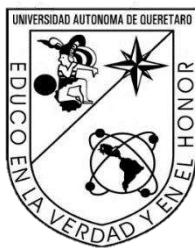


EBC. QFB. Bibiana
Flores Monzón

“Caracterización molecular de aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* de un hospital público de la ciudad de Querétaro”

2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias en Biomedicina

“Caracterización molecular de aislamientos clínicos de
Klebsiella pneumoniae de un hospital público de la
ciudad de Querétaro”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

Presenta:

EBC. QFB. Bibiana Flores Monzón

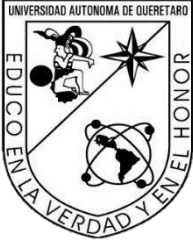
Dirigido por:

Dra. María Carlota García Gutiérrez

Co-Director:

Dr. Jesús Ulises Garza Ramos Martínez

Querétaro, Qro. México.
Mayo del 2021.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias en Biomedicina

“Caracterización molecular de aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* de un hospital público de la ciudad de Querétaro”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

Presenta:

EBC. QFB. Bibiana Flores Monzón

Dirigido por:

Dra. María Carlota García Gutiérrez

Co-Director

Dr. Jesús Ulises Garza Ramos Martínez

SINODALES

Dra. María Carlota García Gutiérrez

Presidente

Dr. Jesús Ulises Garza Ramos Martínez

Secretario

Dr. Pablo García Solís

Vocal

Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie

Suplente

Dr. Juan Carlos Solís Sainz

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

(Mayo, 2021)

México

DEDICATORIA

“El éxito en la vida no se mide por lo que logras, sino por los obstáculos que superas”

Emma Sousa Toraño

Este trabajo es dedicado a Dios y a mi familia, el camino fue complicado durante estos años, pero gracias a su apoyo incondicional y al de muchas otras personas que llevo en el corazón logramos salir adelante.

Gracias a mis padres por ser la clave de cada uno de los proyectos que realizamos, por ser el pilar en mi vida y enseñarme a luchar contra todo a pesar de las circunstancias, por mostrarme el valor de la familia, el valor de la responsabilidad y el deseo de superarnos día con día.

Dirección General de Bibliotecas UJAQ

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro, a través de la división de posgrado de la Facultad de Medicina, a la Maestría de Ciencias en Biomedicina programa incorporado al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad PNPC-CONACYT, al núcleo académico y profesores externos que ayudan en la formación de nuevos estudiantes.

Agradezco a la Dra. María Carlota García Gutiérrez por ser la clave de dicho proyecto, por brindarme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; por su paciencia y disposición.

Agradezco al Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en Cuernavaca Morelos, en especial al equipo del Laboratorio de Resistencia Bacteriana en el Centro de Investigación sobre enfermedades infecciosas por el apoyo brindado durante mi estancia académica.

Agradezco al Dr. Jesús Ulises Garza Ramos, profesor investigador en Ciencias Médicas del INSP, por aceptar ser mi co-director, compartir sus conocimientos en el área, por las aportaciones a mi trabajo y ser mi apoyo durante la estancia en el instituto.

Agradezco a mis sinodales, el Dr. Juan Carlos Solís Sainz, al Dr. Pablo García Solís y a la Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie por las aportaciones durante la revisión de dicho trabajo.

Agradezco el apoyo económico por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con el Número de Beca: 714953.

Este trabajo fue financiado por el proyecto "Estudio epidemiológico molecular de microorganismos ESKAPE obtenidos en hospitales de salud pública del estado de Querétaro", con el fondo FOFI-UAQ 2018 (FME201809).

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE GENERAL.....	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
RESUMEN	11
I. INTRODUCCIÓN	13
I.1 Justificación	14
II. ANTECEDENTES	14
II.1 Generalidades	15
II.1.1 <i>K. pneumoniae</i>	15
II.1.2 Taxonomía	15
II. 2 <i>K. pneumoniae</i> “clásica” e “hipervirulenta”	15
II. 2.1 <i>K. pneumoniae</i> “clásica”	16
II.2.2 <i>K. pneumoniae</i> “hipervirulenta”	16
II.3 Resistencia antimicrobiana	16
II.3.1 Antimicrobianos β -lactámicos.....	17
II.3.2 Clasificación de enzimas β -lactamasas.....	18
II.3.3 β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	18
II.3.4 Carbapenémicos	19
II.3.5 Colistina	20
II.4 Factores de virulencia.....	20
II.4.1 Cápsula (CPS)	21
II.4.2 Serotipos capsulares K1 y K2	21
II.4.3 Hiper mucoviscosidad	22
II.4.4 Lipopolisacárido (LPS)	22
II.4.5 Adhesinas	23
II.4.6 Producción de biofilm	23
II.4.7 Resistencia al suero	24
II.5 Epidemiología	24
II.5.1 <i>K. pneumoniae</i> en el mundo	24

II.5.2 <i>K. pneumoniae</i> en México	25
II.6 Tipificación molecular	26
II.6.1 PFGE	26
II.6.2 MLST.....	27
II.6.3 Complejos clonales de <i>K. pneumoniae</i>	28
III. OBJETIVOS	28
III.1 General	28
III.2 Específicos	28
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	28
IV.1 Diseño.....	28
IV.2 Definición del universo	29
IV.3 Tamaño de la muestra.....	29
IV.4 Criterios de Inclusión	29
IV.5 Criterios de Exclusión.....	29
IV.6 Criterios de Eliminación.....	29
IV.7 Origen de los aislamientos de <i>K. pneumoniae</i>	29
IV.8 Conservación de <i>K. pneumoniae</i>	29
IV.10 Producción de carbapenemasas (Carba NP).....	29
IV.11 Prueba presuntiva de resistencia a Colistina.....	30
IV.12 Test de hipermucoviscosidad	30
IV.13 Producción de biofilm en placas de poliestireno.....	30
IV.14 Resistencia al suero	31
IV.15 Extracción de DNA	31
IV.16 Confirmación de especie.....	31
IV.17 Detección de genes de resistencia, virulencia y serotipos capsulares (K1/K2).....	33
IV. 18 Electroforesis.....	33
IV.19 Tipificación molecular por PFGE	33
IV.20 Tipificación molecular por secuenciación de genoma completo (análisis MLST).....	34
IV.21 Definición del plan de procesamiento y presentación de la información. .	34
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
VII. CONCLUSIONES.....	45
VIII. REFERENCIAS.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Oligonucleótidos para identificación de especies <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. quasipneumoniae</i> y <i>K. variicola</i> .	33
Tabla 2. Condiciones de reacción (25µL), PCR multiplex para identificación de <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. quasipneumoniae</i> y <i>K. variicola</i> .	33
Tabla 3. Condiciones PCR multiplex para identificación de <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. quasipneumoniae</i> y <i>K. variicola</i> .	34
Tabla 4. Oligonucleótidos específicos para genes de <i>K. pneumoniae</i> .	34
Tabla 5. Genes MLST de <i>K. pneumoniae</i> .	36
Tabla 6. Características del fenotipo de resistencia y virulencia en aislamientos clínicos de <i>Klebsiella</i> .	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa, PCR-multiplex para identificación de especie (N=control negativo, P=control positivo, Kp= <i>K. pneumoniae</i> , Kq= <i>K. quasipneumoniae</i> y Kv= <i>K. variicola</i>).	35
Figura 2. Frecuencia de aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> por tipo de muestra.	38
Figura 3. Frecuencia de aislamientos nosocomiales y comunitarios de <i>K. pneumoniae</i> productores de BLEE (prueba de χ^2 , $p < 0.05$).	39
Figura 4. Frecuencia de aislamientos productores de BLEE por tipo de muestra respecto al total de aislamientos (prueba de χ^2 , $p < 0.05$).	40
Figura 5. Frecuencia de aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> productores de biofilm alto/moderado por resistencia (A/M= Alto/Moderado, B/NP= Bajo/No productor).	43
Figura 6. Frecuencia de aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> productores de biofilm alto/moderado por tipo de muestra (A/M= Alto/Moderado, B/NP= Bajo/No productor).	43
Figura 7. Frecuencia de aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> hipermucoviscosos por tipo de muestra.	44

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusión cerebro-corazón
BLEE	β -lactamasa de espectro extendido
Ca	Calcio
CC	Complejos Clonales
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades
CE	Consulta externa
CI	Cuidados intensivos
CP-hvKP	<i>K. pneumoniae</i> hipervirulenta productora de carbapenemasa.
CPS	Cápsula
CR	Cirugía
CTX-M	β -lactamasa tipo CTX-M
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterobacter</i>
EUA	Estados Unidos de América
Fig.	Figura
HENyM	Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer
IAAS	Infecciones asociadas a la atención de la salud
IDSA	Sociedad de enfermedades infecciosas de América
IL	Interleucina
IMP	Metallo- β -lactamasa activa sobre imipenem
IRAS	Infección respiratoria aguda
ITS	Infección del torrente sanguíneo
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>K. quasipneumoniae</i>	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>
<i>K. variicola</i>	<i>Klebsiella variicola</i>
Kb	Kilo base
KpC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> clásica
KPC	<i>K. pneumoniae</i> productora de carbapenemasa
KPC-1/KPC-2	β -lactamasas de tipo KPC
Kphv	<i>Klebsiella pneumoniae</i> hipervirulenta
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido

Mb	Mega base
mcr	Gen de resistencia a colistina móvil
MDR	Multidrogorresistente
Mg	Magnesio
MI	Medicina interna
mL	Mililitro
MLB	Metalo- β -lactamasa
MLST	Tipificación de secuencias multilocus
mM	Micromolar
MO`s	Microorganismos
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidroxido de sodio
NDM	Metalo- β -lactamasa Nueva Dheli
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
OXA	Carbapenemasa tipo Oxacilinas
pb	Pares de base
PBP	Proteínas de unión a la penicilina
PBS	Buffer de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campos pulsados
PTZ	Piperacilina-tazobactam
RHOVE	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SHV-1/SHV-2	β -lactamasa tipo SHV
ST	Secuencia tipo
Subsp.	Subespecie
TAE	Tris-acetato-EDTA
Taq polimerasa	<i>Thermus aquaticus</i> polimerasa
TEM-1/TEM-2	β -lactamasa tipo TEM
TLR	Receptor tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
VIM	Metalo- β -lactamasa Verona codificada por integrones
ZnSO4	Sulfato de zinc
μ L	Microlitro

RESUMEN

Introducción: Las infecciones por *K. pneumoniae* son un problema de salud pública, se identifica una cepa clásica y otra hipervirulenta causantes de infecciones nosocomiales y comunitarias; a nivel filogenético existen tres especies estrechamente relacionadas *K. pneumoniae*, *K. variicola* y *K. quasipneumoniae* difícil de diferenciar por métodos bioquímicos; en México representa el segundo agente causal de brotes intrahospitalarios, la CDC y la OMS la han clasificado como una de las amenazas más peligrosas por la MDR; poseen factores de virulencia (producción de biofilm, hipermucoviscosidad, serotipo capsular y sideróforos) que favorecen la persistencia en el medio hospitalario; el CC23 es el linaje dominante, la ST258 y ST23 las secuencias de mayor riesgo. **Objetivo:** Confirmación de especie en aislamientos de *K. pneumoniae*, determinación del fenotipo y genotipo de resistencia/virulencia y la identificación del complejo clonal por métodos filogenéticos. **Metodología:** Se estudiaron 56 aislamientos de *K. pneumoniae*, analizando la producción de BLEE, carbapenemasas (CarbaNP), resistencia a colistina (Polimixin NP), test de hipermucoviscosidad, producción de biofilm, confirmación de especie por PCR multiplex, análisis de los genes de virulencia *mpaA*, *iucA* y la identificación del serotipo capsular K1 y K2. **Resultados:** El 98.2% fue confirmado como *K. pneumoniae* y el resto como *K. variicola*, el 87.5% fue aislado de infecciones nosocomiales y el 12.5% de infecciones en pacientes ambulatorios; medicina interna (41%) fue el servicio médico más frecuente y las bacteremias (32.1%) las infecciones más comunes; el 71.43% fue productor de BLEE/MDR sobre todo en aislamientos de sangre y secreción bronquial; el 12.5% fue resistente a carbapenémicos y el 3.6% productor de carbapenemasas, el 8.9% es presuntamente resistente a colistina; la producción de biofilm se identificó en el 78.6% y el 30.5% presentó un fenotipo hipermucoviscoso. **Conclusión:** Las infecciones en medicina interna y del torrente sanguíneo fueron las más frecuentes; la producción de BLEE es el mecanismo más común de resistencia, mientras que la producción de carbapenemasas y resistencia a colistina es un problema que surge; los aislamientos de pacientes ambulatorios se caracterizaron por ser altamente susceptibles, no se encontraron cepas hipervirulentas y en este estudio no existe relación significativa entre el análisis de resistencia y virulencia.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, multidrogorresistencia, hipermucoviscosidad, hipervirulencia.

ABSTRAC

Introduction: *K. pneumoniae* infections are a public health problem, a classic strain and another hypervirulent strain are identified causing nosocomial and community infections; at the phylogenetic level there are three closely related species *K. pneumoniae*, *K. variicola* and *K. quasipneumoniae* difficult to differentiate by biochemical methods; in Mexico it represents the second causal agent of in-hospital outbreaks, the CDC and WHO have classified it as one of the most dangerous threats due to MDR; they have virulence factors (biofilm production, hypermucoviscosity, capsular serotype and siderophores) that favor persistence in the hospital environment; CC23 is the dominant lineage, ST258 and ST23 the highest risk sequences. **Objective:** Confirmation of species in isolates of *K. pneumoniae*, determination of the phenotype and genotype of resistance / virulence and identification of the clonal complex by phylogenetic methods. **Methodology:** 56 isolates of *K. pneumoniae* were studied, analyzing the production of ESBL, carbapenemases (CarbaNP), resistance to colistin (Polimixin NP), hypermucoviscosity test, biofilm production, species confirmation by multiplex PCR, analysis of the genes of virulence *rmpA*, *iucA* and identification of the capsular serotype K1 and K2. **Results:** 98.2% were confirmed as *K. pneumoniae* and the rest as *K. variicola*, 87.5% were isolated from nosocomial infections and 12.5% from infections in outpatients; internal medicine (41%) was the most frequent medical service and bacteremias (32.1%) the most common infections; 71.43% were a producer of ESBL / MDR, especially in blood and bronchial secretion isolates; 12.5% were resistant to carbapenems and 3.6% produced carbapenemases, 8.9% are presumptively resistant to colistin; biofilm production was identified in 78.6% and 30.5% presented a hypermucoviscous phenotype. **Conclusion:** Internal medicine and bloodstream infections were the most frequent; the production of ESBL is the most common mechanism of resistance, while the production of carbapenemases and resistance to colistin is a problem that arises; outpatient isolates were characterized as highly susceptible, no hypervirulent strains were found, and in this study there is no significant relationship between resistance and virulence analysis.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, multidrug resistance, hypermucoviscosity, hypervirulence.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones por *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) son actualmente un problema de salud pública a nivel mundial, es considerada como un patógeno oportunista y forma parte de la microbiota intestinal humana. Aunque genéticamente y fenotípicamente es diversa, el éxito clínico se debe a sus características de resistencia y virulencia (Lai et al., 2019).

