



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
Facultad de Químico-Farmacobiología



HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA
"EVA SAMANO DE LOPEZ MATEOS"

TESIS

FRECUENCIA Y RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE *Klebsiella variicola* EN EL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA

Presenta

Blanca Vianney Ramírez Anguiano

Para obtener el grado de

Licenciada en Químico Farmacobiología

Directora de tesis: D.S.P. Laura Karina Avilés Benítez

Morelia, Michoacán. Julio de
2022.

DEDICATORIA

A mi Familia

A mis padres Samuel Ramírez y Blanca Anguiano no me alcanzan las palabras para agradecerles todo el apoyo incondicional, comprensión y amor que he recibido de su parte, por creer siempre en mí.

A mis hermanos Karen, Christian y Sebastián por la confianza que siempre depositaron en mí, espero que el ver los frutos de sus esfuerzos los motive a siempre seguir superando lo que el camino les presente.

A mis abuelos Gloria Díaz y Miguel Anguiano gracias por sus sabios consejos, por enseñarme a valorar todos esos momentos pasajeros de la vida.

En memoria de mis abuelos Ángel Ramírez y Luz María Regalado
Espero esta dedicatoria les llegue hasta el cielo,
Con mucho amor para ustedes.

Agradecimientos

A mi asesora la D.S.P. Laura Karina Avilés Benítez gracias por su paciencia y el tiempo que le otorgó a esta investigación, por sus enseñanzas en estos años, por sus palabras de motivación cada que me eran necesarias.

A la D.C. Elvira Garza-García gracias por darme la oportunidad de presentarme en su laboratorio para así realizar los procedimientos faltantes para esta tesis, así como su paciencia durante mi estancia.

A las QFB del hospital infantil Cecilia, Argelia, Karina, Erendira, Lupita y Elena gracias por compartir todos sus conocimientos en microbiología.

A Luis Chimal te agradezco tanto por la motivación que me das, por estar siempre, por todo tu apoyo y tus consejos.

A mis mejores amigos de vida Kenya Tena y Kevin Herrejon gracias por su amistad incondicional, su lealtad, tengo claro lo difícil que es encontrar amigos tan valiosos como ustedes.

A mis amigos de la facultad Salvador, Amairani, Cecilia, Monserrath, Eduardo, Enrique, Alfonso, Carlos, Katia, Alicia, Marcos, Rodrigo y Alberto gracias por hacer la carrera más amena, y por todos los momentos compartidos.

FRECUENCIA Y RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE *Klebsiella variicola* EN EL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA

RESUMEN

Objetivos

Determinar la incidencia *Klebsiella variicola* en pacientes hospitalizados en el año 2019 por sexo, edad y servicio en el Hospital Infantil de Morelia e Identificar resistencia y susceptibilidad antimicrobiana de las cepas estudiadas.

Material y métodos

Se recolectaron muestras de urocultivos, hemocultivos, aspirados/lavados bronquiales y líquidos estériles, de niños hospitalizados, de estas muestras se trabajaron por medio de Phoenix las cepas obtenidas de *Klebsiella* y sus distintas subespecies.

La técnica usada para comprobar sensibilidad y resistencia de los antimicrobianos fue el método de Kirby-Bauer.

Para corroborar su identificación se colaboró con la D.C. Elvira Garza-García perteneciente a la facultad de medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, para someter las muestras a espectrometría de masas usando el MALDI-TOF.

Resultados

En el laboratorio del hospital la incidencia de *Klebsiella spp* es de 3%, predominando *K. pneumoniae* en un 69%, así como *K. variicola* se identificó en un 13% con predominio en el grupo de lactantes.

1 de cada 5 *Klebsiella spp* son resistentes a los grupos de antibióticos: BLEES, quinolonas, sulfonamidas, aminoglucósidos y carbapenemes

Los tipos de muestra de donde se obtuvo la mayoría de cepas resistentes son urocultivos para *K. pneumoniae* y hemocultivos para *K. variicola*.

Conclusiones

El Hospital Infantil de Morelia presenta un 13 % de *K. variicola* resistente a algún antibiótico, predomina en lactantes y neonatos, la mayor parte identificada en muestras de hemocultivos.

Palabras clave

K. variicola Resistencia microbiana Niños

FREQUENCY AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Klebsiella variicola* IN THE CHILDREN'S HOSPITAL OF MORELIA

ABSTRACT

Objective

Determine the incidence of *Klebsiella* subspecies in hospitalized patients in 2019 by sex, age and service at the Children's Hospital of Morelia and Identify antimicrobial resistance and susceptibility of the strains studied.

Material and methods

Samples of urine cultures, blood cultures, bronchial aspirates/flushes and sterile fluids were collected from hospitalized children, from these samples the *Klebsiella* strains obtained and their different subspecies were processed by means of Phoenix.

The technique used to test antimicrobial sensitivity and resistance was the Kirby-Bauer method.

In order to corroborate their identification, we collaborated with D.C. Elvira Garza-García from the medical school of the Universidad Autónoma de Nuevo León, to submit the samples to mass spectrometry using MALDI-TOF.

Results

In the hospital laboratory, the incidence of *Klebsiella spp.* was 3%, with *K. pneumoniae* predominating in 69%, and *K. variicola* was identified in 13%, with a predominance in the infant group.

1 in 5 *Klebsiella spp.* are resistant to antibiotic groups: BLEES, quinolones, sulfonamides, aminoglycosides and carbapenems.

The sample types from which most resistant strains were obtained are urine cultures for *K. pneumoniae* and blood cultures for *K. variicola*.

Conclusions

The Children's Hospital of Morelia has 13% of *K. variicola* resistant to any antibiotic, predominantly in infants and neonates, most of them identified in blood culture samples.

Key words

K. variicola Microbial resistance Children

INDICE

CAPÍTULO 1	11
1 MARCO TEORICO.....	11
1.2 Características microscópicas.....	12
1.3 Características metabólicas, antigénicas y genéticas	13
1.4.1 Familia Enterobacteriaceae	14
1.4.2 <i>Klebsiella</i>	15
1.5 Resistencia a los antibióticos.....	17
1.5.1 Antibióticos β -lactámicos.....	19
1.6 β -lactamasas	21
1.7 Carbapenemasas.....	22
1.8 Antibióticos que interfieren con la síntesis proteica mediante la subunidad ribosómica 30S.	27
1.8.1 Aminoglucósidos.....	27
1.8.2 Tetraciclinas	27
1.9 Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas por la subunidad ribosómica 50S...27	
1.9.1 Macrólidos	27
1.9.2 Cloranfenicol	27
1.10 Antibióticos que interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos.....	27
1.10.1 Quinolonas	27
1.10.2 Rifampicina.....	28
1.11 Antibióticos que inhiben la ruta metabólica de la síntesis del ácido fólico.....	28
1.11.2 Sulfonamidas	28
CAPÍTULO 2	29
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA A INVESTIGAR.....	29
3 JUSTIFICACIÓN.....	29
4 HIPÓTESIS DEL TRABAJO	30

