académico de esta Facultad celebrado el 2 de agosto del presente año, fue aprobado su registro del proyecto con título: "Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos de *Klebsiella* spp. de interés clínico y epidemiológico obtenidos en Querétaro".

Sin más por el momento, quedo como siempre a sus órdenes.

Atentamente
"Educo en la Verdad y en el Honor"


Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Jefe de División de Investigación y Posgrado
Facultad de Química

Atentamente
"Pura y Aplicada Soy Fuente de Vida"


Dra. Sylvia Lorena Amaya Llano
Directora
Facultad de Química

c. c. Archivo
atl.

ANEXO 7: Aprobación del informe final del proyecto FOPES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



JPFQ-OFIC.361/2022

C.U. noviembre 22, 2022.

C. Pedro Peralta Macotela
Presente

Informo a usted que en el Consejo de Investigación y Posgrado de esta Facultad, celebrado el **18 de noviembre** así como en el Consejo Académico de esta Facultad celebrado el **22 de noviembre** del presente año, fue aprobado el informe final de su proyecto titulado: "**Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos de *Klebsiella* spp. de interés clínico y epidemiológico obtenidos en Querétaro**".

Sin más por el momento, quedo como siempre a sus órdenes.

Atentamente
"Educo en la Verdad y en el Honor"

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Jefe de División de Investigación y Posgrado
Facultad de Química

c.c. archivo

atl.

Atentamente
"Pura y Aplicada Soy Fuente de Vida"

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora
Facultad de Química

Anexo 9: Evidencia de difusión



EDUCACIÓN **INVESTIGACIÓN**
FACULTAD DE MEDICINA FACULTAD DE MEDICINA
CONTINUA **PREGRADO**

RECONOCIMIENTO

a: Pedro Peralta Macotela.

por su valiosa participación como **PONENTE** en modalidad **GALERÍA** en el Foro de Investigación y Posgrado de la Facultad de Medicina realizado del 4 al 6 de abril del 2022. Valor curricular de 15 hrs.

Título: Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos de *Klebsiella* spp. de interés clínico y epidemiológico obtenidos en hospitales de Querétaro.

Colaboradores: Guadalupe Zaldivar Lelo de Larrea; Juana Susana Flores Robles; Karla Isabel Lira de León; Rocío Alejandrina Romero Mejía; Ulises Garza Ramos*; María Carlota García Gutiérrez*.


Dra. Rosa Martha Pérez Serrano
Coordinación de Educación Continua


Dra. Mardocheo Cuellar Núñez
Coordinación de Investigación de Posgrado



Dr. Nicolás Calichón Calderón
Jefatura de Investigación y Posgrado


Dra. Guadalupe Zaldivar Lelo de Larrea
Directora de la Facultad de Medicina

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO	
FACULTAD DE MEDICINA	
COORDINACIÓN DE EDUCACIÓN MÉDICA	
Registrado en:	
Libro <u>9</u>	Foja <u>60-A</u>
Folio <u>597</u>	Créditos <u>-1-</u>
Actividad de Educación Médica No.:	<u>12/22</u>
Fecha de Registro:	<u>13 de mayo 2022</u>



Anexo 9: Reconocimiento al tercer lugar en la presentación de ponencia



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultades de Química y Medicina

Otorgan el presente

RECONOCIMIENTO


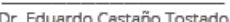




a

Pedro Peralta Macotela

Por haber obtenido el 3er lugar en la categoría "*Estudiante de Maestría presentación de protocolo*" con la presentación de la ponencia :

Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos de *Klebsiella* spp. de interés clínico y epidemiológico obtenidos en Querétaro

En el marco del **Primer Coloquio de Ciencias Biomédicas y Diagnóstico Molecular**, organizado por: Maestría y Doctorado en Ciencias en Biomedicina, Maestría en Química Clínica Diagnóstica y Especialidad en Bioquímica Clínica. Realizado en Querétaro, Qro., el 06 y 07 de mayo de 2021.