Aquellas que persisten en el entorno hospitalarios se conocen como *K. pneumoniae* clásica (KpC) que afecta a pacientes inmunocomprometidos, causando infecciones del tracto urinario, respiratorio, bacteremias e infecciones de sitio quirúrgico (Paczosa y Meccas, 2016); a nivel epidemiológico han recibido mayor importancia debido a la capacidad de adquirir genes que le confieren resistencia tras el uso prolongado e inadecuado de antimicrobianos.

Por otro lado, a nivel comunitario se ha convertido en un patógeno clínicamente significativo, reconocido como *K. pneumoniae* hipervirulenta (Kphv), que afecta a pacientes ambulatorios e inmunocompetentes, se caracteriza por ser altamente virulenta, con limitada resistencia y causar infecciones como abscesos hepáticos que pueden ir acompañados de complicaciones sépticas como endoftalmitis y meningitis (Shon et al., 2013).

Si bien los tratamientos iniciales para las cepas hipervirulentas fueron eficientes el uso inadecuado de antimicrobianos y el mal control hospitalario ha llevado a la diseminación y convergencia de ambas poblaciones bacterianas, originando la aparición de variantes que representan un riesgo para la salud humana (Russo et al., 2019).

Durante los últimos años se ha desarrollado un incremento en la incidencia de infecciones causadas por bacterias multidrogorresistentes (MDR), siendo *K. pneumoniae* MDR un problema que persiste en el ambiente hospitalario, a esto se suma *K. variicola* y *K. quasipneumoniae*, siendo especies estrechamente relacionadas y que son imposibles de diferenciar de *K. pneumoniae* por métodos microbiológicos convencionales como se realiza en los laboratorios clínicos. Su alta plasticidad le ha permitido adquirir genes que le confieren resistencia contra los últimos antimicrobianos utilizados para su tratamiento; así mismo, la aparición de infecciones a nivel comunitario por cepas hipervirulentas es un problema emergente; en la actualidad los aislamientos de pacientes con ambos fenotipos son detectados con mayor frecuencia, el problema no solo representa un riesgo para el individuo sino que también implica una fuente potencial de transmisión a otros pacientes vulnerables.

A pesar de la amenaza, existe poca información sobre el comportamiento de *K. pneumoniae* en nuestro país, la prevención de transmisión depende del reconocimiento de los factores de virulencia que permiten su éxito en el entorno y la caracterización de sus mecanismos de resistencia el uso adecuado de

antibióticos, por lo que el objetivo de este estudio, es determinar las características microbiológicas y moleculares que determinan su resistencia y virulencia con la finalidad de conocer la diversidad genética de los aislamientos obtenidos en un hospital y su epidemiología a nivel local.

I.1 Justificación

La persistencia de infecciones a nivel nosocomial por *K. pneumoniae*, el aumento de infecciones a nivel comunitario, así como la confluencia de ambas poblaciones, han surgido recientemente como una amenaza para la salud pública, la poca información que se tiene sobre todo a nivel local y considerando que es un problema de atención mundial, existe la necesidad de caracterizar las cepas endémicas de nuestra región y establecer la relación genética y epidemiológica entre los aislamientos obtenidos que permitan el reconocimiento de casos, pues una mayor comprensión de la virulencia, resistencia y transmisión conduce a estrategias innovadoras que permitan el desarrollo de nuevas opciones de tratamiento y evitar la expansión de especies de alto riesgo.

II. ANTECEDENTES

En 2008, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) destacó bajo el acrónimo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*) un conjunto de bacterias que han logrado evadir prácticamente la mayoría de los antimicrobianos utilizados para su tratamiento y que son la causa más común de infecciones intrahospitalarias (Pendleton *et al.*, 2013).

En México *K. pneumoniae* representa uno de los principales agentes responsables de infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), en 2015 fue el segundo agente causal de brotes intrahospitalarios, afectando principalmente al área neonatal y asociado a infecciones del torrente sanguíneo, respiratorio y vías urinarias (RHOVE, 2017).

En 2017 el Centro para el control y prevención de enfermedades (CDC) de los Estados Unidos (EU) evaluó el tipo de amenaza que representan los microorganismos (MO's) MDR clasificando a *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa como uno de los MO's de amenaza urgente y que es responsable de más del 50% de las infecciones causadas por este grupo (CDC, 2019). En este mismo año otro informe por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la primera lista en la que se incluyen las 12 familias bacterianas más peligrosas para la salud humana y para las cuales se requiere incentivar en investigación y tratamiento, la lista se divide en tres categorías clasificadas como

prioridad crítica, alta o media, dentro de las cuales *K. pneumoniae* carbapenemasa se encuentra en categoría crítica (OMS, 2019).

II.1 Generalidades

II.1.1 *K. pneumoniae*

K. pneumoniae fue descubierta por primera vez en 1882 por Carl Friedlander, después de aislar la bacteria de personas que habían muerto de neumonía; en 1885 se le designó el nombre del género en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs y en 1887 fue clasificada en torno a su especie. Es un bacilo Gram-negativo perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae*, encapsulado, inmóvil, fermentador de lactosa, oxidasa negativa y catalasa positiva. Se pueden encontrar en suelo, aguas superficiales, plantas y dispositivos médicos; es un patógeno oportunista que coloniza fácilmente la mucosa humana, el tracto gastrointestinal, la piel, la nariz, garganta y la orofaringe. Desempeña un papel fundamental como causa de enfermedades infecciosas oportunistas, siendo la segunda enterobacteria más importante después de *Escherichia coli* (*E. coli*); ha sido responsable de infecciones adquiridas a nivel comunidad y nosocomial, incluyendo neumonías, infecciones del tracto urinario, bacteremias y meningitis; además de comprender cerca del 80% de los microorganismos Gram-negativos en aislamientos de pacientes con largos periodos de estancia hospitalaria (Paczosa y Meccas, 2016).

II.1.2 Taxonomía

La epidemiología molecular y reconstrucción filogenética, ha permitido ampliar la taxonomía del género *Klebsiella*, demostrando que el complejo conocido como *K. pneumoniae* se pueden dividir en tres especies estrechamente relacionadas; el filogrupo conocido como KpI representa más del 80% de los aislamientos conformado por *K. pneumoniae* subespecie (subsp.) *pneumoniae* como la especie predominante; en 2004 fue descrita por primera vez *K. variicola* (KpIII) y en 2014 identificada *K. quasipneumoniae* (Brisse *et al.*, 2014). Estas especies comparten características bioquímicas y fenotípicas que impiden clasificarlas por métodos microbiológicos tradicionales, sin embargo, presentan distintos perfiles epidemiológicos, de resistencia y virulencia basados en la composición de su genoma accesorio (Holt *et al.*, 2015; Martin y Bachman, 2018).

II. 2 *K. pneumoniae* “clásica” e “hipervirulenta”

A nivel de fenotipo y genotipo, *K. pneumoniae* se ha clasificado en dos poblaciones de acuerdo al grupo de individuos que afecta y el tipo de infección que provoca; actualmente la mayoría de las infecciones intrahospitalarias se debe a una población descrita como “clásica” cuya relevancia clínica se debe a las

características de resistencia que presenta, por otro lado, aquella infección por *K. pneumoniae* de tipo invasiva y adquirida en la comunidad en individuos sanos es denominada como “hipervirulenta”.

II. 2.1 *K. pneumoniae* “clásica”

Conocida como KpC, causa infecciones de tipo nosocomial, afecta a pacientes inmunocomprometidos, incluyendo a personas que padecen diabetes o tumores malignos, provocando neumonía, bacteremia, infecciones del tracto urinario y meningitis (Paczosa y Meccas, 2016).

Una variedad de factores como la adquisición de genes que codifican para enzimas hidrolíticas, la disminución de expresión de proteínas de membrana externa y la sobreexpresión de bombas de flujo de salida han permitido ampliar el perfil de resistencia en este tipo de población (Li *et al.*, 2019). Se han observado dos principales tipos de resistencia, uno de ellos implica la expresión de enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), que brinda resistencia contra cefalosporinas y monobactamas. El otro mecanismo, la expresión de carbapenemasas con resistencia a casi todos los β -lactámicos disponibles, incluidos los carbapenémicos y finalmente el mecanismo contra colistina y tigeciclina, moléculas terapéuticas de último recurso (Blin *et al.*, 2017).

II.2.2 *K. pneumoniae* “hipervirulenta”

Fue descrita en 1986 en Taiwán, conocida como Kphv, que tiene la capacidad de causar infecciones graves adquiridas a nivel comunitario, afecta a individuos jóvenes e inmunocompetentes, se presenta como infecciones de tipo invasivo, causando principalmente abscesos hepáticos que pueden ir acompañados de complicaciones sépticas como meningitis y endoftalmitis (Lai *et al.*, 2019).

Se caracteriza por la hiperproducción de exopolisacáridos capsulares que le confieren un fenotipo hipermucoviscoso, expresan sideróforos que le ayudan a adquirir hierro del hospedero y que por la baja presión selectiva antimicrobiana son menos resistentes (Hao *et al.*, 2019). La mayoría de estos casos se han descrito en Asia y se han extendido en América y Europa, donde su prevalencia es menor (Sánchez *et al.*, 2019).

II.3 Resistencia antimicrobiana

El tratamiento de elección contra *K. pneumoniae* recae principalmente en el uso de cefalosporinas, antibióticos pertenecientes a la familia de los β -lactámicos, empleados ampliamente en la práctica clínica, sin embargo después de su introducción en 1980 y tras ser anunciada como un avance importante contra la resistencia mediada por β -lactamasas en 1983 fue reportado el primer informe de

K. pneumoniae productora de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en Alemania, capaz de hidrolizar la mayoría de los antimicrobianos β -lactámicos incluyendo las cefalosporinas, situación que la llevó a ingresar al grupo de bacterias multirresistentes (Ali Abdel Rahim y Ali Mohamed, 2014).

El uso de carbapenémicos ha constituido en los últimos un tratamiento de elección contra *K. pneumoniae* productora de BLEE, sin embargo en 1996 fue detectada en Carolina del Norte EUA una cepa de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC), capaz de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, hecho que confirmó su entrada al panel de las “superbacterias” y que se ha extendido en todo el mundo, mostrando una tasa de mortalidad de hasta el 40% y generando gran impacto tras minimizar las opciones de tratamiento (Campos *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2018).

Bajo estas circunstancias la tigeciclina y la colistina se convirtieron en el último recurso para el tratamiento de KpC, durante mucho tiempo el uso de colistina quedó como última reserva debido a los problemas de nefrotoxicidad y neurotoxicidad que representa su uso prolongado y gracias a la introducción de medicamentos menos tóxicos; sin embargo, tras la aparición de cepas resistentes a penicilinas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, β -lactámicos, cefalosporinas y carbapenémicos se ha reconsiderado el uso de este antimicrobiano como una opción terapéutica en pacientes en estado crítico, desafortunadamente el uso indiscriminado ha permitido identificar desde 2005 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a colistina, reportándose casos en Europa, América Latina, América del Norte, Asia y Sudáfrica (Young *et al.*, 2014).

II.3.1 Antimicrobianos β -lactámicos

Son un grupo de antimicrobianos utilizados para el tratamiento de bacterias Gram-negativas, presentan en su estructura un anillo β -lactámico, heterocíclico tres átomos de carbono y uno de nitrógeno, capaz de fusionarse con otros anillos y presentar diferentes sustituyentes, clasificándolos en cuatro grupos principales: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos (Suarez y Gudiol, 2009).

Su mecanismo de acción se da en la pared celular, al bloquear la síntesis de peptidoglucano en la última etapa de transpeptidación y la activación de una autolisina bacteriana; se consideran bactericidas parciales pues solo actúan en fase de crecimiento y multiplicación celular. Inducen una mayor liberación de endotoxinas debido a su rápida acción, provocando una mayor respuesta inflamatoria (Kong *et al.*, 2010).

II.3.2 Clasificación de enzimas β -lactamasas

Son clasificadas de acuerdo con dos esquemas generales: el esquema molecular de Ambler clasifica las β -lactamasas en cuatro clases de acuerdo a su homología proteínica, la clase A, C y D requieren de serina en su centro activo (serino-enzimas), mientras que las enzimas de clase B poseen una o dos moléculas de zinc (metalo-enzimas) (Navarro *et al.*, 2011), por otro lado el esquema funcional de Bush-Jacoby-Medeiros las clasifica de acuerdo con el sustrato que hidrolizan y su inhibidor (ácido clavulánico, EDTA, aztreonam u oxacilina); el grupo 2be es representado por enzimas que derivan de TEM-1, TEM-2 o SHV-1 en un solo aminoácido y que son las clases principales en *K. pneumoniae* (Shaikh *et al.*, 2014).