CAPÍTULO 3	31
5 OBJETIVOS	31
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	31
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	31
CAPÍTULO 4	31
6 MATERIAL Y METODOS.....	31
7 UNIVERSO DE ESTUDIO	31
7.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	31
7.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	31
7.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	32
7.4 DEFINICIÓN DE VARIABLES Y UNIDADES DE MEDIDA	32
7.5.....	32
7.7 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA	33
CAPÍTULO 5	37
8 RESULTADOS.....	37
CAPÍTULO 6	51
9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
CAPÍTULO 7	54
10 DISCUSION.....	54
11 CONCLUSIONES.....	55
12 SUGERENCIAS.....	55
CAPÍTULO 8	56
13 REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	56

CAPÍTULO 1

1 MARCO TEORICO

1.1 Clasificación de las bacterias

A lo largo del tiempo se ha extendido la diversidad de organismos patógenos por lo cual fue necesario un método para su identificación para eso se requiere su clasificación y nomenclatura. La clasificación se basa en colocar a estos organismos dentro de grupos taxonómicos; es necesario conocer sus propiedades morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, e incluso genéticas. La nomenclatura se basa en otorgarles un nombre asignado a cada uno de ellos según las reglas internacionales ya establecidas. Así para su identificación es necesario seguir un esquema 1) aislar y distinguir a los organismos perjudiciales 2) verificar sus propiedades en un cultivo 3) identificar al organismo causal de la enfermedad (1).

Categoría formal	Ejemplo
Reino	Procariotas
División	Gracilicutes
Clase	Escotobacteria
Orden	Eubacterias
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>coli</i>
Subtipo	<i>Escherichia coli</i> O157:H7

Imagen 1.1 Ejemplo de la clasificación taxonómica, el sistema de Linneo es el más utilizado para la clasificación de las bacterias (1).

Las bacterias son células pequeñas que oscilan entre 2-10 μm , existen dos clases de éstas que son las procariotas (archeas, algas azul-verdosas) y las eucariotas (animales, plantas y hongos) las primeras se consideran las más antiguas teniendo como característica principal que solo se encuentran de manera unicelular y no cuentan con un núcleo definido, mientras que a las segundas se pueden encontrar de manera unicelular o pluricelular y tienen un núcleo definido (2).

El cromosoma bacteriano es una molécula única circular con dos cadenas de ácido desoxirribonucleico (DNA) que contienen aproximadamente 5.000 pares de kilobases (kb) con una longitud aproximada de 1,3 mm (3).

Para ayudar a su caracterización es necesario conocer sus características macroscópicas y microscópicas, sus características metabólicas, antigénicas y su genotipo (2).

1.2 Características microscópicas

Sus características microscópicas dependen de la forma en la que se presenten (cocos, bacilos, espirales y curvos), las bacterias esféricas en forma de racimos se les conoce como *Staphylococcus*, agrupadas en hilera se le conoce como *Streptococcus*, en forma de bastón se le conocen como bacilos, una forma serpenteante se le conoce como espiral (3).

Existe una técnica para la diferenciación de dos clases de bacterias llamada tinción Gram, está se basa en darle una coloración dependiendo de los componentes de la pared celular de éstas:

Las bacterias Gram positivas se tiñen de morado ya que el colorante queda atrapado en una pared gruesa de peptidoglucano. El peptidoglucano (mureína) es una malla rígida formada por cadenas lineales de polisacáridos que se unen a través de péptidos. Estas bacterias poseen una pared celular gruesa que consta de varias capas (150 a 500 A) de peptidoglucano que rodea a la membrana citoplasmática, esta estructura es lo bastante porosa para permitir el paso de los metabolitos a la membrana citoplasmática. Estas bacterias también están formadas por otros componentes como proteína, ácidos teicoicos, ácidos lipoteicoicos y polisacárido (3).

Las bacterias Gram negativas se tiñen de rojo ya que no retienen el colorante principal por su delgada pared de peptidoglucano por lo que quedan teñidas con el colorante secundario (3).

Este grupo de bacterias es más complejo que las Gram positivas ya que contienen dos capas en el exterior de la membrana citoplasmática, por fuera de esta se encuentra una delgada capa de peptidoglucano, en la capa externa de esta se encuentra la membrana externa (exclusiva de las Gram negativas). El espacio que existe entre la membrana citoplasmática y la membrana externa es conocido como espacio periplásmico donde se encuentran enzimas hidrolíticas (proteasas, lipasas, fosfatasas, nucleasas y enzimas metabolizadoras de carbohidratos) que contribuyen a la degradación y metabolización por macromoléculas de gran tamaño (3).

Estructura	Constituyentes químicos	Funciones
Membrana plasmática	Fosfolípidos, proteínas y enzimas	Contención, generación de energía, potencial de membrana y transporte
Pared celular		
<i>Bacteria grampositivas</i>		
Peptidoglucano	Cadenas de glucanos de GlcNAc y MurNAc entrecruzados por un puente peptídico	Forma y estructura celular; protección frente al ambiente y destrucción por el complemento
Ácido teicoico	Polirribitol fosfato o glicerol fosfato unido al peptidoglucano	Refuerza la pared celular; secuestro del ion calcio; activador de protecciones innatas del hospedador
Ácido lipoteicoico	Ácido teicoico unido a lípido	
<i>Bacterias gramnegativas</i>		
Peptidoglucano	Versión más delgada de la que se encuentra en las bacterias grampositivas	Forma y estructura celulares
Espacio periplásmico		Enzimas implicadas en el transporte, la degradación y la síntesis
Membrana externa		
Proteínas	Canal de porina	Estructura celular; protección frente al ambiente del hospedador
	Dispositivos secretores (tipos I, II, III, IV)	Penetración de pequeñas moléculas hidrófilas; restringe algunos antibióticos
LPS	Lipoproteína	Penetra y libera proteínas a través de las membranas, incluidos factores de virulencia
	Lípido A, polisacárido de la región central, antígeno O	Unión de la membrana externa al peptidoglucano
Fosfolípidos	Con ácidos grasos saturados	Estructura de la membrana externa; potente activador de respuestas innatas del hospedador
Otras estructuras		
Cápsula	Polisacáridos (disacáridos y trisacáridos) y polipéptidos	Antifagocítica
Biopelícula	Polisacáridos	Protección de la colonia frente al ambiente, antimicrobianos y respuesta del hospedador
Pili	Pilina, adhesinas	Adherencia, pili sexuales
Flagelo	Proteínas motoras, flagelina	Movimiento, quimiotaxia
Proteínas	Proteína M de estreptococos (por ejemplo)	Varias

Imagen 2.1 Componentes de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas (3)

1.3 Características metabólicas, antigénicas y genéticas

Las características metabólicas se basan en la necesidad de las bacterias de un ambiente aerobio y anaerobio (Presencia o ausencia de oxígeno), los nutrientes específicos que requieren para crecer (Capacidad de fermentar hidratos de carbono) así como la producción de productos característicos de algunas de ellas como ácidos y alcoholes (3).