 _____ Dr. Nicolás Camacho Calderón Jefe de Investigación y Posgrado, Facultad de Medicina	 _____ Dr. Eduardo Castaño Tostado Jefe de Investigación y Posgrado, Facultad de Química		
 _____ Dr. Pablo García Solís Coordinador del Doctorado en Ciencias en Biomedicina	 _____ Dra. Ana Gabriela Hernández Puga Coordinadora de la Maestría en Ciencias en Biomedicina	 _____ M.I.M. David Gustavo García Gutiérrez Coordinador de la Maestría en Química Clínica Diagnóstica	 _____ M.S.P. Juana Susana Flores Robles Especialidad en Bioquímica Clínica

Anexo 10: Participación en el segundo coloquio en ciencias biomédicas y diagnóstico molecular.



DIRECCIÓN DE
EDUCACIÓN
A DISTANCIA
E INNOVACIÓN
EDUCATIVA

Maestría en Química Clínica Diagnóstica
Maestría y Doctorado en Ciencias en Biomedicina
Especialidad en Bioquímica Clínica
Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina y Facultad de Química

Otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

A:

PERALTA-MACOTELA PEDRO, GARZA-RAMOS ULISES , ZALDÍVAR
LELO DE LARREA- GUADALUPE, LIRA-DE-LEÓN KARLA , FLORES
ROBLES- JUANA SUSANA, ROMERO MEJÍA-ROCÍO ALEJANDRINA Y
GARCÍA-GUTIÉRREZ MARÍA CARLOTA

Por su destacada participación con el trabajo titulado

**Klebsiella spp caracterización molecular y fenotípica de
aislamientos obtenidos en hospitales de Querétaro**

Presentado en el Segundo Coloquio en Ciencias Bio-médicas y Diagnóstico
Molecular. Realizado en Querétaro, Qro. el 5 y 6 de Mayo del 2022.

Dra. Guadalupe Zaldivar Lelo de Larrea
Directora de la Facultad de Medicina

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad de Química

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de la Secretaría de Investigación,
Innovación y Posgrado

FOLIO:
0000510008000029



Anexo 11: Constancia de participación de una ponencia ante el colegio de químicos clínicos del estado de Querétaro



Colegio de Químicos Clínicos del Estado de Querétaro A.C.

Afiliado a la

Registro ante la DGP 2a-20-661

Federación Nacional de Químicos Clínicos CoNaQuiC A.C

Afiliado a la

Registro ante la DGP F-370

**International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory
Medicine**



Otorga la presente

CONSTANCIA

a:

QFB. Pedro Peralta Macotela

Inscrito en el Libro 1, Folio 45 No. 1 de Educación Continua de COCEQ

Por su participación como ponente en la **6ta Sesión Académica**
con el tema: **"Caracterización del complejo "Klebsiella pneumoniae" en Querétaro "**

Realizado en modalidad virtual el día 28 de Julio de 2022; Santiago de Querétaro, Qro.

Valor curricular: 2 horas




Anexo 12: Constancia de la participación en el XLVI congreso Nacional de infectología y microbiología clínica.



Anexo 13: Constancia de participación del taller Microbiología Clínica.



Anexo 14: Carta de aceptación de movilidad al CICEI del INSP

		DIRECCIÓN DE INNOVACIÓN EN VIGILANCIA Y CONTROL DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE ENFERMEDADES INFECCIOSAS		
<i>"2021, año de la Independencia"</i>		
Cuernavaca, Morelos a 06 de agosto del 2021		
CARTA DE ACPETACIÓN DE MOVILIDAD		
A quien corresponda:		
P R E S E N T E		
<p>Por medio de la presente me permito informarle que la solicitud del QFB. Pedro Peralta Macotella alumno de la Maestría en Química Clínica Diagnostica de la Universidad Autónoma de Querétaro ha sido ACEPTADO para realizar la estancia de movilidad académica del día 09 de agosto a diciembre 17 del 2021. El alumno se encontrará a mi cargo y soy co-director de la tesis y físicamente estará laborando en el Laboratorio 2 Planta Alta de Resistencia Bacteriana del CISEI, que forma parte del Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública.</p>		
<p>Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.</p>		
Dr. Jesús Ulises Garza Ramos Martínez		
<p>Dr. Jesús Ulises Garza Ramos Martínez ulises.garza@insp.mx Director de Área</p>		
<p>Avenida Universidad 655, Cerrada de los Pinos y Caminera, colonia Santa María Ahuacatlán 62100 Cuernavaca, Morelos, México. Conm.: (777) 329 3000 www.insp.mx</p>		