- **Tipo SHV:** Se encuentra principalmente en *K. pneumoniae*, el gen que codifica para SHV-1 reside en el cromosoma bacteriano, le confiere resistencia a penicilinas de amplio espectro como la ampicilina, tigeciclina y piperacilina, es la responsable de hasta el 20% de resistencia ante estos antimicrobianos.
- **Tipo TEM:** Presenta un perfil similar a la clasificación funcional respecto a las SHV-1, es capaz de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas de primera generación, TEM-3 presenta una mayor actividad contra cefalosporinas de tercera generación, se han descrito más de 100 tipos, algunas de ellas con resistencia a los inhibidores.
- **Tipos CTX-M:** Hidroliza la cefotaxima, no se encuentra directamente relacionado con TEM y SHV y son inhibidas por sulbactam y el clavulanato; se originan a partir de genes cromosómicos, adquiridos mediante la transferencia horizontal de plásmidos conjugativos; se ha sugerido que el residuo de serina en la posición 237 desempeña un papel fundamental en su actividad hidrolítica (Paterson y Bonomo 2005; Shaikh *et al.*, 2014).

II.3.3 β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas capaces de hidrolizar el puente amida del anillo penicilánico o cefalosporánico y producir moléculas ácidas sin propiedades bactericidas, evitando que el antimicrobiano pueda unirse a las proteínas transportadoras (PBP), actúa frente a todas las penicilinas, cefalosporinas (menos las cefamicinas) y las monobactamas, pero no las carbapenemasas, siendo inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Pana *et al.*, 2018).

En 1940 se describe la primera enzima β -lactamasa producida por *E. coli*, tras la introducción de la ampicilina en 1960 se describe una nueva enzima con la misma función llamada TEM-1, más tarde se describe en *K. pneumoniae* una enzima capaz de degradar tanto a las penicilinas como a las cefalosporinas de primera generación

y fue llamada SHV-1; hacia 1983 en Alemania fue aislada de *K. pneumoniae* la primera enzima capaz de degradar las cefalosporinas de tercera generación (amplio espectro) y el aztreonam, producto de mutaciones que difieren en solo uno o dos aminoácidos respecto a las enzimas inicialmente reportadas, fueron llamadas SHV-2 (Bush, 2010; García *et al.*, 2010).

En 1989 se reportó Europa occidental y América del Sur una enzima diferente a SHV y TEM, la cual fue nombrada CTX-M1 por su capacidad hidrolítica frente a cefotaxima; y más tarde a finales de 1991 en Turquía y Francia se aislaron las primeras enzimas tipo OXA (oxacilinasas) con la capacidad de hidrolizar oxacilina (Bush, 2010). El éxito de estas bacterias se debe a la presencia de genes tipo *bla_{BLEE}* en elementos móviles (plásmidos o trasposones) que son fácilmente transferibles y que confieren resistencia a otros antimicrobianos como aminoglucósidos, clotrimazol y quinolonas. (García *et al.*, 2010).

II.3.4 Carbapenémicos

Los carbapenémicos son β -lactámicos de amplio espectro, utilizados para el tratamiento de infecciones por *K. pneumoniae* productora de BLEE, comparten en su estructura un anillo de carbapenem fusionado con un anillo beta-lactámico (Nordmann y Poirel, 2014). La resistencia a este tipo de antimicrobianos se debe a múltiples factores, entre los que destacan la alteración de la permeabilidad de la membrana externa mediada por porinas, la regulación de bombas de flujo que liberan el antimicrobiano y la hiperproducción de carbapenemasas (Chen *et al.*, 2014). Las β -lactamasas de tipo KPC están codificadas por el gen *bla_{KPC}*, pueden estar presentes en el cromosoma bacteriano o en elementos genéticos móviles, pertenecen a la clase de β -lactamasas tipo A (dependientes de serina) y son inhibidas débilmente por el ácido clavulánico y el tazobactam; *K. pneumoniae* ST258 con KPC-1 y KPC-2 contribuye significativamente a la propagación de su resistencia al ser clones de alto riesgo (Nordmann *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2016).

Las β -lactamasas de tipo B o metalo- β -lactamasas (MLB) han sido identificadas también en cepas de *K. pneumoniae*, son enzimas de tipo NDM, VIM e IMP; que le proporciona resistencia contra carbapenémicos, pero sensibilidad frente a monobactamas, colistina, fosfomicina y tigeciclina; su actividad es inhibida por quelantes como el EDTA; algunas de estas bacterias presentan además β -lactamasas AmpC mediadas por plásmidos (CMY), BLEE (CTX-M-15) y otras carbapenemasas tipo OXA-48, VIM y KPC. Las carbapenemasas de tipo OXA-48 han sido reportados en *K. pneumoniae* forman parte de la clase D e hidrolizan débilmente los carbapenémicos. (Pitout *et al.*, 2015, Lee *et al.*, 2016; El-Gamal *et al.*, 2017).

II.3.5 Colistina

El primero brote de *K. pneumoniae* resistente se reportó en Grecia en 2004 (Antoniadou *et al.* 2007). La colistina o polimixina E es un antimicrobiado polipeptídico con efecto bactericida que interactúa con las moléculas de lipopolisacáridos en la membrana bacteriana de bacterias Gram-negativas, la carga positiva del anillo policatiónico permite la unión al componente lipídico A hidrófobo del lipopolisacárido presente en la envoltura celular, provocando el desplazamiento de Ca^{+2} y Mg^{+2} (estabilizadores de membrana) de los grupos fosfatos del lipopolisacárido (LPS) cambiando la permeabilidad y causando la liberación del contenido celular, recientemente se ha demostrado que además induce la muerte celular rápida a través de la producción de radicales libres (Mi *et al.*, 2014).

Su resistencia se debe al cambio de la carga negativa en la membrana externa tras cambiar los grupos fosfato del lípido A por 4-amino-4-desoxi-1-arabinosa o fosfoetanolamina; aunque el mecanismo no es claro los análisis genómicos de 2015 indicaban resistencia debido a mutaciones cromosomales, en donde la activación del gen *mgrB* aumenta la regulación del sistema de señalización PhoP/PhoQ, la activación del operón *pmrHFIJKLM* regulado por *PmrA* y la presencia de *ArnB* permiten la modificación de los lipopolisacáridos (Ah *et al.*, 2014; Bialvaei y Samadi, 2015).

En 2016 Liu y colaboradores mostraron la resistencia mediada por un plásmido denominado gen de resistencia a colistina movilizadora (*mcr-1*) codificante de transferasas de fosfoetanolamina que cataliza su adición en el lípido A del LPS, lo que resulta en una baja afinidad de las polimixinas por la membrana externa (Liu Y *et al.*, 2016).

II.4 Factores de virulencia

Las bacterias poseen mecanismos de patogenicidad específicos que emergen al superar las defensas del hospedero, la virulencia es una medida cuantitativa de la patogenicidad. A lo largo de la evolución han adquirido características que les permiten invadir el ambiente del hospedero, expresar receptores superficiales especializados para su adhesión, permanecer en estos sitios a través de colonización, evadir el sistema inmune y finalmente causar daño con el fin de lograr acceso y fuentes de nutrientes necesarios para su crecimiento, por lo que un factor o determinante de virulencia es un componente que favorece el crecimiento o sobrevivencia en el ambiente o durante la infección (Cárdenas *et al.*, 2014).

K. pneumoniae presenta una gran variedad de factores de virulencia que favorecen su persistencia en las superficies de dispositivos médicos y la evasión del sistema inmunológico en el proceso de infección en el huésped; entre ellos destacan la

estructura de su cápsula, la presencia de fimbrias, lipopolisacáridos, transportadores de membrana, la formación de biofilm y la presencia de sideróforos (Vuotto *et al.*, 2017). Los factores de virulencia están codificados por genes presentes tanto en el genoma cromosómico como el genoma plasmídico, su presencia determina la gravedad de la infección y por lo tanto define la capacidad de virulencia de la cepa en el proceso de infección (Martin y Bachman, 2018).

II.4.1 Cápsula (CPS)

Está compuesta por el ensamblaje de polisacáridos complejos con repeticiones de 3-6 subunidades, catalizadas por diferentes glicosiltransferasas de manera secuencial y sintetizada por la vía de polimerización dependiente de Wzy; en donde las repeticiones nacientes son transferidas a la membrana interna por una flipasa Wzx y se someten a polimerización por Wzy en el espacio periplasmático, su exportación como CPS maduro a la superficie celular es mediado por Wza, Wzb y Wzc (Li *et al.*, 2014). La composición de su cápsula determina el serotipo K y el grado de virulencia; hasta el momento se han descrito 78 serotipos capsulares para *K. pneumoniae*, entre los que predominan K1 y K2 por su fenotipo hipermucoviscoso (hipervirulento) debido a un aumento en la producción de polisacárido capsular que le brinda una mayor resistencia contra el sistema del complemento, los péptidos antimicrobianos y la actividad bactericida (Shon *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014; Catalán *et al.*, 2017).

Es uno de los principales mecanismos de patogenicidad, la presencia de una capa gruesa protege a *K. pneumoniae* de la fagocitosis por los macrófagos, induce la maduración de las células dendríticas y neutraliza las defensas del huésped (Clegg y Murphy, 2016); afecta la acción bactericida de los péptidos antimicrobianos como la lactoferrina y las defensinas- β al unir las moléculas de manera distal a la membrana externa, impide la interacción con los componentes del complemento y evitan a activación fulminante del sistema inmunológico tras la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), IL-8, IL-6 y TNF- α (Paczosa y Meccas, 2016). El gen *rmpA* y su isoforma *rmpA2* codifican para los activadores de transcripción de los genes para la síntesis de CPS y el fenotipo hipermucoviscoso en *K. pneumoniae* (Hsu *et al.*, 2011).

II.4.2 Serotipos capsulares K1 y K2

K1/K2 carecen de repeticiones de residuos de manosa las cuales son reconocidas por el receptor de unión a manosa presente en los macrófagos, expresan en su superficie ácido siálico monosacárido similar al del huésped que permite la evasión de las células inmunitarias, estudios anteriores reportan que reduce la liberación de especies reactivas de oxígeno por los neutrófilos permitiéndole sobrevivir en los

tejidos humanos y finalmente se ha reportado la presencia de una mayor variedad de antígenos O (parte más externa del LPS) en K1 y K2 predominantes en infecciones humanas (Follador *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017).

II.4.3 Hipermucoviscosidad

La presencia de una hipercápsula está asociada además a un fenotipo de mucoviscosidad elevado o hipermucoviscosidad, que se define como la formación de un filamento viscoso $\geq 5\text{mm}$ cuando se toca con el asa una colonia de esta bacteria.

El gen *rmpA* es el principal regulador del fenotipo mucoide, activando la hiperproducción capsular; se ha informado la presencia de tres genes *rmpA* en las cepas hvKP, dos de ellos transportados por plásmidos (*p-rmpA* y *p-rmpA2*) y uno de ellos presente en el DNA cromosómico (*c-rmpA*) que contribuyen al aumento en la expresión de genes capsulares (Lee *et al.*, 2016).

Muchos autores han reportado una fuerte asociación con la hipervirulencia (Struve *et al.*, 2015), sin embargo, en otros estudios aislamientos positivos para *rmpA* mostraron un bajo fenotipo de mucoviscosidad y baja virulencia, asociados a mutaciones en los genes *rmpA2* y la ausencia de *c-rmpA* (Yu *et al.*, 2015).

Catalán y colaboradores describen en un artículo publicado en 2017 que el fenotipo de hipermucoviscosidad no debe usarse como sinónimo para referirse a las cepas hipervirulentas, pues una prueba de cuerdas positiva de hipermucoviscosidad no siempre es asociado con la agresividad de la cepa, por lo que debe ser considerado como dos fenotipos distintos y para los cuales se deben evaluar los genes asociados a cada uno (Catalán *et al.*, 2017).

II.4.4 Lipopolisacárido (LPS)

Los lipopolisacáridos también llamados endotoxinas constan de tres dominios; una región altamente conservada llamada lípido A, anclado hidrofóticamente en la membrana externa, compuesta de sacarolípidos y ácidos grasos que lo potencian como un activador de inflamación y para el cual *K. pneumoniae* ha demostrado modificar este sitio para reducir su efecto inflamatorio y protegerse contra la acción bactericida de los péptidos antimicrobianos catiónicos (Paczosa y Mecsas, 2016); el antígeno O constituye la región variable más externa, también llamada cadena lateral O, formada por la repetición de unidades de polisacáridos que le confieren su carácter de serotipificación y resistencia contra los efectos del sistema del complemento; el tercer dominio está compuesto por una región central o núcleo de oligosacárido que representa el punto de anclaje al cual se une el antígeno O (Shon *et al.*, 2013).

La modificación en este factor de virulencia es benéfica durante la infección, sin embargo, también puede ser un activador inmunológico ya que la porción lipídica A es un ligando de TLR4 que induce la producción de citosinas que ayudan a reclutar los neutrófilos que eliminan la bacteria y controlan la propagación a otros tejidos. Se han descrito al menos 9 serotipos (O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 y O12), siendo O1 (formado por unidades D-galactano I y D-galactona II) el más común entre los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* y presenta una mayor hipermucoviscosidad; el antígeno O es el principal factor de resistencia contra el complemento en el suero y es reconocido como el mediador más poderoso del shock séptico y algunas modificaciones pueden brindar protección contra polimixinas (Li *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2015).

II.4.5 Adhesinas

Un paso fundamental en la progresión de la infección es la adhesión a la superficie de las células epiteliales del huésped, en *K. pneumoniae* se debe a la presencia de fimbrias tipo 1 (*fim*, manosa sensible) y fimbrias tipo 3 (*mrk*, manosa resistente) (Martin y Bachman, 2018).

Las fimbrias tipo 1 son estructuras finas y rígidas, formadas por repeticiones de moléculas de FimA y cuya propiedad adherente esta mediada por la molécula de FimH presente en la punta, esta codificada en el locus *fimBEAICDFGHK*, se ha asociado al establecimiento inicial en infecciones del tracto respiratorio y urinario, permite la adhesión a células tubulares y proximales, así como a la mucosa humana y estructuras que contienen manosa (Wang *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 2018).