Las características genéticas hace referencia a las características que comparten todos o ninguno de los miembros del grupo, estas no se pueden usar para diferenciar a uno de otro pero si para definir las propiedades del grupo, para esto son utilizados sus genes ya que se ha demostrado que estos son usados para codificar enzimas que se transportan por medio de plásmidos o bacteriófagos (elementos genéticos extracromosomales) a otras bacterias de su misma familia (1).

Las cepas de bacterias se pueden diferenciar mediante anticuerpos que detectan antígenos característicos (serotipado), éstas cepas son empleadas para identificar organismos difíciles o peligrosos, así como también para subdividir a las bacterias por debajo del nivel de la especie con fines epidemiológicos (3).

1.4 Bacterias Gram negativas

1.4.1 Familia Enterobacteriaceae

Los bacilos Gram negativos que forman parte de esta familia son ubicuos se encuentran en cualquier parte de la naturaleza, así como en el ser humano y animales principalmente en el tubo digestivo (4).

En 1972 Edwards y Ewing describieron 11 géneros y 26 especies de bacterias que correspondían a esta familia, sin embargo, en 1985 Fanmer y cols describieron 22 géneros y 69 especies de bacterias (4).

Los miembros que pertenecen a esta familia tienen un tamaño que va desde 0.3 a 1,0 x 1.0 a 6.0 μm , sus requerimientos son sencillos, fermentan la glucosa, reducen nitratos, son oxidasa negativa (excepto el género *Plesiomonas*) y catalasa positiva (5), forman ácido y algunos de ellos producen gas durante la fermentación de D-glucosa (6). Pueden crecer en ambientes anaerobios o aerobios (anaerobios facultativos), para su aislamiento se usan medios de cultivos no selectivos como el agar sangre o selectivos como el MacConkey, este último es utilizado para diferenciar a los géneros que son capaces de fermentar la lactosa (las colonias se tornan de un color rosado) como son *Klebsiella*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Enterobacter*, de los que no (sus colonias son incoloras) como son *Proteus*, *Shigella*, *Salmonella* y algunas especies de *Yersinia* (3)

La clasificación serológica de la familia está basada en 3 grupos de antígenos: polisacáridos O somático (presentes en cada género y especie), antígenos K y proteínas H (proteínas flagelares termolábiles).

Esta familia utiliza mecanismos variados como factor de virulencia:

- La formación de endotoxinas: Es un factor de virulencia que causa graves manifestaciones sistémicas.
- Cápsula: Protege a la bacteria de la fagocitosis mediante antígenos capsulares hidrofílicos.
- Variación de fase antigénica: Causa la expresión o no de los antígenos lo que protege a las bacterias de la destrucción ocasionada por anticuerpos.
- Sistemas de secreción de tipo III: Son secreciones de alrededor 20 proteínas que facilita la transferencia de factores de virulencia.
- Resistencia a los antibióticos: Desarrollan mecanismos codificados por plásmidos que se transfieren a otras bacterias de incluso diferente género (3).

1.4.2 *Klebsiella*.

Las especies que conforman este género son bacilos Gram negativos de tamaño intermedio (0,3 a 1,0 X 1,0 a 6 ,0) μm), que poseen una capsula prominente que rodea las colonias aisladas lo que les otorga un aspecto mucoso, y ocasiona una virulencia elevada in vivo. Por lo general son causantes de neumonías que llevan a la destrucción necrótica de los espacios alveolares, la producción de esputos hemoptoicos y la formación de cavidades. Las especies con mayor importancia clínica son *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* (7,3).

Para su cultivo se pueden inocular en medios de agar sangre no selectivos, sin embargo, si se sospecha de alguna contaminación por otro microorganismo se usan medios selectivos como son el agar eosina-azul de metileno (EMB) y agar MacConkey (7).

K. pneumoniae es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, tiene una forma circular convexa que crece a una temperatura aproximada de 11-41°C (7).

En el año de 1875 Edwin Klebs describió por primera vez a *K. pneumoniae* mientras analizaba las vías respiratorias de sus pacientes que fallecieron a causa de neumonía, pero hasta el año de 1882 Carl Friedlander describió formalmente la especie y desde entonces es reconocida como la causante de una gran tasa de morbilidad y mortalidad en humanos (8).

La taxonomía de este género ha demostrado la existencia de filogrupos de *K. pneumoniae* subespecie *pneumoniae* (Kp1). Brise y Verhoef informaron la existencia de filogrupos Kp1 a Kp4, sin embargo, unos años después Blin y col demostraron la existencia de otros dos Kp5 y Kp6 sin nombre aún, juntos forman el complejo *K. pneumoniae*: *K. quasipneumoniae* (Kp2) con 2 subespecies *quasiopneumoniae* (Kp2-A) y *similipneumoniae* (Kp2-B) *K. variicola* (Kp3) y *K. michiganensis* (7,9).

Las características bioquímicas que comparten el complejo de *K. pneumoniae* son inmóviles, ornitina descarboxilasa e indol negativos, lisina descarboxilasa positiva, ureasa positiva. A diferencia de los otros miembros del complejo *K. variicola* metaboliza el ácido tricarbálico, ácido L-galactónico- γ -lactona, L-sorbose, 4-hidroxil-L-prolina y D-arabitol (10).

Todos los miembros de este complejo comparten características bioquímicas y fenotípicas lo que ocasiona su identificación errónea, siendo *K. variicola* el miembro que más se confunde con *K. pneumoniae* principalmente en infecciones del tracto

urinario (34). Análisis realizados demuestran que al secuenciar el genoma completo de las especies de *Klebsiella* hay un amplio intercambio de contenido de genes centrales y replicones de plásmidos entre ellas (8).

K. variicola se considera un patógeno emergente en humanos, inicialmente era encontrado colonizando las plantas, considerando el término "Fitonosis" ya que se ha identificado como patógeno en humanos y animales, se ha logrado su aislamiento de diversas fuentes ambientales, así como en muestras clínicas de secreciones de heridas, aspirados traqueales, tracto respiratorio y urinario (10,11).