Anexo 16: Cronograma terminado

	DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD	MES											
		Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Jun
1	Equipamiento de consumibles y revisión del equipo necesario para el desarrollo de la parte experimental	X											
2	Organización de la base de datos y gestión de nuevos permisos en centros de salud participantes	X	X										
3	Procesamiento general, resiembra de aislamientos y extracción del ADN			X	X								
4	Identificación de género y especie			X	X	X							
5	Determinación molecular y fenotípica de factores de resistencia					X	X	X	X				
6	Determinación molecular y fenotípica de factores de virulencia					X	X	X	X				
7	Analizar las características relacionadas a la procedencia del aislamiento								X	X	X	X	X
8	Análisis general de resultados								X	X	X	X	X
9	Redacción de material escrito y presentación						X	X	X	X	X	X	X
10	Presentación de resultados en un congreso, con fines de divulgación científica												X
11	Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

8.- Referencias (formato APA)

- Aires-De-Sousa, M., De La Rosa, J. M. O., Gonçalves, M. L., Pereira, A. L., Nordmann, P., & Poirel, L. (2019). Epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 25(9), 1632–1638. <https://doi.org/10.3201/eid2509.190656>
- Arena, F., De Angelis, L. H., Pieralli, F., Di Pilato, V., Giani, T., Torricelli, F., D'Andrea, M. M., & Rossolini, G. M. (2015). Draft genome sequence of the first hypermucoviscous *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* isolate from a bloodstream infection. *Genome Announcements*, 3(5). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00952-15>
- Bandeira, M., Carvalho, P. A., Duarte, A., & Jordao, L. (2014). Exploring dangerous connections between *Klebsiella pneumoniae* biofilms and healthcare-associated infections. *Pathogens*, 3(3), 720–731. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030720>
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., & Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48(1), 1–12. <https://doi.org/10.1086/595011>
- Brinkac, L. M., White, R., D'Souza, R., Nguyen, K., Obaro, S. K., & Fouts, D. E. (2019). Emergence of New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM-5) in *Klebsiella quasipneumoniae* from Neonates in a Nigerian Hospital. *MSphere*, 4(2), 685–703. <https://doi.org/10.1128/msphere.00685-18>
- Brisse, S., Passet, V., & Grimont, P. A. D. (2014). Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., Isolated from human infections, With two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., And demonstration th. *International Journal of Systematic*

- and Evolutionary Microbiology*, 64, 3146–3152.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.062737-0>
- Candan, E. D., & Aksöz, N. (2015). Klebsiella pneumoniae: Characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. *Acta Biochimica Polonica*, 62(4), 867–874. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1148
- Catalán-Nájera, J. C., Garza-Ramos, U., & Barrios-Camacho, H. (2017). Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary Klebsiella spp. phenotypes? In *Virulence* (Vol. 8, Issue 7, pp. 1111–1123). <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1317412>
- CDC. (2019). *Biggest Threats and Data | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC*. 2019. <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>
- Choby, J. E., Howard-Anderson, J., & Weiss, D. S. (2020). Hypervirulent Klebsiella pneumoniae – clinical and molecular perspectives. *Journal of Internal Medicine*, 287(3), 283–300. <https://doi.org/10.1111/joim.13007>
- Chung, P. Y. (2016). The emerging problems of Klebsiella pneumoniae infections: Carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 363(20), 1–6. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw219>
- Cubero González, M. (2015). *Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización de los mecanismos de resistencia de Klebsiella pneumoniae*.
- Dortet, L., Brécard, L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2014). Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from blood cultures. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), 340–344. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12318>
- Ernst, C. M., Braxton, J. R., Rodriguez-Osorio, C. A., Zagieboylo, A. P., Li, L., Pironti, A., Manson, A. L., Nair, A. V., Benson, M., Cummins, K., Clatworthy, A. E., Earl, A. M., Cosimi, L. A., & Hung, D. T. (2020). Adaptive evolution of virulence and persistence in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. *Nature Medicine*, 26(5), 705–711.