Las fimbrias tipo 3 se caracterizan por ser más delgadas, el gen *mrkA* codifica la subunidad mayor que es polimerizada, mientras que *mrkD* codifica la adhesina ubicada en la punta de la fimbria, responsable de la hemaglutinación y resistencia a manosa, *mrkB*, *mrkC* y *mrkE* codifican para otras proteínas que permiten el ensamble y regulación de la expresión fimbrial y *mrkF* mantiene su estabilidad (Murphy y Clegg, 2012); se caracterizan por mediar la adhesión a células epiteliales en riñón y pulmón, sin embargo tienen una mayor contribución a la formación de biofilm en infecciones del tracto urinario, se cree que ambos tipos desempeñan un papel fundamental en la colonización de catéteres urinarios (Martin *et al.*, 2018).

II.4.6 Producción de biofilm

El biofilm se define como una población de células unidas de forma irreversible, se encuentra cubierta por una matriz hidratada de sustancias exopoliméricas, proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos (Costerton, 2001). Su formación es un desarrollo complejo que implica la fijación e inmovilización sobre una superficie, la

interacción entre células, la formación de microcolonias, la formación de una capa confluyente y finalmente el desarrollo de una estructura tridimensional (O'Toole *et al.*, 2000). La regulación de genes como respuesta a la densidad celular se da por un proceso llamado “detección de quórum”, un sistema de transducción de señales que favorece la producción de moléculas autoinductoras, que permiten la expresión genética colectiva, regulando una gran variedad de actividades fisiológicas como simbiosis, virulencia, competencia, conjugación, motilidad y formación de biopelículas (Miller y Bassler, 2001).

En *K. pneumoniae* se ha reportado que los genes *cps* capsulares, *mrk* de las fimbrias tipo 3, *wbbM* y *wzm* del antígeno O, el gen *luxS* (sistema regulador de quorum tipo 2) y el operón *pgaABCD* (síntesis y translocación de poli- β -1,6-N-acetil-D-glucosamina en adhesinas) están relacionados con la producción de biofilm tras promover la adhesión intercelular y la unión a superficies abióticas (Vuotto *et al.*, 2017).

II.4.7 Resistencia al suero

El principal factor responsable de la lisis mediada por factores del complemento es la producción de lipopolisacárido, en donde el antígeno O que forma parte de su estructura protege contra la acción del complemento tras prevenir la unión con el componente C1, además de unirse a C3b en la membrana externa, evitando la formación de poros y anulando la lisis mediada por este mecanismo, de esta forma la ausencia del antígeno O le confiere menor virulencia tras aumentar la opsonofagocitosis (Shankar *et al.*, 2004).

En algunos casos la cápsula se une a las moléculas producidas por la respuesta inmune y evita la interacción con la superficie bacteriana, por lo que bloquea la acción bactericida, de esta forma un fenotipo de hipercápsula aumenta la resistencia a las defensas humorales y la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos, además de evitar la unión del componente C3 del complemento evitando la lisis; la producción de la hipercápsula se ha asociado con la síntesis de fucosa gracias al gen *wcaG* y por ende a una mayor virulencia (Paczosa y Mecsas, 2016).

II.5 Epidemiología

II.5.1 *K. pneumoniae* en el mundo

En Brasil la frecuencia de *K. pneumoniae* productora de BLEE es más alta que la observada en países europeos y americanos, representando el 45% de las infecciones por *K. pneumoniae* (Marra *et al.*, 2006).

Un estudio realizado en EUA en 2012 reportó una prevalencia del 16% de *K. pneumoniae* productora de BLEE, con una alta tasa en pacientes de la unidad de

cuidados intensivos (Pana *et al.*, 2018). Un reporte publicado por la CDC en 2013 tras una encuesta realizada en 2011 a 183 hospitales en el mismo país indicó que estas mismas cepas causaron el 23% de las infecciones nosocomiales, lo que equivale a 17,000 infecciones y causaron 1,100 muertes, mientras que cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas causaron el 11% de las infecciones nosocomiales y causaron 520 muertes (CDC, 2013).

La extensión endémica de KPC ha sido informado en los EUA, México, China, Italia, Polonia, Grecia, Israel, Brasil, Argentina, Colombia, Taiwán y esporádicamente en países europeos y en regiones del Pacífico (Munoz Price *et al.*, 2013; Nordmann y Poirel, 2014).

La resistencia a colistina ha sido reportada en Europa, América del Norte, América del Sur, Asia y Sudáfrica, la tasa global más alta reside en Grecia (10.5%-20%), seguida de Corea del Sur y Canadá (Mi *et al.*, 2014).

Recientemente investigadores en China, la India y Taiwán han reportado la aparición de brotes por cepas resistentes a carbapenémicos e hipervirulentos, que han causado la muerte en pacientes de cuidados intensivos por la adquisición de un plásmido de virulencia pLVPK en cepas de *K. pneumoniae* clásicas en 2015 (Gu *et al.*, 2018). En 2016 y 2018 se han reportado en China dos aislamientos de Kphv resistentes a colistina (Gu *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2018). En 2019 Karlsson y colaboradores identificaron un aislamiento de CP-hvKP de origen nosocomial en Estados Unidos y en el mismo año en Canadá, Mataseje y colaboradores reportaron dos aislamientos comunitarios CP-hvKP del mismo paciente a partir de muestras de orina e hisopado rectal (Mataseje *et al.*, 2019, Karlsson *et al.*, 2019).

II.5.2 *K. pneumoniae* en México

En el 2001 se describió en México *K. pneumoniae* productora de BLEE como un patógeno pediátrico importante, en este primer reporte se identificaron aislamientos provenientes de un brote ocurrido en 1996 (Rodríguez-Noriega *et al.*, 2014) en ese mismo año se reportó un artículo que describe la problemática en el área neonatal del Hospital General de la ciudad de México, tras la diseminación clonal de *K. pneumoniae* multiresistente en el año de 1999 (Gonzalez-Vertiz *et al.*, 2001).

En 2013 se reporta por primera vez en México el primer brote de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC-3) perteneciente a la secuencia tipo ST258 descrita a nivel mundial y perteneciente al complejo clonal C292, en aislamientos clínicos recolectados en septiembre del 2010 de pacientes con infección del tracto respiratorio y ventilación mecánica de un hospital de la ciudad de México (Rodríguez, *et al.*, 2013); en 2014 se identifican dos brotes no relacionados correspondientes a la misma cepa pandémica ST258, pero identificados como KPC-2 (Garza-Ramos *et al.*, 2014).

En el año 2015 *K. pneumoniae* ocupó el tercer lugar en aislamientos nosocomiales, presentando una tendencia ascendente a partir del 2009 (5.2%-9.5%), en el mismo año se identificó como el segundo microorganismo de mayor frecuencia en unidades de terapia intensiva pediátrica, el primer lugar en unidades de terapia intensiva neonatal, el segundo lugar en infecciones del torrente sanguíneo (ITS), ocupando el segundo lugar en ITS asociadas a catéteres (11.6%), tercer lugar en pacientes inmunocomprometidos (13.3%), segundo en ITS con nutrición parenteral (16.2%); agente causal de Neumonía (12.4%), principales agentes de infecciones en vías urinarias (6.9%) y el cuarto lugar en infecciones relacionadas con procedimientos quirúrgicos e infecciones de piel y tejidos (6.8% y 9.7% respectivamente). *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *K. pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa*) representaron en el mismo año el 43.5% del total de los brotes asociados a infecciones intrahospitalarias, en donde *K. pneumoniae* ocupa el segundo lugar con un 15.6%, seguido por *P. aeruginosa* con un 11.5% (Ruíz, 2017). En México Catalán y colaboradores han descrito aislamientos de *K. pneumoniae* hipervirulentos pertenecientes al serotipo capsular K2, pertenecientes a los tipos de secuencia 86 y 380; recolectados en los periodos 2006-2016, que se caracterizan por ser ampliamente susceptibles (Catalán *et al.*, 2019).

II.6 Tipificación molecular

La necesidad de una caracterización con mayor resolución ha llevado al uso de técnicas de tipificación molecular que nos permiten reconocer la relación genética entre aislamientos bacterianos vinculados epidemiológicamente y que derivan de un ancestro común o bien diferenciarlos; aquellos grupos que descienden de un ancestro común o que proceden de la misma fuente o cadena de transmisión se denominan complejos clonales (CC) y tienen la característica de tener un nivel de similitud genética muy elevado

Las técnicas van desde la restricción del DNA cromosómico mediante la Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) o la Tipificación de secuencias multilocus (MLST) que en conjunto con las técnicas microbiológicas permiten una mayor discriminación. (Fernández *et al.*, 2013).

II.6.1 PFGE

PFGE es un método empleado para evaluar la relación epidemiológica entre la mayoría de las bacterias clínicamente relevantes, permitiendo la separación de fragmentos de DNA de alto peso molecular (10Kb-10Mb) (Goering, 2010; Cardozo *et al.*, 2013), alternando el campo eléctrico entre pares de electrodos, de esta manera crea perfiles simples tras la reorientación del DNA a diferentes velocidades y a través de los poros en un gel de agarosa (Herschleb *et a.*, 2007).

Fue descrita en 1984 para mapear el genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el protozooario *Trypanosoma brucei* (Schwartz y Cantor, 1984), más tarde hacia 1990 el método fue utilizado en los laboratorios de salud pública y control de infecciones hospitalarias, utilizado para comparar cepas aisladas durante la investigación de brotes; se le ha llamado el estándar de oro, ya que permite visualizar el patrón de macrorrestricción de más del 90% del total de su genoma permitiendo la monitorización cromosómica (Goering, 2010).

Una gran ventaja radica en que las inserciones, eliminaciones o recombinaciones dentro del DNA genómico afectarán directamente el perfil de PFGE y que el DNA plasmídico no interfiere en los patrones de macrorrestricción, debido a que los fragmentos son demasiado pequeños, sin embargo, algunas bacterias han demostrado transportar plásmidos de más de 5 Kb con diferencia en una banda (Sabat *et al.*, 2013). Por estas características la técnica de PFGE ha evolucionado el estudio de enfermedades bacterianas y tiene aplicaciones en programas para el control de enfermedades invasivas, contaminación o monitorización de cepas particulares. Su éxito se debe a que es una técnica muy versátil y de alto poder discriminatorio (Goering, 2010; Besser, 2015).

En 2013 Han y colaboradores reportaron el primer protocolo optimizado para el análisis de *K. pneumoniae* por la técnica de PFGE modificando un protocolo estándar y analizando diferentes parámetros electroforéticos para obtener un mejor poder discriminatorio (Han *et al.*, 2013).

II.6.2 MLST

Es una técnica propuesta en 1998 como un método para la caracterización de linajes virulentos de *Neisseria meningitidis* (Maiden *et al.*, 2006); tiempo más tarde la técnica se extendió a otras especies bacterianas, siendo en la actualidad una herramienta muy utilizada para estudiar la evolución molecular de especies patógenas.

La técnica se basa en utilizar solo una fracción del genoma completo, analiza los polimorfismos de nucleótidos en siete genes metabólicos (*house-keeping*) altamente conservados en los que la tasa de mutación es muy baja, tras la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) individual y secuenciación de fragmentos internos de aproximadamente 450-500 pb, pequeñas variaciones en la secuencia de estos genes permiten diferenciar las distintas cepas de una misma especie (Rivas *et al.*, 2007, Sabat *et al.*, 2012).

MLST usa los alelos como unidad de comparación, en el que cada cambio alélico es considerado como un evento genético único (independientemente del número de polimorfismos de nucleótido involucrados), es así que para cada secuencia única de cada locus se les asigna un número de alelo arbitrario y único que en conjunto forman un perfil alélico, éste a su vez designa un tipo de secuencia (ST), que resume

el comportamiento de dichas cepas y que apoya en el agrupamiento de CC la construcción de dendogramas que permiten relacionar las cepas genéticamente (Maiden *et al.*, 2013).

Diancourt y colaboradores reportaron en 2005 el primer protocolo de MLST en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*, identificando 40 perfiles alélicos distintos, los datos fueron corroborados utilizando la ribotipificación y mostrando un poder discriminatorio del 96% (Diancourt *et al.*, 2005).

II.6.3 Complejos clonales de *K. pneumoniae*.

En los últimos 15 años la cepa ST258 y el CC258, se han distribuido mundialmente, representando una grave amenaza tras ser el responsable de la diseminación de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC); análisis indican que la cepa es un híbrido, en donde el 80% del cromosoma es homólogo a una cepa ST11 y el 20% restante a la cepa ST442 (Chen *et al.*, 2015).

La tipificación MLST ha revelado que la mayoría de las cepas de Kphv del serotipo K1 forman parte del complejo clonal CC23 y los serotipos K2 a diferentes tipos de complejos no relacionados, indicando que el complejo CC23 confiere una mayor hipervirulencia y una mayor aptitud ambiental (Struve *et al.*, 2015).

Un estudio reciente en Asia mostró que se encontraron ocho tipos de secuencia diferentes entre los aislados del serotipo K2 de Kphv (ST65, ST66, ST86, ST373, ST374, ST375, ST380 y ST434) (Lin *et al.*, 2014).

III. OBJETIVOS

III.1 General

Caracterizar los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* de un Hospital Público de la ciudad de Querétaro.

III.2 Específicos

1. Confirmar la especie de los aislamientos de *K. pneumoniae*.
2. Determinar el fenotipo y genotipo de resistencia.
3. Determinar el fenotipo y genotipo de virulencia.
4. Analizar el perfil filogenético.
5. Identificar los complejos clonales.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1 Diseño

Estudio de tipo transversal descriptivo.

IV. Definición del universo

Aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* del Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer de la ciudad de Querétaro.

IV.3 Tamaño de la muestra

Aislamientos recolectados durante el periodo de Noviembre 2016-Marzo 2019.

IV.4 Criterios de Inclusión

Fueron considerados todos los aislamientos de *K. pneumoniae* identificados por sistema Vitek2, incluyendo cualquier servicio médico, origen de la muestra y edad del paciente.

IV.5 Criterios de Exclusión

Aislamientos pertenecientes a otra especie del género *Klebsiella*.

IV.6 Criterios de Eliminación

Fueron eliminados los aislamientos con expediente incompleto, contaminados con otro género bacteriano y aquellos que se perdieron por mala conservación.

IV.7 Origen de los aislamientos de *K. pneumoniae*

Se seleccionaron 56 aislamientos recolectados durante el periodo Noviembre 2016 a Marzo 2019, identificados como *K. pneumoniae* por el laboratorio clínico del Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer (HENyM); la información acerca del tipo de muestra y servicio médico de procedencia fue obtenida a partir de los reportes clínicos del laboratorio.