Se ha descrito que cepas aisladas de brotes hospitalarios de *K. variicola* presentan los mismos genes de virulencia que *K. pneumoniae* lo que le otorga la resistencia a los antibióticos. Sin embargo, también se han encontrado casos donde *K. variicola* y *K. pneumoniae* infectaron al mismo paciente encontrándose diferente sensibilidad a los antibióticos, al someterse a un estudio filogenético y molecular por medio de la electroforesis en gel de campus pulsados se demostró diferentes perfiles de los plásmidos encontrados para ambas cepas (10).

En un estudio realizado en el Instituto de Salud Pública de Cuernavaca se compararon los genomas de virulencia de plantas reportados de *K. variicola*, *K. quasipneumoniae* y *K. pneumoniae* por medio de análisis como *In Silico* y PCR encontrándose que los genes involucrados en la colonización de plantas correspondían principalmente a *K. variicola* ya que esta produce hormonas vegetales así como Betalactamasas cromosómicas (9).

Los aparatos convencionales para la identificación microbiológica como el Phoenix, el Vitek 2x1 y el MicroScan no pueden diferenciar a los miembros del complejo de *K. pneumoniae* ya que estos se basan en las características bioquímicas generales, y esas las comparten todos los miembros, por lo que serán erróneamente identificadas como *K. pneumoniae*. Actualmente se pueden identificar solo en función de la secuenciación de genes (12), por lo tanto se propone realizar la WSG o secuenciación de marcadores genéticos específicos (blaLEN, blaOKP, blaSHV, rpoB, gyrA, parC), PCR múltiple para identificar su betalactamasa cromosómica, o por espectrometría de masas (MALDI-TOF) es un método rápido y rentable para su identificación aunque es importante mencionar que no todos cuentan con los marcadores específicos que buscan la proteína ribosómica L31 perteneciente a *K. variicola* (10), cuenta con una sensibilidad y especificidad del 80-100 % a 97-100% respectivamente. Se basa en visualizar los picos bacterianos en el rango carga/masa (m/z) que corresponden a las proteínas ribosomales (S20, S22 y L31, respectivo a 4777, 9553, 5278 y 7768 m/z). El pico específico de 5578 m/z para Kp1-Kp6 identificado como proteína ribosómica S22

se observó en Kp2. Kp3 y Kp5 a 7768 m/z asumido como proteína ribosómica L31 (12).

Generalmente se considera que las cepas de *K. variicola* eran menos virulentas en comparación con *K. pneumoniae* pero estudios han revelado que *K. variicola* con frecuencia ocasiona infecciones graves potencialmente mortales (13). Se han identificado cepas de *K. variicola* que llevan los mismos genes de resistencia a los antibióticos que *K. pneumoniae* Carbapenemasa (KPC) y metalo-beta lactamasa 1 (NDM-1) (8).

Long y col en 2017 demostraron que *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* y *K. variicola* compartían genes cromosómicos que codifican factores de virulencia, se han identificado como productores de BLEE tipo SHV y CTX-M y productores de carbapenemasas tipo NDM-1 (10).

1.5 Resistencia a los antibióticos

Las bacterias encuentran en el cuerpo humano las características necesarias para su crecimiento y propagación, por lo cual estas han desarrollado mecanismos que les permite acceder a los nutrientes y evitar la respuesta del sistema inmunitario, sin embargo, estos mecanismos causan un daño en el hospedador, por lo que se recurre al uso de antibióticos para tratar las infecciones (3).

Llamamos antibióticos a las sustancias antimicrobianas que se producen por medio de bacterias y hongos con el fin de inhibir el crecimiento o erradicar los microorganismos, es importante mencionar que este término también abarca a los antibióticos de origen sintético. Cumplen dos importantes funciones; Bactericida (Erradica por completo al microorganismo) y Bacteriostático (Solamente inhibe su crecimiento y el sistema inmune del hospedador es el responsable de eliminar al microorganismo) (14).

La **resistencia natural o intrínseca** se da cuando el antibiótico no puede acceder a la bacteria porque no tiene el mecanismo para ello. Por el contrario, la **resistencia adquirida o extrínseca** se da cuando la bacteria evoluciona esto quiere decir que era sensible inicialmente al antibiótico, pero por alguna posible mutación en un gen el antibiótico deja de ocasionar algún efecto en ella. (15)

La resistencia intrínseca nos demuestra que la resistencia bacteriana no está propiamente asociada al uso de los antibióticos, ya que diferentes genes (aproximadamente 3%) que codifican enzimas metabólicas y proteínas que regulan procesos fisiológicos pertenecen a la resistencia natural (16).

Comparando la resistencia entre tipo de bacterias se tiene como dato que las bacterias Gram-negativas son intrínsecamente más resistentes que las bacterias Gram-positivas esto se debe a la membrana externa de los Gram negativos (compuesta por lipopolisacáridos y fosfolípidos) que sirve como protección para el ataque del antibiótico (17).

Se dice que las cepas son susceptibles cuando las dosis normales del antibiótico son efectivas para tratar la infección, las cepas moderadamente resistentes son las que si se incrementa la dosis se puede obtener una respuesta eficaz, y las cepas resistentes se dan cuando el tratamiento no tiene ninguna respuesta sobre la infección (15).

Para identificar su susceptibilidad se realizan diversas técnicas en el laboratorio, las más usuales son: 1) Prueba de difusión en disco que se basa en realizar un cultivo con la cepa problema e impregnar discos con el antibiótico a utilizar para así colocarlos dentro de la placa, pasadas las 24 horas se mide el halo de inhibición creado alrededor del disco, existen valores que ya están estandarizados para valorar la resistencia de cada bacteria. 2) Pruebas de dilución en caldo, aquí la bacteria se encuentra diluida en caldo, y su CMI se basa en la mínima concentración del fármaco que impide el crecimiento bacteriano a las 18-24 horas. 3) Las pruebas automatizadas, están por igual basadas en las pruebas de difusión en discos (14).

Las bacterias tienen diversos mecanismos de resistencia los más usuales son las mutaciones en un gen, con la transferencia de material genético por medio de plásmidos de una bacteria a otra es como las mutaciones de genes se han extendido tanto alrededor del mundo favoreciendo la resistencia a los antibióticos (15).

La resistencia bacteriana se adquiere principalmente de forma rápida por medio de la transferencia horizontal de genes con la ayuda de diferentes elementos genéticos móviles, como son los plásmidos y los transposones:

Los **transposones** son elementos de inserción móviles que se desplazan entre el cromosoma y el plásmido donde el gen de resistencia puede ir incluido al salir del hospedador y penetrar a un receptor.

Los **integrones** no son móviles, pero codifican una integrasa y ofrecen el sitio para los genes de resistencia, estos integrones pueden estar dentro de un plásmido o un transposon por lo tanto así se mueven dentro del cromosoma de otra célula.