<https://doi.org/10.1038/s41591-020-0825-4>

- Espino, D., Sosa Díaz, J., & Sosa Díaz, R. Y. (2018). *Klebsiella pneumoniae*, un patógeno de alta prioridad para la fabricación de nuevos antibióticos. *Rev. Medica Electron*, 40(4), 1271–1273.
- Eyler, R. F., & Shvets, K. (2019). Clinical pharmacology of antibiotics. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 14(7), 1080–1090. <https://doi.org/10.2215/CJN.08140718>
- Follador, R., Heinz, E., Wyres, K. L., Ellington, M. J., Kowarik, M., Holt, K. E., & Thomson, N. R. (2016). The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microbial Genomics*, 2(8), e000073. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000073>
- Fonseca, E. L., Ramos, N. da V., Andrade, B. G. N., Morais, L. L. C. S., Marin, M. F. A., & Vicente, A. C. P. (2017). A one-step multiplex PCR to identify *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae* in the clinical routine. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 87(4), 315–317. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.005>
- Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., Moreno-Domínguez, S., Toribio-Jiménez, J., Jardón-Pineda, D., Cuevas-Peña, J., Sánchez-Pérez, A., Duran-Bedolla, J., Olguín-Rodríguez, J., & Román-Román, A. (2018). Phenotypic and molecular characterization of *Klebsiella* spp. isolates causing community-acquired infections. *New Microbes and New Infections*, 23, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.02.002>
- Garza-Ramos, Ulises, Silva-Sánchez, J., Martínez-Romero, E., Tinoco, P., Pina-Gonzales, M., Barrios, H., Martínez-Barnetche, J., Gómez-Barreto, R. E., & Tellez-Sosa, J. (2015). Development of a Multiplex-PCR probe system for the proper identification of *Klebsiella variicola* Microbial genetics, genomics and proteomics. *BMC Microbiology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0396-6>
- Garza Ramos, U., Silva-Sánchez, J., & Martínez-Romero, E. (2009).

- Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. In *Salud Publica de Mexico* (Vol. 51, Issue SUPPL.3). <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000900009>
- Getzeman, C., & Faustino, N. (2016). *Caracterización de Klebsiella spp . clínicas y ambientales en el estado de Guerrero. 2.*
- Gutiérrez Muñoz, J., Ramírez Corona, A., Martínez Bustamante, M. E., Coria Lorenzo, J. de J., Armenta Gallegos, L., Ayala Franco, J. R., Bernal Granillo, S. M., Zaleta Flores, F. J., García Pérez, F. E., Rochín Monjardín, J. A., Martínez Fuentes, G., Gutiérrez Muñoz, V. H., & Cuenca Suárez, J. A. (2017). Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Rev Latin Infect Pediatr*, 30, 68–75. www.medigraphic.org.mx<http://www.medigraphic.com/rlip>
- Hala, S., Antony, C. P., Alshehri, M., Althaqafi, A. O., Alsaedi, A., Mufti, A., Kaaki, M., Alhaj-Hussein, B. T., Zowawi, H. M., Al-Amri, A., & Pain, A. (2019). First report of *Klebsiella quasipneumoniae* harboring bla KPC-2 in Saudi Arabia. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0653-9>
- Humberto, B. C., Jesús, S. S., Elena, C. A., Luis, L. A., Josefina, D. B., Alejandro, A. V., Elvira, G. G., Paola, B. I., Rayo, M. O., Rigoberto, H. C., & Ulises, G. R. (2021). PCR system for the correct differentiation of the main bacterial species of the *Klebsiella pneumoniae* complex. *Archives of Microbiology*, 204(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02668-x>
- Imai, K., Ishibashi, N., Kodana, M., Tarumoto, N., Sakai, J., Kawamura, T., Takeuchi, S., Taji, Y., Ebihara, Y., Ikebuchi, K., Murakami, T., Maeda, T., Mitsutake, K., & Maesaki, S. (2019). Clinical characteristics in blood stream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*: a comparative study, Japan, 2014-2017. *BMC Infectious Diseases*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4498-x>