IV.8 Conservación de *K. pneumoniae*

Los aislamientos fueron conservados en caldo BHI con 15% de glicerol y almacenados a -70°C, posteriormente fueron resembrados en agar Luria Bertani (LB) a 37°C para el análisis de fenotipo y genotipo de resistencia-virulencia.

IV.9 Análisis de susceptibilidad antimicrobiana.

Se analizó el antibiograma obtenido en el equipo semiautomatizado Vitek2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) con las tarjetas AST-GN70. Con base en los resultados de susceptibilidad se identificaron los aislamientos MDR (no susceptibles a uno o más agentes antimicrobianos de 3 o más categorías), productores de enzimas BLEE y los resistentes a algún carbapenémico.

IV.10 Producción de carbapenemasas (Carba NP).

La prueba bioquímica Carba NP se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Nordmann y Poirel. En 100 µL de buffer de lisis Tris-HCl 20 mmol / L se resuspendió

1-2 colonias bacteriana con crecimiento en agar LB, se agitó en vórtex por 1min y se incubó a 25°C/30 min. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm, se mezclaron 30 µL del sobrenadante sobre una microplaca de poliestireno de 96 pocillos con 100 µL de solución de 6mg/mL de imipenem(6 mg de monohidrato de imipenem, pH 7.8, rojo de fenol 0.05% y 0.1 mmol/L de ZnSO₄), y se incubó a 37°C/2h.El cambio de color de rojo a amarillo fue considerado como positivo (Nordman y Poirel,2012). Paralelamente se realizó el mismo procedimiento, mezclando la suspensión bacteriana con 100µL de una solución libre de imipenem como control de medio, además de utilizar una cepa resistente a imipenem como control positivo. La solución de rojo fenol se preparó mezclando 2 ml de una solución de rojo fenol (Merck Millipore) al 0,5% (peso / vol) con 16,6 ml de agua destilada. El valor del pH se ajustó luego a 7,8 mediante la adición de gotas de NaOH 1 N.

IV.11 Prueba presuntiva de resistencia a Colistina

Se realizó mediante la prueba Polimixin NP (Nordmann *et al.*, 2016). 50 µL de una dilución 10⁻¹ de una suspensión 0.5 de McFarland con NaCl al 0,9% estéril, se mezclaron en un pocillo con 150 µL de solución de polimixin NP libre de colistina y en otro pocillo con 150 µL de solución de polimixin NP-5 µg/mL de sulfato de colistina (Sigma- Aldrich, Buchs, Suiza) en una placa de poliestireno. Paralelamente, como control de medio, se mezclaron 50 µL de NaCl al 0,9% con la solución de polimixin NP. La placa se incubó a 37°C/4 h realizando una inspección visual cada hora para observar el cambio de color. La prueba se consideró negativa cuando el pozo que contenía la mezcla con colistina permaneció naranja, positivo cuando pasó de naranja a amarillo y no interpretable cuando el pocillo libre de colistina no viró de color.Como control positivo se utilizó una muestra de *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) conresistencia intrínsecaa polimixinas.

IV.12 Test de hipermucoviscosidad

La detección de hipermucoviscosidad se realizó mediante la prueba “string test” o prueba de cuerdas, el cual consistió en observar un filamento mucoide ≥ 5mm de longitud (prueba positiva) cuando se tocó la colonia con el asa bacteriológica sobre una placa de agar MacConkey; una vez realizado este procedimiento las cepas se clasificaron como fenotipo mucoviscoso o hipermucoviscoso (Catalán-Nájera *et al.*, 2017).

IV.13 Producción de biofilm en placas de poliestireno.

El ensayo de biofilm se determinó utilizando la metodología descrita por Baldisserotto *et al.*, 2013 con algunas modificaciones. Se prepararon suspensiones

0.5 de McFarland de las colonias resembradas 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 y se incubaron por 18-20h/37°C (por triplicado). Tras incubación se realizaron tres lavados por inversión con 200 μ L de PBS, se dejaron secar en estufa y se adicionaron 200 μ L de safranina al 0.2% por 30 min/25°C, se desechó el colorante y se lavó nuevamente con 200 μ L de PBS dejando secar por 20 min. El colorante unido al biofilm fue resolubilizado con 200 μ L de etanol:acetona (80:20 v/v) y se agitó suavemente durante 10 segundos; se leyó la Densidad Óptica (DO) a 492 nm en un lector de ELISA y la producción de biofilm se clasificó 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 .

IV.14 Resistencia al suero

Se seleccionaron los aislamientos positivos para los serotipos capsulares K1 y K2; se tomaron 100 μ L de cultivo de *K. pneumoniae* a partir de caldo LB y se inocularon nuevamente en 5 mL de caldo LB hasta alcanzar la fase logarítmica temprana ($DO=0.6-0.9$); los sueros fueron recolectados de pacientes voluntarios y se crearon pool en tubos de 1.5 mL. Una vez que las bacterias alcanzaron la fase logarítmica se inocularon 25 μ L de cultivo sobre 75 μ L del pool de suero en placas de poliestireno de 96 pocillos, se mezcló e incubó a 37°C; la viabilidad bacteriana se determinó a las 0,1,2 y 3 h de incubación mediante conteo en placa de agar LB de la dilución 10^{-4} , el resultado se expresó en UFC/mL; se consideraron resistentes aquellas que después de las 3h permaneció el $\geq 75\%$ del inóculo inicial (Liu *et al.*, 2017).

IV.15 Extracción de DNA

Se realizó la extracción de DNA de los aislamientos de estudio, los controles CFNE 2006 (*K. variicola*), 10441 (*K. quasipneumoniae*) y ATCC 13883 (*K. pneumoniae*) con el Kit Wizard Genomic DNA Purification para bacterias Gram-negativas; se determinó la relación 260/280 nm y 260/230 nm para evaluar pureza y concentración de DNA utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes (Halo DNA Master, marca Dynamica).

IV.16 Confirmación de especie.

Se realizó la confirmación de especie mediante PCR-multiplex para la diferenciación de *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* y *K. variicola* con las condiciones descritas por Cercas-Ayala en 2018, utilizando mezclas de reacción de 10µL. Los oligonucleótidos se muestran en la tabla 1, las condiciones de reacción en la tabla 2 y las condiciones de PCR multiplex en la tabla 3.

Tabla 1. Oligonucleótidos para identificación de especies *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* y *K. variicola*.

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

Tabla 2. Condiciones de reacción (10µL), PCR-multiplex para identificación de *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* y *K. variicola*.

Reactivo	Volumen	[Final]
Agua	0.96 uL	----
Buffer	1 uL	1X
MgCl ₂	1 uL	5 mM
dNTPs	1 uL	1 mM
Kpn850-F/R	0.4 uL	0.4 pmol/uL
Kq372-F/R	0.8 uL	0.4 pmol/uL
Kv275-F/R	0.8 uL	0.4 pmol/uL
Taq polimerasa	0.04 uL	0.02 U
DNA templado	2uL	>50 ng

Tabla 3. Condiciones termociclador PCR multiplex para identificación de *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* y *K. variicola*.

Etapa	Condición	Ciclos
Desnaturalización inicial	92°C/ 2 min	1
Desnaturalización	92°C/ 30 s	30x
Alineación	60°C/ 30 s	

Extensión	72°C/ 40 s	
Extensión final	72°C/ 3 min	
Incubación	4°C/ ∞	∞

IV.17 Detección de genes de resistencia, virulencia y serotipos capsulares (K1/K2)

Se realizó el análisis mediante PCR punto final con reacciones de 10uL para la identificación de genes de virulencia *rmpA2*, *iucA*, *irp2*, serotipo capsular K1, K2, genes de resistencia *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* *bla_{CTX-M}*. Los oligonucleótidos se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos específicos para genes de *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: AATCAATGGCTATTCCCGCTG <i>iucA</i> -R: CGCTTCACTTCTTTCAGTACAGG	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

IV. 18 Electroforesis

La integridad del DNA, así como los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% (IBI Scientific, Peosta, Iowa, EE.UU) con buffer TAE 1X. Se utilizó un buffer de carga adicionado con GelRed (1:1500) en una relación 3:10 (Buffer: mezcla de reacción) como colorante de ácidos nucleicos en cada una de las muestras. Se utilizó un marcador molecular HyperLadder™ 50bp (Bioline) y la corrida se realizó a 90V/40 min en una cámara de electroforesis (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU), transcurrido el tiempo el gel fue revelado y analizado utilizando un sistema de fotodocumentación UV (Bio-Rad, Hercules, EE.UU).

IV.19 Tipificación molecular por PFGE

La preparación del DNA cromosómico se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Graves y Swaminathan con algunas modificaciones para bacterias Gram-negativas, los plugs de DNA fueron digeridos con 10U de enzima XbaI/24h (Invitrogen, Life Technologies, Wyman Street, Waltham, MA, EE. UU.); las

condiciones del equipo fueron: 14°C, 6V/cm, 23 horas y pulsos de 1-30 segundos (CHEF-DR® III Variable Angle System, Bio-Rad). Los patrones de macrorrestricción (pulsotipo) se visualizaron utilizando GelGreen.

IV.20 Tipificación molecular por secuenciación de genoma completo (análisis MLST)

La extracción de DNA para secuenciación completa se realizó con el kit DNeasy (Qiagen, Germany), el cual proporciona una purificación reproducible de DNA de alta calidad. La secuenciación se realizó en los servicios de la empresa Macrogen Inc. en Corea, mediante secuenciación Illumina. Los recortes de calidad de los genomas secuenciados se realizaron con el software SolexaQA V.3.1.7.1, el ensamblaje con el software SPAdes v3.10.1 (Petersburg Academic University of the Russian Academy of Sciences). El perfil alélico se obtuvo mediante el análisis bioinformático de los siete genes utilizados en el análisis MLST (tabla 5) mediante el uso de la base de datos MLST de *K. pneumoniae* (MLST.net, Imperial College, London, UK). La determinación de las características genómicas de *K. pneumoniae* se realizó mediante la plataforma Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org>) y la construcción del árbol filogenético con el método Neighbor Joining.

Tabla 5. Genes MLST de *K. pneumoniae*.

Locus	Función del gen
<i>rpoB</i>	Subunidad beta de la ARN polimerasa B
<i>gapA</i>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa
<i>pgi</i>	Fosfoglucosa isomerasa
<i>phoE</i>	Fosfoporina E
<i>infB</i>	Translation initiation factor 2
<i>tonB</i>	Transductor de energía periplásmica

IV.21 Definición del plan de procesamiento y presentación de la información.

Se realizaron gráficas de contingencia y análisis X^2 o prueba exacta de Fisher con un 95% de confianza (valores de $p = <0.05$ se consideró estadísticamente significativo), según corresponda. Se consideraron los factores de virulencia, resistencia, origen y tipo de muestra.

El análisis del patrón de macrorrestricción fue asistido por el software Ntsys-PC 2.0 utilizando el coeficiente de similitud Sørensen-Dice en asociación con el algoritmo UPGMA y el dendograma fue evaluado utilizando el coeficiente de correlación

copenética obtenido mediante la prueba de Mantel ($r>0.98$) (Graves y Swaminathan, 2001, Ochoa *et al.*, 2016).

El programa EBURST 3 se empleó para identificar el complejo clonal y el análisis filogenético determinado con el programa NTYST 2.0.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudiaron 56 aislamientos identificados por el sistema Vitek2 como *K. pneumoniae*, un sistema semiautomatizado que permite la identificación bacteriana y el estudio de la sensibilidad antimicrobiana; su identificación se basa en la medición colorimétrica de paneles de reacciones bioquímicas que llevan a cabo las diferentes especies bacterianas. La tabla 6 sintetiza la descripción del total de los aislamientos, en relación a sus características de origen, resistencia y virulencia.

Desde su descripción *K. pneumoniae* representa la principal especie aislada en medios hospitalarios, sin embargo, en 2004 y posteriormente en 2014 se identificaron otras dos especies relacionadas filogenéticamente, *K. variicola* y *K. quasipneumoniae*, estas tres especies no pueden diferenciarse por análisis bioquímicos y son identificados erróneamente como *K. pneumoniae* en todos los hospitales (Brisse, Passet, y Grimont, 2014). El análisis para confirmación de especie por PCR-multiplex (Fig.1) permite diferenciar molecularmente las tres especies relacionadas, amplificando genes únicos analizados por genética comparativa; en nuestro estudio el 98.2% (n=55) pertenece a la especie predominante de *K. pneumoniae*, mientras que un aislamiento fue identificado como *K. variicola*, aislada de un paciente atendido en consulta externa, este resultado muestra que *K. variicola* también se encuentra presente en la región y que ambas especies son patógenos causantes de infecciones a nivel hospitalario y comunitario ;la descripción del total de los aislamientos en relación a sus características de origen, resistencia y virulencia se presenta en la Tabla 6.

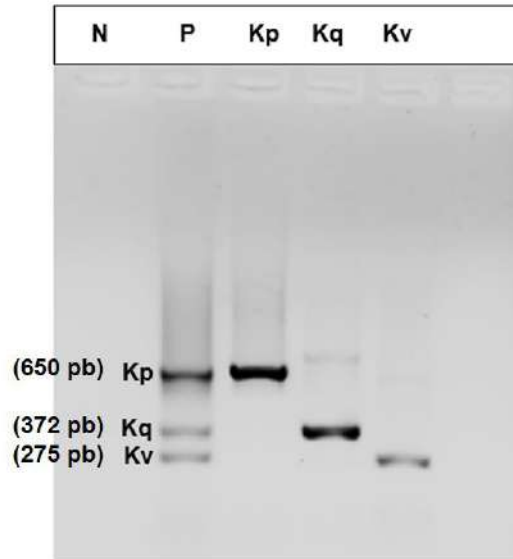


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa, PCR-multiplex para identificación de especie (N=control negativo, P=control positivo, Kp=*K. pneumoniae*, Kq=*K. quasipneumoniae* y Kv=*K. variicola*).