Transducción es el proceso por medio del cual los fagos introducen su DNA a bacterias, esto provoca un problema cuando ese DNA contiene genes de resistencia ya que infecta a la bacteria.

Transformación cuando el DNA de una bacteria queda libre en el ambiente otra funciona como receptor captándolo e incorporándolo a su genoma.

Conjugación aquí se transfieren los genes por contacto directo entre bacterias por medio de algún pili o puente sexual (14).

En la actualidad la incidencia de cepas resistentes intrahospitalarias es un grave problema para la salud, ya que en un principio se creía que el problema tenía como solución la producción de medicamentos nuevos, pero en el transcurso de los años se ha observado una disminución progresiva en la fabricación de estos, por lo que se plantea como solución la disminución del uso de antibióticos. (15)

Para la selección de los antibióticos se debe conocer el agente causal de la infección, y no solo dar por hecho que se trata de una infección si presenta *fiebre* ya que esta puede ser causada por otros factores, si es de vital importancia medicar al paciente antes de conocer al microorganismo responsable debe considerarse el cuadro clínico de la enfermedad para conocer a los posibles agentes causales y así dar el tratamiento de menor espectro posible (14).

1.5.1 Antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Dentro de su estructura química se clasifican en 4 grupos: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemes, estos grupos de antibióticos están formados por la unión de su anillo β -lactámico con un anillo secundario (18).

El grupo de las penicilinas se encuentra principalmente constituido por la penicilina G y V, estas son usadas para atacar bacterias Gram positivas (15).

El grupo de las cefalosporinas se dividen en cinco generaciones, la primera es usada para combatir a bacterias Gram positivas, la segunda generación es usada para Gram negativas y algunos anaerobios, la tercera generación es para Gram positivas y bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, la cuarta generación incluye todos los fármacos de la tercera con un mayor espectro para combatir las β -lactamasas, y la quinta generación es usada para tratar Gram positivas (14).

Los monobactámicos donde se encuentra como principal fármaco el aztreonam es usado para combatir a bacterias Gram negativas con presencia de algún mecanismo de resistencia (14).

El grupo de los carbapenemes está formado principalmente por meropenem, imipenem, doripenem y ertapenem, este grupo constituye el de mayor amplio espectro de todos los β -lactámicos (14).

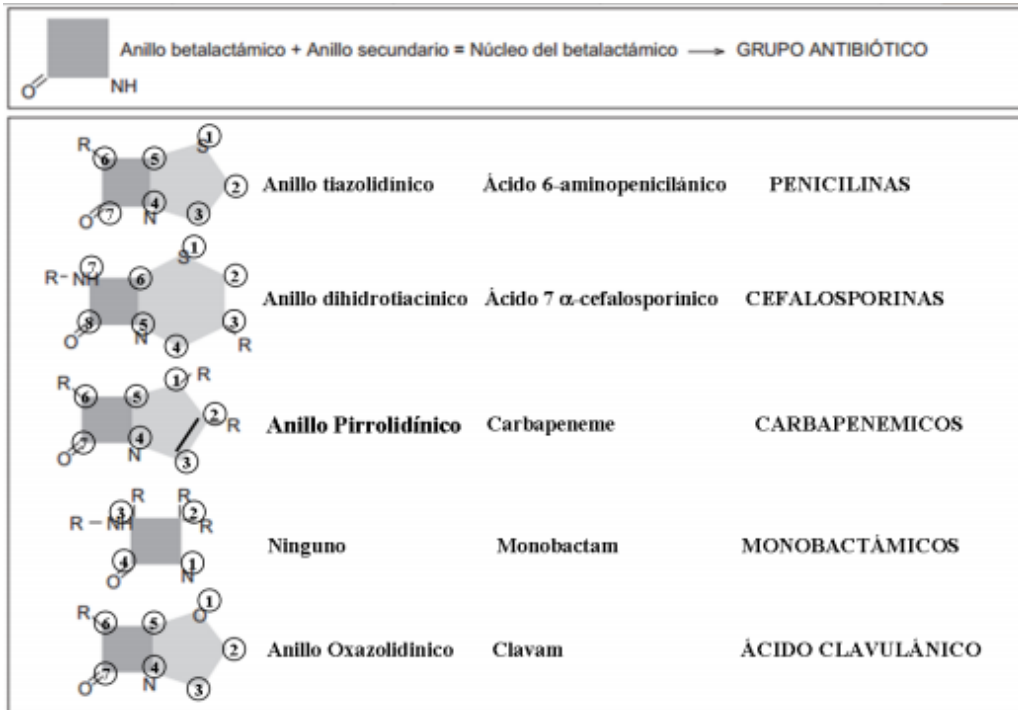


Imagen 3.1 Estructura química de los grupos de antibióticos β -lactámicos (18).

Estos antibióticos ejercen su acción en la última etapa de la formación del peptidoglucano, se cuentan con 3 etapas:

- Citoplasmática: está basada en la síntesis de la molécula precursora UDP-NAcMur
- Transmembrana: en esta etapa de transferencia se forma el lípido I o undecaprenil-pirofosforil-UDP-NAcMur-penta, y con la ayuda de MurG se transfiere una molécula de NAcGlc para formar el lípido II.
- Extracelular: es la etapa final de la formación del peptidoglucano donde adquiere su funcionalidad, así como la protección osmótica intracelular que tiene cada bacteria, en este proceso se llevan a cabo reacciones de elongación y entrecruzamiento, esta última involucra reacciones de transpeptidación que es donde atacan los antibióticos β -lactámicos gracias a unas enzimas llamadas PBP (Proteínas de unión a las penicilinas) (18).

Todas las bacterias con pared celular poseen PBP que tienen distinta afinidad por los antibióticos β -lactámicos, estas ya mencionadas se utilizan como el punto de

unión con dichos fármacos. Los antibióticos β -lactámicos inhiben muchas PBP de una sola bacteria, por lo tanto, su afinidad a estos antibióticos debe disminuir para crear un mecanismo de resistencia (14).

Los β -lactámicos deben alcanzar los puntos de fijación en la pared celular bacteriana para ejercer sus efectos, esto se facilita en las bacterias Gram positivas por la composición de su pared celular y a través de porinas en las Gram negativas (15).

1.6 β -lactamasas

Entre los mecanismos que presentan las bacterias para ser resistentes a los antibióticos tenemos las β -lactamasas, las β -lactamasas AmpC, las bombas de expulsión (MexAB-OprM) y la pérdida de las porinas (OprD) estas son catalogadas como la principal vía de entrada de los carbapenémicos (19).