- Jiménez Pearson, M. A., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Duarte Valderrama, C., Salgado Marcano, N., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. (2020). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 1–7. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2019.65>
- Kim, D., Park, B. Y., Choi, M. H., Yoon, E. J., Lee, H., Lee, K. J., Park, Y. S., Shin, J. H., Uh, Y., Shin, K. S., Shin, J. H., Kim, Y. A., & Jeong, S. H. (2019). Antimicrobial resistance and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* affecting 30 day mortality in patients with bloodstream infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(1), 190–199. <https://doi.org/10.1093/jac/dky397>
- Kim, J.-M., Chung, Y.-S., Jo, H. J., Lee, N.-J., Kim, M. S., Woo, S. H., Park, S., Kim, J. W., Kim, H. M., & Han, M.-G. (2020). Identification of Coronavirus Isolated from a Patient in Korea with COVID-19 Osong Public Health and Research Perspectives. *Public Health Res Perspect*, 11(1), 3–7.
- Kumabe, A., & Kenzaka, T. (2014). String test of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Qjm*, 107(12), 1053. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcu124>
- Lai, Y. C., Lu, M. C., & Hsueh, P. R. (2019). Hypervirulence and carbapenem resistance: two distinct evolutionary directions that led high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones to epidemic success. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 19(9), 825–837. <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1649145>
- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Jeon, J. H., Kim, Y. B., Cha, C. J., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2017). Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(NOV). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00483>

- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2016). Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895>
- Li, J., Li, Y., Song, N., & Chen, Y. (2020). Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection: A meta-analysis. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 21, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.006>
- Lin, D., Chen, J., Yang, Y., Cheng, J., & Sun, C. (2018). Epidemiological study of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Open Medicine (Poland)*, 13(1), 460–466. <https://doi.org/10.1515/med-2018-0070>
- Liu, C., Shi, J., & Guo, J. (2018). High prevalence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* infection in the genetic background of elderly patients in two teaching hospitals in China. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1031–1041. <https://doi.org/10.2147/IDR.S161075>
- Lopardo, H. A., Predari, S. C., & Vay, C. (2016). Bacterias de importancia clínica. In *Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología* (Vol. 1). <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>
- Marlène, I., & Salgado, R. (2018). *Frecuencia de infecciones asociadas a la atención de la salud en los principales sistemas de información de México APUNTES EN SALUD* (Vol. 3). www.who.int/gpsc/background/es/index.html.
- Martínez-Romero, E., Rodríguez-Medina, N., Beltrán-Rojel, M., Silva-Sánchez, J., Barrios-Camacho, H., Pérez-Rueda, E., & Garza-Ramos, U. (2018). Genome misclassification of *Klebsiella variicola* and *Klebsiella quasipneumoniae* isolated from plants, animals and humans. *Salud Pública de Mexico*, 60(1), 56–62. <https://doi.org/10.21149/8149>
- Martínez R., D., Araque, Y., Rodulfo, H., Caña, L., García, J., González, D.,