Se ha reportado que *K. variicola* rara vez es aislado de muestras clínicas y representa <5% de las especies identificadas como *K. pneumoniae*, ya que reside normalmente en el tracto gastrointestinal de los pacientes sin producir signos de infección (Yang, Chan, Zhang, y Chen, 2019). Garza-Ramos y colaboradores reportaron en 2018 una prevalencia del 92.4% de *K. pneumoniae*, un 2.5% de *K. variicola* y un 5.1% de *K. quasipneumoniae* en aislamientos de infecciones adquiridas en la comunidad entre el año 2013-2014, de pacientes ambulatorios atendidos en cuatro hospitales rurales en México (Garza-Ramos, *et al.*, 2018), los resultados muestran que, efectivamente, la identificación por pruebas bioquímicas no son una herramienta ideal y aunque en este muestreo no se identificó ninguna cepa de *K. quasipneumoniae*, se demuestra que existen otras especies del genero causando infecciones en el hospital de estudio.

Tabla 6. Características del fenotipo de resistencia y virulencia en aislamientos clínicos de *Klebsiella* spp.

Identificación molecular	No. De aislamientos	Muestra de origen	Resistencia		Producción de BLEE		Resistencia a carbapenémicos		Polimixin NP		Producción de biofilm		Fenotipo de hiper mucoviscosidad	
			MDR	S	+	-	R	S	R	S	Alto/moderado	Débil	+	-
<i>K. pneumoniae</i>	18	Sangre	18	0	18	0	3	15	2	16	15	3	7	11
<i>K. pneumoniae</i>	13	Secreción bronquial	9	4	9	4	3	10	1	12	2	11	3	10
<i>K. pneumoniae</i>	9	Orina	2	7	2	7	0	9	0	9	7	2	2	7
<i>K. pneumoniae</i>	7	Tejidos/piel	6	1	6	1	1	6	1	6	4	3	3	4
<i>K. pneumoniae</i>	8	Otros	5	3	5	3	0	8	0	8	7	1	2	6
<i>K. variicola</i>	1	Orina	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1
Total de aislamientos	56		40	16	40	16	7	49	5	51	35	21	17	39

MDR: multidrogorresistente.

BLEE: β-lactamasa de espectro extendido.

S: sensible.

R: resistente.

+: positivo.

-: negativo.

Otros: exudado faríngeo, exudado vaginal y punta de catéter.

El 87.5% (n=49) de los aislamientos se obtuvieron de pacientes con infecciones nosocomiales adquiridas en los diferentes servicios médicos del hospital, mientras que el 12.5% (n=7) fueron aislados de pacientes atendidos en consulta externa, representando el porcentaje de infecciones comunitarias. El 41% (n=23) corresponde a infecciones adquiridas en medicina interna, seguidos por las adquiridas en las unidades de cuidados intensivos con el 30.4% (n=17). Se puede observar que el 32.1% (n=18) fue aislado de infecciones del torrente sanguíneo, siendo la causa más común, seguido de neumonías (23.2%, n=13) e infecciones urinarias (17.85%, n=10) (Fig. 2).

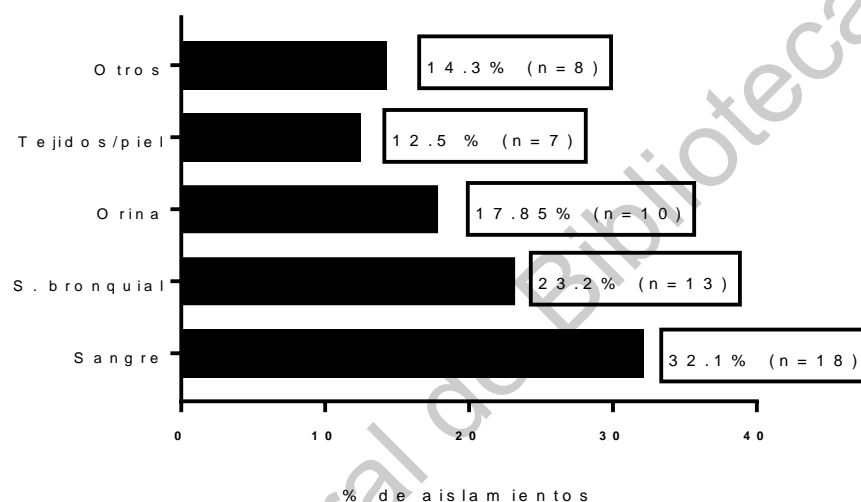


Figura 2. Frecuencia de aislamientos de *K. pneumoniae* por tipo de muestra.

K. pneumoniae es la tercera causa de infecciones intrahospitalarias en México y EUA, teniendo una tendencia ascendente en México desde 2010 y ha sido la segunda bacteria causante de brotes en IAAS; la frecuencia de infecciones respecto al servicio médico y el tipo de muestra asemeja también el comportamiento que se ha reportado en México, en donde las principales infecciones nosocomiales corresponden a bacteremias, neumonías e infecciones urinarias, además de ser medicina interna el principal servicio en donde se presentan (RHOVE, 2015). En EUA también se ha notificado como la tercera causa de todas las IAAS; representa la segunda causa de infecciones del torrente sanguíneo por bacterias Gram negativas, la tercera causa de neumonías intrahospitalarias, la primera causa de infecciones del tracto urinario en pacientes con diabetes mellitus y representa el 13% de las infecciones en heridas de sitio quirúrgico; recordando que *K. pneumoniae* es considerada como un patógeno oportunista, siendo las enfermedades crónicas y degenerativas un factor de riesgo importante, así como

aquellos pacientes con sistema inmune inmunocomprometido(Martin y Bachman, 2018).

En el análisis de susceptibilidad antimicrobiana, el 71.43% (n=40) de los aislamientos fueron productores de BLEE de acuerdo con el análisis por sistema Vitek; recientemente un informe de la CDC reportó que la frecuencia de infecciones nosocomiales por *K. pneumoniae* productora de BLEE es del 23% y representa una mortalidad del 6.5% de acuerdo con el análisis de 183 hospitales en EUA y que ha ido en aumento desde el año 2000(CDC, 2019); según la OMS se han alcanzado tasas endémicas de hasta 50% en Europa oriental, sudoccidental y países mediterráneos, demostrando la generalización a nivel mundial (OMS, 2014).

En nuestro análisis, la totalidad de casos BLEE positivos está representado por aislamientos nosocomiales; la OMS ha mostrado su preocupación por el aumento de casos BLEE en la comunidad, alcanzando tasas del 30% (OMS, 2014); sin embargo, en nuestro estudio los aislamientos analizados provenientes de la comunidad siguen siendo susceptibles a casi todos los grupos de antimicrobianos analizados; de acuerdo con el análisis estadístico, la producción de BLEE depende del tipo de infección nosocomial/comunitaria (Fig.3, $p < 0.0001$). Una revisión publicada en 2020 en la Gaceta médica de México describe el panorama general de la resistencia, indicando un 60% como productor de BLEE en bacterias Gram negativas y un 22% para *K. pneumoniae*, evidenciando la urgencia para controlar el problema de resistencia en nuestro país (Giono *et al.*, 2020).

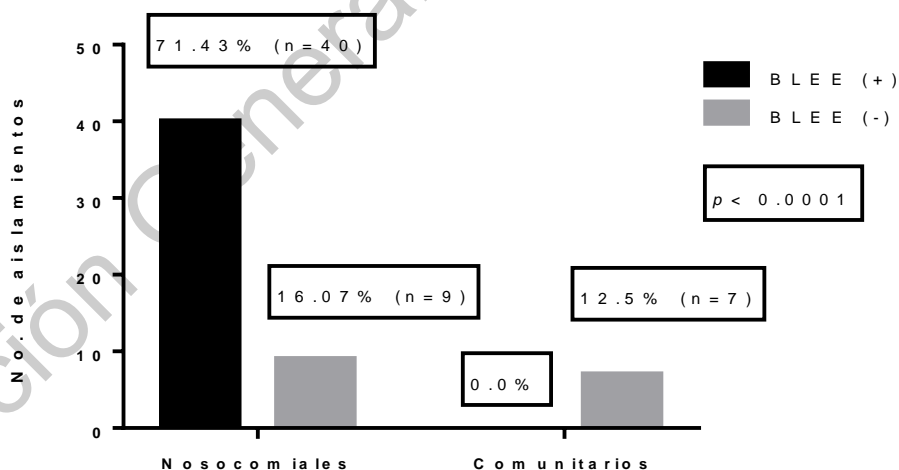


Figura 3. Frecuencia de aislamientos nosocomiales y comunitarios de *K. pneumoniae* productores de BLEE (prueba de X^2 , $p < 0.05$).

En la Fig.4, se puede observar que la frecuencia de producción de BLEE es mayor en infecciones del torrente sanguíneo (32.14%, n=18) en donde todos los aislamientos presentaron el fenotipo; de dicho porcentaje el 55%(n=10/18) de los

pacientes se encontraban en la unidad de cuidados intensivos, razón por la que este tipo de infecciones son la principal causa de muerte y un factor de riesgo debido al tiempo prolongado de hospitalización y la exposición a catéteres o procedimientos invasivos, además del rechazo a tratamientos empíricos debido a la persistencia y exposición a múltiples antimicrobianos.

Por otro lado, las infecciones urinarias son la cuarta infección asociada a la atención médica y son clasificadas como infecciones en la comunidad y las asociadas a la atención de la salud; en los últimos años han mostrado un incremento en la resistencia tras la producción de BLEE, sobre todo en el grupo de las enterobacterias, que son la causa más común de dichas infecciones; se ha reportado un 8.8% en infecciones por *K. pneumoniae* en América del Norte y un 38.9% en Europa (Bader, Loeb, y Brooks, 2017); en nuestro análisis la mayoría de los aislamientos de infecciones urinarias siguen siendo sensibles, pues un 14.28% (n=8) no fue productora de BLEE y es representado en su mayoría por aislamientos de pacientes ambulatorios tras ser atendidos en consulta externa (n= 6/8), mientras que solo el 3.6% (n=2) muestra resistencia por producción de BLEE; un estudio publicado en 2019 muestra claramente un porcentaje mayor en este tipo de infecciones respecto al porcentaje de nuestro análisis, donde el 27% de *K. pneumoniae* uropatógena de un hospital de Jalisco (n=5895) expresó un fenotipo BLEE positivo en donde se analizaron aislamientos de pacientes hospitalizados y ambulatorios (Sierra-Díaz, Hernández-Ríos, y Bravo-Cuellar, 2019), tras el análisis estadístico de nuestros datos podemos inferir que la producción de BLEE depende directamente del tipo y origen de muestra ($p= 0.0013$).

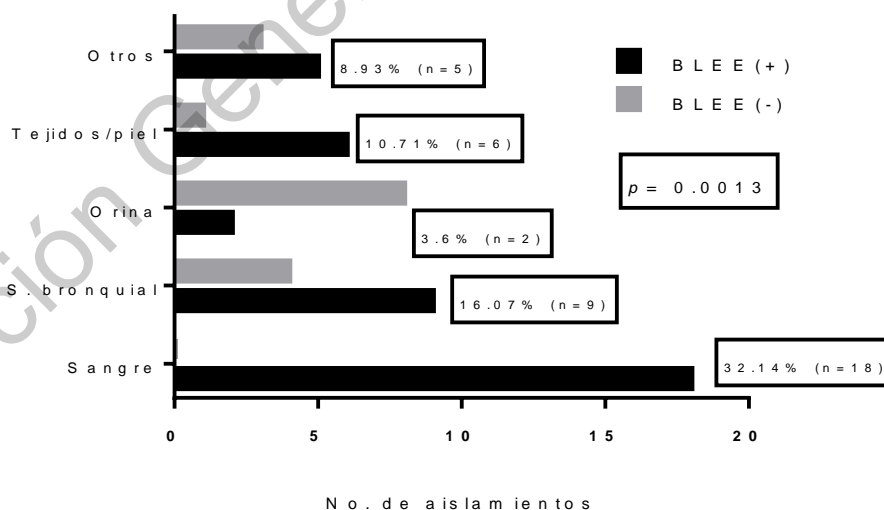


Figura 4. Frecuencia de aislamientos productores de BLEE por tipo de muestra respecto al total de aislamientos (prueba de X^2 , $p < 0.05$).

Aunque las muestras obtenidas en la comunidad no son productoras de BLEE, no podemos inferir en un comportamiento general para este tipo de aislamientos, pues el análisis estadístico puede verse influenciado por el número limitado de muestras y el sesgo de selección, que podría evitarse si se analizara una mayor cantidad de aislamientos a nivel regional.

Para el tratamiento de infecciones productoras de BLEE, los carbapenémicos son los medicamentos de mayor espectro β -lactámico y su uso prolongado aumenta la probabilidad de expresar un fenotipo resistente frente a este tipo de medicamentos, desde su aparición en Carolina del Norte en 1996, la incidencia de resistencia a carbapenémicos ha ido en aumento en los EU, alcanzando un 24.6% entre los pacientes de cuidados intensivos (Lai, Y. C., Lu, M. C., y Hsueh, 2019). En 2013 se declaró como amenaza urgente las infecciones por enterobacterias productoras de carbapenemasa, de las cuales el 80% corresponde a bacterias del género *Klebsiella*(CDC, 2013); en nuestro estudio el 12,5% (n=7) es resistente a carbapenémicos adicional a la producción de BLEE, situación que es alarmante, pues representa siete aislamientos que deben ser tratados con antimicrobianos de última elección; en 2012 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) emitió una alerta debido a la transmisión de bacterias MDR con producción de carbapenemasa del tipo NMD que le confiere resistencia a todos los medicamentos β -lactámicos excepto aztreonam y cuya diseminación no registraba antecedentes de viajes al exterior (OPS, 2012); el programa de vigilancia epidemiológica de los antimicrobianos en América latina que incluyó a 11 países (2011-2014) registró en ese año un 4.3% de aislamientos por enterobacterias productores de carbapenemasa, registrando los niveles más altos en Brasil (9%), Argentina (6.3%) y solo el 0.7% en México(Aquino-Andrade *et al.*, 2018); como se puede observar en nuestros resultados (Tabla 6), el porcentaje de resistencia a carbapenémicos es alto (12.5%, n=7)resaltando que de estos aislamientos positivos dos de ellos deben su resistencia a la producción de carbapenemasas tras la identificación por carbaNP, lo que representa un 28.6%(n=2/7) del total de resistentes a carbapenémicos y un 3.6% (n= 2) del total de aislamientos analizados (n=56) siendo alto en comparación con el registro que se tiene para México; los aislamientos negativos a la prueba de Carba NP sugieren otro mecanismo de resistencia, el cual, puede estar mediado en parte por la regulación ascendente de bombas de eflujo, la alteración de porinas de membrana externa, la hiperproducción de enzimas BLEE o enzimas AmpC codificadas en plásmidos (Navon-Venezia, Kondratyevay Carattoli, 2017).