Las β -lactamasas se consideran como el principal determinante de resistencia para los antibióticos β -lactámicos, son enzimas que pueden inactivar a las penicilinas y las cefalosporinas, este proceso se lleva cuando estas enzimas rompen el anillo penicilánico y cefalosporánico creando ácidos similares a los del antibiótico pero que no tienen algún efecto sobre la bacteria, evitándose así la lisis de la pared celular bacteriana (20). Estas enzimas están presente desde hace millones de años solo que se encontraban de forma natural y sin causar un daño tan drástico como el del momento (21).

Continuando así con la aparición de otras enzimas inactivadoras de β -lactámicos, por medio de las mutaciones que codificaban estos genes tipo TEM-1, TEM-2 y SHV-1, con esto se tiene la aparición de las actuales β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en 1983 Khoté y otros descubrieron una mutación de la SHV-1 denominándola SHV-2 (esta ya era capaz de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación), pero en el año 1989 Philip y otros fueron las que las denominaron como BLEE, al año siguiente descubrieron una mutación en el TEM-2 a la que denominarían TEM-3, hasta el momento se han descrito más de 160 tipos de TEM y 100 de SHV. (20).

Antes del uso inapropiado de los antibióticos ya se encontraban bacterias con actividad penicilinasas que naturalmente destruían la penicilina y sobrevivían a ambientes que la contenían, se descubrió que esto se debe a los plásmidos que se definen como moléculas de ADN capaces de auto transmitir material genético a otras bacterias con el fin de llevar a cabo una mutación de estas (22).

En diversos estudios se ha descrito que la *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* son los principales microorganismos que presentan mayor incidencia de resistencia

a las β -lactamasas, pero sin embargo esta resistencia la podemos encontrar en todas las enterobacteriales incluyendo las no fermentadoras como es el caso de la *Pseudomona aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (20).

En los años de 1980-1981 **Ambler, Jaurin y Grundstrom** clasificaron estas enzimas según su peso molecular, grado de homología y su espectro (23):

- Clase A: Enzimas serina con preferencia a las penicilinas
- Clase B: Metaloenzimas con preferencia a las cefalosporinas.
- Clase C: Bacterias Gram Negativas productoras de cefalosporinas cromosómicas.
- Clase D: Enzimas serinas capaces de hidrolizar la oxacilina.

Sin embargo, en 1989 Bush propuso otra clasificación para las β -lactamasas basadas en las características físicas, bioquímicas y espectros de inhibición (23):

- Grupo I: Enzimas serina con preferencia a las cefalosporinas, inhibidas por Aztreonam, pero sin efecto del ácido clavulánico, clase molecular C, con codificación cromosómica.
- Grupo II: Representa la categoría más grande (Contiene 8 subgrupos) enzimas serina con efecto inhibitorio del ácido clavulánico, clase molecular A, con codificación por medio de plásmidos.
- Grupo III: Metaloenzimas sin efecto del ácido clavulánico, con codificación cromosómica pero también plasmidíca.
- Grupo IV: Enzimas penicilinasas sin efecto del ácido clavulánico.

1.7 Carbapenemasas

Las carbapenemasas son enzimas capaces de inactivar a todos los antibióticos β -lactámicos, incluyendo los carbapenems, actualmente se ha presentado un notable aumento de enterobacteriales resistentes a carbapenem (CRE), según la clasificación de Ambler se catalogan en 3 categorías (24):

- Clase A: Principalmente enzimas del tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), estas enzimas se codifican por medio de plásmidos, dando ahí su importancia clínica, por la facilidad que tienen para transmitirla.
- Clase B: También llamadas Metalobetalactamasas (MBLs), estas enzimas requieren iones de zinc para realizar su actividad hidrolítica, entre ellas las

enzimas VIM (Verona Integron-encoded metallo-beta-lactamase), IMP (Imipenemasa) y NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase).

- Clase D: OXA también llamadas Oxacilinasas, son uno de los grupos que se presentan con más frecuencia, la familia OXA-48 abarca a la familia de enterobacterias (principalmente *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*), la mayoría de los genes de OXA están asociados con *Acinetobacter baumannii* (24).

En estudios realizados para la búsqueda de CRE se han encontrado cepas de *K. pneumoniae* KPCs. Estas cepas han causado numerosos brotes y se han vuelto endémicas de diversos países a nivel mundial, reportándose una mortalidad del 50 %, se cree que la combinación de antibióticos ha sido exitosa para combatirlos, usando como antibióticos de primera elección para las CRE las polimixinas (colistina), tigeciclina y aminoglicosidos (Especialmente la gentamicina) (25).

Las polimixinas son antibióticos utilizados como último recurso para tratar infecciones causadas por bacterias que son resistentes a múltiples antibióticos, esto es por los efectos colaterales que causa en el organismo, sin embargo, se ha presentado un aumento en la resistencia de las bacterias para las que se usan este grupo de antibióticos cómo será la *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (26).

Según los datos de 248 estudios sobre la resistencia a los carbapenems de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* en 11 naciones, la resistencia fue medida por medio de metanálisis de los datos obtenidos con ≥ 100 aislamientos representativos; *Klebsiella* fue alta ($> 5\%$) en cuatro naciones (Indonesia, Filipinas, Tailandia y Vietnam), moderado (1–5%) en dos naciones (Malasia y Singapur) y bajo ($<1\%$) en dos naciones (Camboya y Brunei). Para *E. coli*, la resistencia fue generalmente menor, pero fue alta en dos de siete naciones con ≥ 100 aislamientos (Indonesia), siendo las principales enzimas de resistencias las Metalobetalactamasas NDM y las OXA beta-lactamasas y presentando resistencia a la polimixina (27).

La resistencia fenotípica a los carbapenémicos es causada por 2 mecanismos, el primero es causado por la actividad de las enzimas beta-lactamasas combinados con mutaciones, y el segundo mecanismo por la producción de carbapenemasas enzimas que ayudan hidrolizando a los antibióticos carbapenems, dentro del primer mecanismo se incluyen las BLEES que generalmente se codifican por plásmidos y cefalosporinas ampC , éstas son capaces de conferir resistencia a los carbapenémicos cuando se combinan con la mutación de las porinas (28).

La multiresistencia (MDR) se describe como la falta de sensibilidad a por lo menos un antibiótico de 3 familias de fármacos, de está MDR se tienen 2 tipos (29):

XDR: Falta de sensibilidad a al menos un antibiótico de todas las familias con excepción de 1 (29).

Panresistencia o PDR: Falta de sensibilidad completamente a todas las familias de antibióticos que se utilizan para confrontar ese microorganismo (5).