- Rodríguez, L., & de Donato, M. (2016). Relación clonal y detección del gen blaKPC en cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, en un hospital de Venezuela. *Revista Chilena de Infectología*, 33(5), 524–530. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000500006>
- Martínez Romero, E., Rodríguez Medina, N., Beltrán Rojel, M., Toribio Jiménez, J., & Garza Ramos, U. (2018). *Klebsiella variicola* and *Klebsiella quasipneumoniae* with capacity to adapt to clinical and plant settings. *Salud Pública de Mexico*, 60(1), 29–40. <https://doi.org/10.21149/8156>
- Mathers, A. J., Crook, D., Vaughan, A., Barry, K. E., Vegesana, K., Stoesser, N., Parikh, H. I., Sebra, R., Kotay, S., Sarah Walker, A., & Sheppard, A. E. (2019). *Klebsiella quasipneumoniae* provides a window into carbapenemase gene transfer, plasmid rearrangements, and patient interactions with the hospital environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(6). <https://doi.org/10.1128/AAC.02513-18>
- Mathers, A. J., Crook, D., Vaughan, A., Barry, K., Vegesana, K., Stoesser, N., Parikh, H., Sebra, R., Kotay, S., Walker, A. S., & Sheppard, A. E. (2018). *Klebsiella quasipneumoniae* provides a window into carbapenemase gene transfer, plasmid rearrangements and nosocomial acquisition from the hospital environment. In *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/486753>
- Mike, L. A., Harry Mobley, L. T., Khadka*, S., Ring*, B., Krzeminski, L. R., Hathaway, M., & Walker, R. S. (2022). Regulation of *Klebsiella pneumoniae* mucoidy by the bacterial tyrosine kinase Wzc. *BioRxiv*.
- Moreno-Monge, K. M. (2013). Terapéutica Médica Carbapenémicos : Tipos Y Mecanismos De Resistencia. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica* LXX, 608(608), 599–605. <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/608/art8.pdf>
- Munoz-Price, L. S., Poirel, L., Bonomo, R. A., Schwaber, M. J., Daikos, G. L.,

- Cormican, M., Cornaglia, G., Garau, J., Gniadkowski, M., Hayden, M. K., Kumarasamy, K., Livermore, D. M., Maya, J. J., Nordmann, P., Patel, J. B., Paterson, D. L., Pitout, J., Villegas, M. V., Wang, H., ... Quinn, J. P. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious Diseases*, *13*(9), 785–796. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7)
- Nordmann, P., Dortet, L., & Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, *18*(5), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.003>
- Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(10), 1791–1798. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
- Octavia, S., Kalisvar, M., Venkatachalam, I., Ng, O. T., Xu, W., Sridatta, P. S. R., Ong, Y. F., Wang, L. De, Chua, A., Cheng, B., Lin, R. T. P., & Teo, J. W. P. (2019). *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella quasipneumoniae* define the population structure of blaKPC-2*Klebsiella*: A 5 year retrospective genomic study in Singapore. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *74*(11), 3205–3210. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz332>
- OMS. (2017). *OMS | Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria*. Who. https://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/es/
- OMS. (2018). *Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo*. Comunicado de Prensa. <https://www.who.int/es/news-room/detail/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>
- Paczosa, M. K., & Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *80*(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00078-15>
- Patrier, J., & Timsit, J. F. (2020). Carbapenem use in critically ill patients. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *33*(1), 86–91. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000622>

- Peña, I. (2016). *Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología molecular y alternativas terapéuticas*. 194. <http://eprints.ucm.es/38513/1/T37533.pdf>
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
- Reyes, J., Aguilar, A. C., & Caicedo, A. (2019). Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Microbiology key points for clinical practice. *International Journal of General Medicine*, 12, 437–446. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S214305>
- Rodríguez Medina, N., Barrios Camacho, H., Duran Bedolla, J., & Garza Ramos, U. (2019). *Klebsiella variicola*: an emerging pathogen in humans. *Emerging Microbes and Infections*, 8(1), 973–988. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1634981>
- Rodríguez Medina, N., Martínez Romero, E., De la Cruz, M. A., Ares, M. A., Valdovinos-Torres, H., Silva-Sánchez, J., Lozano-Aguirre, L., Martínez-Barnetche, J., Andrade, V., & Garza-Ramos, U. (2020). A *Klebsiella variicola* Plasmid Confers Hypermucoviscosity-Like Phenotype and Alters Capsule Production and Virulence. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.579612>
- Rosenthal, M. P. (2013). *Microbiología Médica. séptima ed.*
- Russo, T. A., & Marr, C. M. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 3). <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-19>
- Sagal Prado, A., Garza Ramos Martínez, J. U., & Martínez Barnetche, J. (2018). *GENÓMICA COMPARATIVA DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE CON DIFERENTES FENOTIPOS Y GENOTIPOS*. INSP.
- Santajit, S., & Sirijan, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE Pathogens. *PBioMed Research International*, 2016(1155), 1–

8.