Para disminuir el índice de resistencia a carbapenémicos, se han reportado tratamientos alternativos combinados de β -lactámicos+inhibidores de β -lactamasa, como es el caso de piperacilina-tazobactam (PTZ) los cuales hasta el momento ha mostrado una mayor eficacia contra infecciones-BLEE invasivas o de riesgo moderado; sin embargo, el tratamiento para pacientes críticos sigue siendo el uso de carbapenems (Karaiskos y Giamarellou, 2020; Pana y Zaoutis, 2018), estopodría

ser utilizado en pacientes de medicina interna o algún otro servicio; desafortunadamente en nuestro estudio el 25% (n=14) de los aislamientos BLEE, provenían de pacientes de la unidad de cuidados intensivos y además tres de ellos fueron productores de carbapenemasa, por lo que dicho tratamiento podría ser poco funcional.

La colistina es entonces el medicamento utilizado para el tratamiento de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa y debe su resistencia principalmente al grupo de genes *mcr* y mutaciones en los genes de un sistema regulador de dos componentes (*pmrAB* y *phoPQ*), a pesar de la rápida propagación a nivel mundial, aún no se conoce el impacto clínico que representa (Rocha *et al.*, 2019). El 8.9% (n=5) de los aislamientos analizados muestra una resistencia presuntiva a colistina de acuerdo con la prueba Polimixin NP y el análisis estadístico indica que no existe una relación significativa entre el tipo de muestra y esta resistencia ($p \Rightarrow 0.05$); es de suma importancia mencionar que con esta prueba, el 1.78% (n=1) representaría un aislamiento resistente a los tres grupos (cefalosporinas, carbapenémicos y polimixinas), aunque la prueba es presuntiva y ha mostrado una sensibilidad del 99.3% y una especificidad del 95.4%, la técnica de referencia estándar para determinar la susceptibilidad a polimixinas es la microdilución en caldo (Nordmann, Jayol, y Poirel, 2016), por lo que el porcentaje mostrado debe corroborarse.

La producción de biofilm con un índice alto/moderado se identificó en el 78.6% (n=44) del total de los aislamientos de estudio, el 26.79% (n=15) representado por infecciones del torrente sanguíneo, seguido por el 19.64% (n=11) para infecciones pulmonares y el 12.5% (n=7) de infecciones por *K. pneumoniae* uropatógena, lo que concuerda con otros autores que infieren que éste fenotipo es asociado en su mayoría a infecciones invasivas y del tracto urinario, siendo clínicamente significativos los aislamientos en catéteres y otros dispositivos médicos, (Zheng *et al.*, 2018) y que aquellos de infecciones invasivas muestran una alta resistencia antimicrobiana y además una alta tasa de mortalidad (Piperaki *et al.*, 2017).

Aunque en nuestros resultados el 58.92% (n=33) de los aislamientos son productores de biofilm y además MDR, no se identifica una relación estadísticamente significativa con la resistencia ($p = 0.2929$) y tampoco con el origen de la muestra ($p = 0.517$, Fig.5 y Fig.6); estos datos son similares a los reportados por Garza-Ramos en México en donde tampoco se encontró una correlación de este fenotipo de virulencia y su resistencia en 39 aislamientos comunitarios (Garza-Ramos *et al.*, 2018); de la misma forma Holt y colaboradores determinaron que no existe correlación entre el resistoma y el viruloma en aislamientos de *K. pneumoniae* tras un análisis comparativo de genomas de infecciones comunitarias y nosocomiales (Holt *et al.*, 2015).

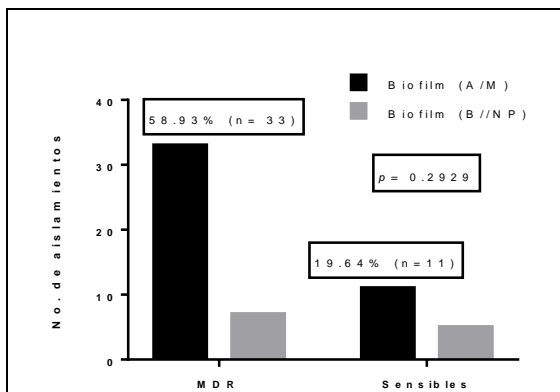


Figura 5. Frecuencia de aislamientos de *K. pneumoniae* productores de biofilm alto/moderado por resistencia (A/M= Alto/Moderado, B/NP= Bajo/No productor).

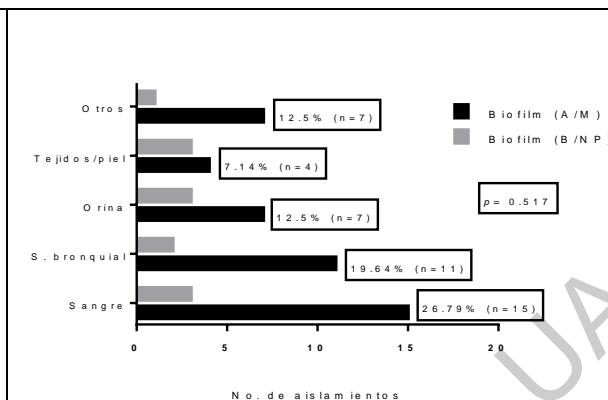


Figura 6. Frecuencia de aislamientos de *K. pneumoniae* productores de biofilm alto/moderado por tipo de muestra (A/M= Alto/Moderado, B/NP= Bajo/No productor).

Cusumano y colaboradores en 2019 reportaron que los aislamientos resistentes a carbapenémicos se caracterizan por producir débilmente biofilm; comparado con nuestros resultados la gran mayoría de los aislamientos resistentes son moderadamente productores; este autor menciona que la DO con la que se cuantifica este factor de virulencia es una medida indirecta para la producción de biofilm y que se requieren métodos estandarizados que permitan clasificarlos de acuerdo con sus índices de producción, pues en su estudio eliminaron todos los aislamientos con índices moderados para encontrar una diferencia significativa (Cusumano *et al.*, 2019).

La hipermucoviscosidad es un parámetro *in vitro* para la identificación de aislamientos hipervirulentos, caracterizados inicialmente por ser poco resistentes y presentar una gran cantidad de factores de virulencia; en nuestro análisis el 30.5% (n=17) presenta un fenotipo hipermucoviscoso, considerando todos los aislamientos positivos independientemente del tipo de muestra (Fig.7); algunos autores utilizan los parámetros de hipermucoviscosidad e hipervirulencia como sinónimos e indican que los aislamientos mucoviscosos son más propensos a causar infecciones hospitalarias graves, en la gráfica de la Fig. 7 se observa claramente que la mayoría de los aislamientos muestran este fenotipo (60.5%, n=39) y si además consideramos que el mayor porcentaje de los aislamientos se obtuvo de pacientes con infecciones nosocomiales, dicha inferencia pareciera ser correcta respecto a nuestro análisis, también mencionan que aquellos con hipermucoviscosidad positiva son causantes de infecciones invasivas, sobre todo a nivel comunitario (Zhang *et al.*, 2016), pero en nuestro estudio la prueba estadística indica que no existe relación significativa entre la hipermucoviscosidad y el tipo de muestra ($p=0.7212$); además,

los aislamientos comunitarios fueron altamente susceptibles, mucoviscosos y aislados de infecciones urinarias y no invasivas.

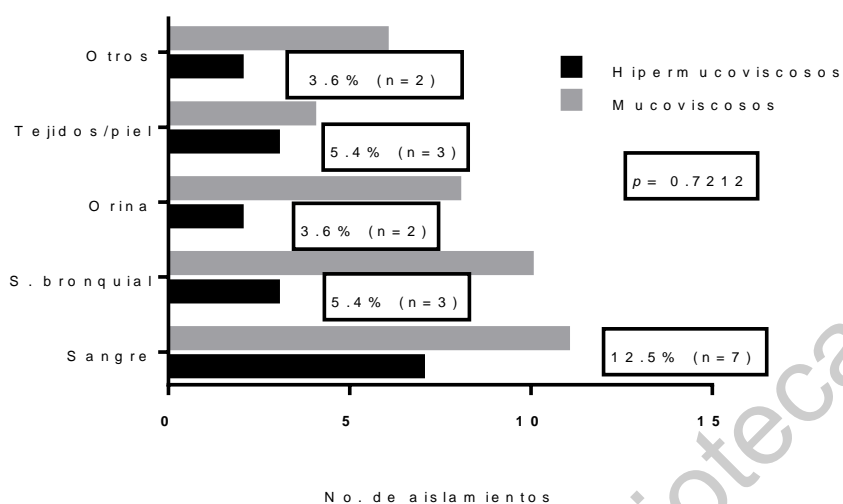


Figura 7. Frecuencia de aislamientos de *K. pneumoniae* hipermucoviscosos por tipo de muestra.

Actualmente ya se han reportado cepas altamente resistentes e hipervirulentas causantes de infecciones nosocomiales (Russo y Marr, 2019), en nuestro estudio el análisis de los genes de virulencia (*rmpA* e *iucA*) fue negativo para el 46.43% (n=26) de los aislamientos indicando infecciones no hipervirulentas y de las cuales el 80.8% (n=21/26) son MDR, por lo que en este periodo de estudio no observamos cepas hipervirulentas/MDR; pues la aparición de aislamientos con estas características indicaría el surgimiento de un problema a nivel salud, especialmente entre pacientes inmunocomprometidos que reciben además terapias combinadas, por lo que el monitoreo de este tipo de aislamientos siguen siendo un objetivo para identificar y evitar su diseminación.

Desafortunadamente el inicio de la pandemia por SARS-COV-2 no permitió culminar cada uno de los objetivos de nuestro estudio, además de las limitaciones que surgieron como el bajo número de aislamientos, la inclusión de aislamientos de un mismo centro hospitalario, en donde quizás, el análisis filogenético podría mostrar infecciones por una misma clona y por ello comportamientos similares; el sesgo en el número y desproporción de aislamientos nosocomiales y comunitarios afectan directamente los patrones de susceptibilidad e índices de biofilm e hipermucoviscosidad por lo que la secuenciación nos brindaría información sobre el resistoma y viruloma que no siempre son expresados e identificados por técnicas fenotípicas y que además están sujetos a la presión selectiva en este tipo de ambiente hospitalario; así mismo, el análisis completo de los genes de virulencia, el

serotipo capsular y la confirmación de resistencia a colistina nos brindarían herramientas para una correcta clasificación de nuestros aislamientos.

Es importante mencionar que las discusiones de este trabajo son inferencias respecto a lo analizado, posiblemente un estudio completo podría indicarnos un panorama específico, por lo que las limitaciones son ahora un área de oportunidad para las siguientes investigaciones en nuestra región, ya que como lo he mencionado, actualmente en México existe poca información al respecto y no actualizada.

VII. CONCLUSIONES

Los aislamientos que más predominaron en el entorno hospitalario son aquellas aisladas de los servicios de medicina interna y terapia intensiva, siendo estos los pacientes con mayor compromiso inmunológico y aquellos con mayor probabilidad de adquirir este tipo de infecciones. Los aislamientos de mayor frecuencia fueron aislados de sangre, secreción bronquial y orina, lo que podría representar las principales infecciones provocadas por *K. pneumoniae* en este tipo de pacientes. Nuestros datos muestran que efectivamente la resistencia por producción de BLEE es el mecanismo más común, mientras que la resistencia a carbapenémicos y colistina es un problema que surge en estos centros hospitalarios, actualmente en México no se tiene reportado la tasa de resistencia a los tratamientos de última elección, por lo que representa una oportunidad de estudio. Los aislamientos comunitarios hasta el momento indican infecciones por *K. pneumoniae* susceptible y que podrían clasificarse de baja virulencia; sin embargo, la producción de biofilm alta/moderada podría afectar a estos pacientes por la persistencia, llevándolos a tener infecciones recurrentes de vías urinarias pudiendo ser el paso a infecciones de tipo invasivo.

VIII. REFERENCIAS

- Ah, Y.M., Kim, A.J., Lee, J.Y. (2014) Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.*; 44(1):8-15.
- Al-Hasan, MN., Lahr, BD., Eckel-Passow JE., Baddour, LM. (2010) Epidemiology and Outcome of *Klebsiella* Species Bloodstream Infection: A Population-Based Study, *Mayo Clin. Proc.*, 85(2):139-144.
- Ali Abdel Rahim, K.A. and Ali Mohamed, A.M. (2014) Prevalence of Extended Spectrum β -lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Clinical Isolates. *Jundishapur J. Microbiology*, 7(11), e17114.
- Aquino-Andrade, A., Merida-Vieyra, J., Arias de la Garza, E., Arzate-Barbosa, P., y De Colsa Ranero, A. (2018). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Mexico: report of seven non-clonal cases in a pediatric hospital. *BMC Microbiology*, 18(1), 1–8.