Las bacterias MDR tienen una alta capacidad de diseminación no solo en el medio intrahospitalario si no también extra hospitalario, estas afectan tanto a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* SAMR) como Gram negativas, teniendo un impacto especial sobre las enterobacteriales (*E. coli*, *K. pneumoniae*). Los pacientes portadores de estas bacterias multiresistentes son la principal fuente de propagación, por eso la importancia epidemiológica de tener un control de las infecciones causadas por este tipo de bacterias (29), estas infecciones están asociadas con una mayor mortalidad en comparación a los causados por otro tipo de bacterias (5).

Las infecciones nosocomiales son las que se adquieren en un entorno intrahospitalario, contribuyen en gran parte a la resistencia bacteriana por la mutación del material genético en las bacterias y por esa razón es importante recalcar que estas infecciones tienen una tasa de mortalidad mucho mayor que las infecciones adquiridas en la comunidad (30).

En los últimos años la diseminación de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), betalactamasas plasmídica del tipo AmpC y carbapemenasas, se han convertido en una de las más importantes amenazas para los antibióticos que tratan infecciones sobre todo por *E. coli*. Y *K. pneumoniae* sobre todo del tipo CTX-M15 y SHV-12 y ha tenido un alcance de alrededor el 15 % en su prevalencia (29).

Durante el periodo de enero 2009 a diciembre 2012 se llevó a cabo en Colombia un estudio de la vigilancia fenotípica y molecular en las bacterias Gram negativas resistentes dadas por infecciones nosocomiales, donde el aislamiento de carbapemenasas en *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* ha incrementado durante los últimos 10 años, siendo las más frecuentes las carbapemenasas del grupo A (KPC), del grupo B (VIM, IMP) y del grupo D (OXA). De estos fueron aislados 38.048 microorganismos en esos últimos 4 años; 24.203 (63%) fueron pertenecientes a bacilos Gram negativos de los cuales fueron aislados; 5.637 de *E. coli*, 5.302 *K. pneumoniae*, 3.647 de *P. aeruginosa* y 1.525 de *A. baumannii* (31).

En Medellín, Colombia se realizó un estudio de los años 2007-2012 con el fin de observar cómo eran sus cifras para la resistencia a los antibióticos, según este artículo: Los datos de resistencia a carbapenémicos de otras especies de enterobacteriales diferentes de *K. pneumoniae*, como *S. marcescens* y *E. cloacae*, encontrados en este estudio, sugieren que en nuestra región podría estarse presentando la transmisión y la diseminación entre diferentes especies bacterianas de elementos genéticos móviles que portan los genes de resistencia, fenómeno que ha sido reportado en diversos géneros y especies de la familia *Enterobacteriaceae* (32).

En el 2017 en Irak se realizó el estudio genotípico y fenotípico de otro importante microorganismo causante de infecciones nosocomiales como es *K. pneumoniae*, donde se obtuvieron 93 cepas de pacientes intrahospitalarios en el periodo Julio 2016- Diciembre 2017, los resultados mostraron que por el método de difusión en disco 7.5 % fueron cepas productoras de MBLs, mientras que por el método de PCR el 41 % (38 cepas) fue detectado el gen blaKPC, la mayoría de estos fue tomado de aislamientos de muestras de orina, mostrándose así la gran prevalencia de estas cepas por el uso incontrolado de antibióticos (33).

Las β -lactamasas de tipo AmpC pertenecen en la clasificación de Ambler a la clase C, estas enzimas hidrolizan las cefalosporinas de primera, segunda generación y en ocasiones pero con menor frecuencia a las de tercera generación, sin embargo cuando este tipo de β -lactamasas hidrolizan a las cefalosporinas de cuarta generación y carbapemenasas se les llama enzimas β -lactamasas AmpC de espectro extendido, para su detección se utiliza como principal inhibidor el aztreonam y el ácido borónico (ácido fenil-borónico) (34).

Estas enzimas también se les conoce como serin- β -lactamasas pertenecientes a la clase I según la clasificación de Bush-Jacoby- Medeiros, están presentes de forma natural en algunas enterobacteriales así como en algunos bacilos no fermentadores, tienen un índice alto de mortalidad por su resistencia al ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam (35).

Para la detección de las carbapemenasas se utiliza como método de elección el ensayo espectrofotométrico, sin embargo, este método no está al alcance de todos los laboratorios por lo que se proponen métodos biológicos, uno de ellos sería la prueba modificada de Hodge, su desventaja es que no realiza la diferenciación de las carbapemenasas (34).

En un estudio donde sus variables fueron pacientes > 18 años con bacteriemia adquirida intrahospitalariamente se evaluó si la terapia combinada carbapenem-colistina reducía la aparición de resistencia a la colistina en comparación con la

monoterapia con colistina, pero los resultados no fueron favorables ya que se registró que el uso del medicamento combinado no tenía efecto sobre la disminución en la resistencia a la colistina (36).

En el hospital cubano pediátrico "Enrique Cabrera" se realizó un estudio longitudinal con el fin de detectar los principales microorganismos causantes de infecciones nosocomiales, en el periodo de Julio 2011 a Septiembre 2012, se obtuvieron 152 aislamientos de *K. pneumoniae* (102 cepas) y *A. baumannii-calcoaceticus* (50 cepas) ambos mostrando resistencia a las cefalosporinas 57 %, se concluyó que los principales afectados por estos microorganismos son los neonatos con una morbimortalidad de 32-40 % por año, donde las muestras afines eran sanguíneas, punta de catéter y líquidos endotraqueales. En este estudio se tomó como opción terapéutica los carbapenémicos para *Klebsiella* spp. multidrogoresistente y la colistina para *Acinetobacter* spp. extremadrogoresistencia (37).

En el hospital Santa María de Rosel en España en el 2009 se aislaron en el servicio de microbiología 538 *P. aeruginosa* en muestras clínicas procedentes del medio ambulatorio y hospitalario, de las que 94 resultaron resistentes a IMP (17,5%). Este porcentaje es superponible a los datos obtenidos en el año previo, ~ del 18,6% (38).

En un documento publicado por el European Center for Disease Control and Prevention (ECDC) en 2013, se detectaron EPC en 36 de los 39 países europeos participantes, incluyendo a España, pero la situación era particularmente preocupante en Grecia y en Italia, debido a la alta prevalencia de *K. pneumoniae* productora de la carbapenemasa KPC2. Actualmente en España, la carbapenemasa más prevalente es la OXA-48 (39). En Alemania se optó por tomar medidas de higiene más severas necesarias para la prevención de estas enzimas (40).

Un método usado en el laboratorio de microbiología para la diferenciación de tipo de carbapenemasas se basa en la inhibición de la enzima en presencia de compuestos inhibidores específicos para las β -lactamasas de clase A, B y C, tienen una buena sensibilidad (20). La inhibición con ácido fenilborónico indica la presencia de una carbapenemasa de clase A (KPC u otras); la inhibición con ácido fenilborónico y con cloxacilina indica la presencia de una β -lactamasa de tipo AmpC; la inhibición con ácido dipicolínico o con EDTA indica la presencia de una metalo- β -lactamasa (clase B, tipos VIM, IMP, NDM), y la ausencia de inhibición con los inhibidores anteriormente descritos indica la presencia de una betalactamasa de clase D (OXA-48 y derivados) pero sin embargo es importante mencionar que estos resultados deben confirmarse con métodos moleculares como sería PCR (39).