Schooneveldt, J. M., Nimmo, G. R., & Giffard, P. (1998). Detection and characterisation of extended spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* causing nosocomial infection. *Pathology*, *30*(2), 164–168. <https://doi.org/10.1080/00313029800169156>

Secretaría de salud. (2017). *Informe Anual 2015 RHOVE*. <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-rhove-2015>

Secretaría de Salud. (2019). *Manual para la Implementación de los Paquetes de Acciones para Prevenir y Vigilar las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS)*.

Silva, J., Aguilar, C., Ayala, G., Estrada, M. A., Ledezma, L., Al, S. E. T., & Hemother, A. N. A. G. C. (2000). TLA-1 :a New Plasmid-Mediated Extended-Spectrum β -Lactamase from *Escherichia coli*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, *44*(4), 997–1003.

Silveira, M. C., Azevedo da Silva, R., Faria da Mota, F., Catanho, M., Jardim, R., R Guimarães, A. C., & de Miranda, A. B. (2018). Systematic Identification and Classification of β -Lactamases Based on Sequence Similarity Criteria: β -Lactamase Annotation. *Evolutionary Bioinformatics*, *14*. <https://doi.org/10.1177/1176934318797351>

Simar, S., Sibley, D., Ashcraft, D., & Pankey, G. (2017). Evaluation of the rapid polymyxin NP Test for polymyxin B resistance detection using enterobacter cloacae and enterobacter aerogenes isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, *55*(10), 3016–3020. <https://doi.org/10.1128/JCM.00934-17>

Solomon, S., Akeju, O., Odumade, O. A., Ambachew, R., Gebreyohannes, Z., Wickle, K. Van, Abayneh, M., Metaferia, G., Carvalho, M. J., Thomson, K., Sands, K., Walsh, T. R., Milton, R., Goddard, F. G. B., Bekele, D., & Chan, G. J. (2021). Prevalence and risk factors for antimicrobial resistance among newborns with gramnegative sepsis. *PLoS ONE*, *16*(8 August), 1–25.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255410>

Sosa, O., Mtías, B., González, J., Juárez, R., & Estrada, A. (2019). Infecciones asociadas a la atención de la salud por bacterias del grupo eskape en un hospital de la Ciudad de México 2013-2017 Introducción. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 39(2), 59–64.

Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>

Tacconelli, E., & Magrini, N. (2018). World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. In *JMS - Journal of Medical Society* (Vol. 32, Issue 1). https://doi.org/10.4103/jms.jms_25_17

Villegas, M. V., Lolans, K., Correa, A., Suarez, C. J., Lopez, J. A., Vallejo, M., & Quinn, J. P. (2006). First detection of the plasmid-mediated class a carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(8), 2880–2882. <https://doi.org/10.1128/AAC.00186-06>

Walker, K. A., Treat, L. P., Miller, V. L., & Sepúlveda, V. E. (2020). The small protein RmpD drives hypermucoviscosity in *Klebsiella pneumoniae*. *BioRxiv*, 11(5), 1–14. <https://doi.org/10.1101/2020.01.08.899096>

Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>

World Health Organization. (2017). Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos Manual para la primera fase de implementación. In *Organización Panamericana de la Salud*. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/253135/978924354940>

8-

spa.pdf;jsessionid=2A16A42C5F3EBB3479831920D6C3F3D6?sequence=1%0Ahttps://www.who.int/antimicrobial-resistance/es/

Wyres, K. L., Lam, M. M. C., & Holt, K. E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*, 18(6), 18. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>

Yang, Y., Liu, J. H., Hu, X. X., Zhang, W., Nie, T. Y., Yang, X. Y., Wang, X. K., Li, C. R., & You, X. F. (2020). Clinical and microbiological characteristics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) in a hospital from North China. *Journal of Infection in Developing Countries*, 14(6), 606–613. <https://doi.org/10.3855/jidc.12288>