- Bailon H, Sacsquispe R. (2013) Caracterización molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE causantes de infección intrahospitalaria en el servicio de neonatología de un hospital de Lima, Perú, *Rev. Med. Hered.*; 24:101-108.
- Bader, M. S., Loeb, M., y Brooks, A. A. (2017). An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. *Postgraduate Medicine*, 129(2), 242–258. <https://doi.org/10.1080/00325481.2017.1246055>
- Besser J. (2015) Pulsed-field gel electrophoresis for disease monitoring and control. *Methods Mol Biol.*; 1301:3-7.
- Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. (2015) Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin*; 31(4):707-21.
- Blin C, Passet V, Touchon M, Rocha EPC, Brisse S. (2017) Metabolic diversity of the emerging pathogenic lineages of *Klebsiella pneumoniae*. *Environ Microbiol.*;19(5):1881-1898.
- Brisse S, Passet V, Grimont PA. (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 that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 64(Pt 9):3146–3152. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.062737-0>
- Campos, A.C., Albiero, J., Ecker, A.B., Kuroda, C.M., Meirelles, L.E., Polato, A., Tognim, M.C., Wingeter, M.A., Teixeira, J.J. (2016) Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: A systematic review. *Am J Infect Control.*;44 (11):1374-1380.
- Cárdenas, P.M.E., Cruz, L.O.R., Gándara, R.J.L., Pérez, H.M.A. (2014) Factores de virulencia bacteriana, la inteligencia de las bacterias; *Elementos*; 94: 35-43
- Cardozo-Bernal, Á., Poutou-Piñales, R., Carrascal-Camacho, A., Ramón-Rodríguez, L., y Zambrano, D. (2013) Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Universitas Scientiarum*, 18(2): 203.
- Catalán-Nájera JC, Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H. (2017) Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? *Virulence*; 8(7):1111-1123.
- Catalán-Nájera JC, Barrios-Camacho H, Duran-Bedolla J, Sagal-Prado A, Hernández-Castro R, García-Méndez J, Morfín-Otero Morfín-Otero R, Velázquez-Larios MDR, Ortíz-Navarrete V, Gutierrez-Xicotencatl L, Alpuche-Aranda C, Silva-Sánchez J, Garza-Ramos U. (2019) Molecular characterization and pathogenicity determination of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates serotype K2 in Mexico. *Diagn Microbiol Infect Dis.*;94(3):316-319.
- Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. (2014) Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol.*, 22(12):686-96.
- Chen L, Mathema B, Pitout JD, DeLeo FR, Kreiswirth BN. (2015) Epidemic *Klebsiella pneumoniae* ST258 is a hybrid strain., *mBio* 5(3): e01355.
- CDC. 2013. Signos vitales: enterobacterias resistentes a carbapenem. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 62: 165–170.

- CDC. (2019). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. *Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention*, 1–118.
- Cheng, Y. H., Lin, T. L., Pan, Y. J., Wang, Y. P., Lin, Y. T., and Wang, J. T. (2015) Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(5): 2909–2913.
- Clegg, S., Murphy, CN. (2016) Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectr.*; 4(1):1-17.
- Costerton, J. W. (2001) Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol.*; 9(2): 50–52
- Cusumano, J. A., Caffrey, A. R., Daffinee, K. E., Luther, M. K., Lopes, V., y LaPlante, K. L. (2019). Weak biofilm formation among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 95(4), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114877>
- De Rosa FG, Corcione S, Cavallo R, Di Perri G, Bassetti M. (2015) Critical issues for *Klebsiella pneumoniae* KPC-carbapenemase producing *K. pneumoniae* infections: a critical agenda. *Future Microbiol.*,10(2):283-94.
- Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. (2005) Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.*; 43(8):4178-82.
- El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. (2017) Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem*; 5(131):185-195.
- Follador R, Heinz E, Wyres KL, Ellington MJ, Kowarik M, Holt KE, Thomson NR. (2016) The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microb Genom.*, 2(8): e000073.
- García, C., Pardos, M., and Castillo, G.F. (2010) Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clínic.*, 28(1):12-18.
- Garza-Ramos, U., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Sánchez-Pérez, A., Tamayo-Legorreta, E., y Ibarra-Pacheco, A. *et al.* (2014). Characteristics of KPC-2–producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) clinical isolates from outbreaks in 2 Mexican medical centers. *Diagnostic Microbiology And Infectious Disease*, 79(4), 483-485.
- Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., Moreno-Domínguez, S., Toribio-Jiménez, J., Jardón-Pineda, D., Cuevas-Peña, J., Sánchez-Pérez, A., Duran-Bedolla, J., Olguín-Rodríguez, J., y Román-Román, A. (2018). Phenotypic and molecular characterization of *Klebsiella* spp. isolates causing community-acquired infections. *New Microbes and New Infections*, 23(1), 17–27.
- Giono, C.S., Santos, P. J.I., Morfin, O.M.P., Torres, L.F., Alcántar, C.M.D. (2020) Antimicrobial resistance. Its importance and efforts to control it; *Gaceta médica de México*, 156:172-180.
- Goering RV. (2010) Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol.*; 10 (7): 866-875
- Gonzalez-Vertiz A., Alcantar-Curiel D., Cuauhtli M., Daza C., Gayosso C., Solache G., Horta C., Mejia F., Santos JI. and Alpuche-Aranda C. (2001) Multiresistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* causing an

- outbreak of nosocomial bloodstream infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.*, 22: 723-5.
- Graves, L.M., Swaminathan, B., (2001) PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 65(1-2): 55–62.
- Hao Z, Duan J, Liu L, Shen X, Yu J, Guo Y, Wang L, Yu F. (2019) Prevalence of Community-Acquired, Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Wenzhou, China. *Microb Drug Resist.* 2019.0096.
- Han H, Zhou H, Li H, Gao Y, Lu Z, Hu K, Xu B. (2013) Optimization of pulse-field gel electrophoresis for subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health*, 1;10(7):2720-31.
- Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC. (2007) Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc.*; 2(3):677-684.
- Holden VI, Breen P, Houle S, Dozois CM, Bachman MA. (2016) *Klebsiella pneumoniae* Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 α Stabilization during Pneumonia, *mBio*; 7(5): e01397-16.
- Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., y Dance, D. (2015). Genomic analysis of diversity , population structure , virulence , and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* , an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112, E3574–E3581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501049112>
- Hsu CR, Lin TL, Chen YC, Chou HC, Wang JT. (2011) The role of *Klebsiella pneumoniae rmpA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. *Microbiology.*, 157(Pt 12): 3446-57.
- Huang, Y.H., Chou, S.H., Liang, S.W., Ni, C.E., Lin, Y.T., Huang, Y.W., Yang, T.C. (2018) Emergence of an XDR and carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain in Taiwan. *J Antimicrob Chemother.*; 73 (8): 2039-2046.
- Karaiskos, I., y Giamarellou, H. (2020). Carbapenem-sparing strategies for ESBL producers: When and how. *Antibiotics*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020061>
- Kong, K. F., Schneper, L., y Mathee, K. (2010) Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*, 118(1):1-36.
- Lai, Y. C., Lu, M. C., y 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 CH, Chang CC, Liu JW, Chen RF, Yang KD (2014) Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* and associated with resistance to neutrophil phagocytosis, *Virulence*, 5(6): 673–679.
- 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. *Front Cell Infect Microbiol.*, 7: 483.
- Lee, C., Lee, J., Park, K., Kim, Y., Jeong, B., y Lee, S. (2016) Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol.*, 7:895.

- Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. (2014) Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.*; 9(9):1071-81.
- Li, J., Huang, Z. Y., Yu, T., Tao, X. Y., Hu, Y. M., Wang, H. C., y Zou, M. X. (2019). Isolation and characterization of a sequence type 25 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from the mid-south region of China. *BMC microbiology*, 19(1), 219.
- Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, *et al*. Emergence of plasmidmediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016;16:161–8.
- Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, McCarthy ND. (2013) MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol.*; 11(10):728-36.
- Maiden MC. (2006) Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol.*; 60:561-588.
- Marra, A.R., Wey, S. B., Castelo, A., Gales, A.C., Cal, R. G., Filho, J. R., Edmond, M. B. and Pereira, C. A. (2006) Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. *BMC infectious diseases*, 6(24):1-8.
- Martin, R. M., y Bachman, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(JAN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
- Merino S, Camprubi S, Alberti S, Benedi VJ, Tomas JM. (1992) Mechanisms of resistance of *Klebsiella pneumoniae* to sacrifice mediated by complement. *Infect Immun* 60(6): 2529–2535.
- Miller MB, Bassler BL. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*; 55:165-199
- Munoz-Price, L.S., Poirel, L., Bonomo, R.A., Schwaber, M.J., Daikos, G.L., Cormican, M., *et al*. (2013) Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect. Dis.*,13(9): 785–796.
- Murphy CN, Clegg S. (2012) *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol.* 7(8): 991-1002.
- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., and Mirelis, B. (2011) Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín.*, 29(7): 524-534.
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., y Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 252–275. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
- Nordmann P, Cuzon G, Naas T. (2009) The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria, *Lancet InfectDis* 9(4): 228-236.
- Nordmann, P., Dortet, L., and Poirel, L. (2012) Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!, *Trends Mol. Med.* 18(5): 263–272.
- Nordmann P, Poirel L. (2014) The difficult-to control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide, *Clin Microbiol Infect* 20(9): 821–830.

- Nordmann, P., Jayol, A., y Poirel, L. (2016). Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 22(6), 1038–1043. <https://doi.org/10.3201/eid2206.151840>
- Ochoa, S. A., Cruz-Córdova, A., Luna-Pineda, V. M., Reyes-Grajeda, J. P., Cázares-Domínguez, V., Escalona, G., et al. (2016) Multidrug- and extensively drug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* Clinical strains: Phylogenetic groups widely associated with integrons maintain high genetic diversity. *Front Microbiol.*, 7(2042):1-12.
- OPS. (2012). Alerta epidemiológica: Transmisión de bacterias multirresistentes tipo NDM en servicios de atención de salud. *Organización Panamericana de La Salud*, 1, 0–2.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.*; 54: 49-79.
- Paczosa, M.K., Meccas, J. (2016) *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 80(3):629-61.
- Pana, Z. D., y Zaoutis, T. (2018). Treatment of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBLs) infections : what have we learned until now ? [version 1 ; referees : 2 approved] Referee Status : *F1000Research*, 7(0), 1–9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14822.1>
- Paterson, D. L., Bonomo, R. A. (2005) Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18(4): 657-86.
- Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. (2013) Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther.*;11(3):297-308.
- Pitout, J. D., Nordmann, P., y Poirel, L. (2015) Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother.*, 59(10), 5873-84.
- Piperaki, E. T., Syrogiannopoulos, G. A., Tzouveleki, L. S., y Daikos, G. L. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(10), 1002–1005. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001675>
- RHOVE. (2015). Informe Anual de las IAAS, México. *Dirección General de Epidemiología, Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica*, 1–63.
- Rocha, V., Oliveira, M., Cristina, M., Gustavo, W., Diagnóstico, L. De, Clínica, M., ... Lindu, C. C. D. (2019). Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean : A systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 31(February), 101459. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.07.015>
- Rodríguez-Zulueta, P., Silva-Sánchez, J., Barrios, H., Reyes-Mar, J., Vélez-Pérez, F., Arroyo-Escalante, S., Ochoa-Carrera, L., Delgado-Sapien, G., Morales-Espinoza, M., Tamayo-Legorreta, E., Hernández-Castro, R., Garza-Ramos, U. (2013) First outbreak of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) clinical isolates in a Mexican Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57(8): 4086-4088.
- Ruíz, MC. (2017) Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) 2015; Secretaría de Salud, México.
- Russo, T. A., y Marr, C. M. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(3), 1–42.

- Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijl Jm, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW; ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). (2013) Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* ;18(4):20380.
- Sánchez-López J, García-Caballero A, Navarro-San Francisco C, Quereda C, Ruiz-Garbajosa P, Navas E, Dronda F, Morosini MI, Cantón R, Diez-Aguilar M. (2019) Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: A challenge in community acquired infection. *IDCases.* 3;17: e00547.
- Schwartz DC, Cantor CR. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* ;37(1):67-75.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M., and Kamal, M. A. (2014) Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J. Biol. Sci.*, 22(1): 90-101.
- Shankar-Sinha S, Valencia GA, Janes BK, Rosenberg JK, Whitfield C, Bender RA, Standiford TJ, Younger JG. (2004) The *Klebsiella pneumoniae* O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia. *Infect Immun.*; 72(3):1423-30.
- Shon, A. S., Bajwa, R. P., y Russo, T. A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*, 4(2), 107-18.
- Sierra-Díaz, E., Hernández-Ríos, C. J., y Bravo-Cuellar, A. (2019). Antibiotic resistance: Microbiological profile of urinary tract infections in Mexico. *Cirugia y Cirujanos (English Edition)*, 87(2), 176–182. <https://doi.org/10.24875/CIRU.18000494>
- Struve C, Roe CC, Stegger M, Stahlhut SG, Hansen DS, Engelthaler DM, Andersen PS, Driebe EM, Keim P, Krogfelt KA. (2015) Mapping the Evolution of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *mBio.* ;6(4): e00630.
- Suarez y Gudiol. (2009.) Beta-lactam Antibiotics. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín.*, 27(2):116-129.
- Vuotto C, Longo F, Pascolini C, Donelli G, Balice MP, Libori MF, Tiracchia V, Salvia A, Varaldo PE. (2017) Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J Appl Microbiol.*; 123(4):1003-1018.
- Wang ZC, Huang CJ, Huang YJ, Wu CC, Peng HL. (2013) *FimK* regulation on the expression of type 1 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43S3. *Microbiol.*, 159(Pt 7):1402–1415
- Yang, X., Chan, E. W., Zhang, R., y Chen, S. (2019). A conjugative plasmid that augments virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Microbiology*, 4(12), 2039–2043. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0566-7>
- Yu WL, Lee MF, Chang MC, Chuang YC (2015) Intrapersonal mutation of *rmpA* and *rmpA2*: A reason for negative hypermucoviscosity phenotype and low virulence of *rmpA*-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Glob. Antimicrobiano Resistir.*; 3(2): 137-141.
- Yu WL., Ko WC., Cheng KC., Lee HC., Ke DS., Lee CC., Fung CP., Chuang YC. (2006) Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical síndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin. Infect. Dis.*; 42(10): 1351-1358.
- Zhang, Y., Zhao, C., Wang, Q., Wang, X., Chen, H., Li, H., ... Wang, H. (2016). *High Prevalence of Hypervirulent Klebsiella pneumoniae Infection in China : Geographic Distribution , Clinical Characteristics , and.* 60(10), 6115–6120. <https://doi.org/10.1128/AAC.01127-16>.Address.

Zheng, J. X., Lin, Z. W., Chen, C., Chen, Z., Lin, F. J., Wu, Y., ... Deng, Q. wen. (2018). Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of *wcaG*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(FEB). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00021>

Dirección General de Bibliotecas UAQ