1.8 Antibióticos que interfieren con la síntesis proteica mediante la subunidad ribosómica 30S.

1.8.1 Aminoglucósidos

Este grupo de antibióticos es utilizado principalmente para tratar infecciones provocadas por bacterias aerobias Gramnegativas, está formado por gentamicina, tobramicina, amikacina, neomicina, netilmicina, kanamicina y estreptomina (14).

Se unen a la subunidad 30S del ribosoma. Bloquean la síntesis de proteínas adheriéndose a la subunidad 30S ribosomal y así previenen que esta subunidad se adhiera al ARN mensajero. También actúa cuando la presencia del aminoglucósido provoca la lectura errada del ARN mensajero (ARNm) dentro del ribosoma (41).

1.8.2 Tetraciclinas

Están conformadas por tetraciclina, minociclina y doxiciclina, su mecanismo de acción se basa en unirse a la subunidad 30S del ribosoma para bloquear la adherencia del ARN de transferencia (tARN) (41).

1.9 Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas por la subunidad ribosómica 50S.

1.9.1 Macrólidos

El mecanismo de este grupo es principalmente bacteriostático, lo conforma la eritromicina, azitromicina, claritromicina y las **lincosamidas** (clindamicina). Se une a la subunidad 50S del ribosoma finalizando el crecimiento de la cadena proteica y la inhibición de la síntesis de proteínas (41).

1.9.2 Cloranfenicol

Comparte características con los macrólidos solo que este interfiere con la unión de aminoácidos a la proteína de crecimiento (41).

1.10 Antibióticos que interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos

1.10.1 Quinolonas

Dentro de este grupo se encuentra el ácido nalidixico, ciprofloxacina, levofloxacina y gemifloxacina, interfiere con la síntesis del ADN por medio del bloqueo de la

enzima ADN girasa (30). Son utilizadas principalmente para el tratamiento de infecciones en la orina (14).

1.10.2 Rifampicina

Producen la muerte de la célula al unirse a la ARN polimerasa ADN dependiente, bloqueando así la síntesis de ARN (41).

1.11 Antibióticos que inhiben la ruta metabólica de la síntesis del ácido fólico

1.11.2 Sulfonamidas

Son utilizadas para tratar infecciones producidas tanto por Gram negativos como Gram positivos, aunque solo ejercen un efecto bacteriostático, inhiben la sintetasa dihidropteroato, la enzima bacteriana que incorpora PABA en el ácido dihidropteroato precursor inmediato del ácido fólico (14).

CAPÍTULO 2

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

En el transcurso del tiempo las bacterias han logrado adaptarse por medio de mecanismos enzimáticos al entorno en el que habitan, así como a los tratamientos usados para combatirlas, por lo que es un problema encontrarse con bacterias que ya no son solo resistentes a los antibióticos de primera elección, sino que son resistentes a diferentes tipos de antibióticos y son las que tienen facilidad para intercambiar genes de resistencia. Esta investigación está enfocada a un género en específico de bacterias; *Klebsiella variicola* ya que con el paso del tiempo se ha demostrado que además de la elevada resistencia a los antibióticos que presentan, se han encontrado subespecies bioquímicamente muy similares y con los métodos de identificación convencionales son difícil de diferenciar. El Hospital Infantil de Morelia cuenta con el laboratorio de microbiología y parasitología, a la fecha no se ha realizado un estudio con metodología científica que nos permita indagar las subespecies que presentan los niños atendidos de este hospital, así como identificar su frecuencia por edad, sexo, servicio y los antimicrobianos que tengan utilidad para tratar estas bacterias por lo tanto, se tiene como base responder las siguientes preguntas; ¿Cuál es la incidencia de *Klebsiella variicola* y otras subespecies en pacientes hospitalizados en el año 2019 por sexo, edad y servicio en el Hospital Infantil de Morelia? ¿Qué resistencia y susceptibilidad antimicrobiana tienen las cepas estudiadas?

3 JUSTIFICACIÓN

MAGNITUD DEL PROBLEMA ESTUDIADO: Diversas investigaciones; Rodríguez C. y cols en 2019, Rodríguez-Medina N. y cols en 2019, Barrios-Camacho H. y cols en 2019 señalan que existen grupos filogenéticos de una bacteria del género *Klebsiella* (encontrados en un principio en las plantas, pero ahora ya causando infecciones en humanos y animales), como lo son *Klebsiella quasipneumoniae*, y *Klebsiella variicola*

TRASCENDENCIA: *K. variicola* es de suma importancia médica en la actualidad, ya que en los últimos años se ha visto aumentado el número de aislamientos encontrados en diversas muestras de pacientes hospitalizados causando graves infecciones y complicándose el tratamiento antibiótico por la resistencia que presentan las cepas, el problema principal radica en su identificación ya que está no es posible realizarse utilizando pruebas bioquímicas, ni con los equipos automatizados convencionales (Phoenix, Vitek 2x1 y MicroScan) ya que comparte

las características macroscópicas, microscópicas y fenotípicas con *K. pneumoniae* por lo cual se deben implementar nuevos métodos como lo son la espectrometría de masas o PCR para la identificación de bacterias, ya que las especies que se identifican erróneamente pueden resultar más resistentes a ciertos grupos farmacéuticos que las que se reportan, causando así una falla en la medicación del paciente.

VULNERABILIDAD: Existe el equipo adecuado para identificar estos grupos filogenéticos.

CONTRIBUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN A LA SOLUCIÓN DEL PROBLEMA

APLICADO: Al realizar la correcta identificación de las subespecies y con esto su resistencia y susceptibilidad a los antimicrobianos ayuda a mejorar el tratamiento de las infecciones causadas por dichas bacterias.

FACTIBILIDAD: El laboratorio del hospital cuenta con el equipo para identificar la especie bacteriana y se trabajó en colaboración con la facultad de medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León para identificar las subespecies bacterianas.

4 HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Las principales especies de *Klebsiella* en el Hospital Infantil de Morelia son *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola* y *Klebsiella oxytoca*, siendo *K. variicola* la más resistente a los antimicrobianos más usados en el hospital.

Hipótesis de frecuencia.

Ht: La frecuencia de *Klebsiella variicola* será superior a un 10% de las muestras analizadas.

Ho: La frecuencia de *Klebsiella variicola* no será superior a un 10% de las muestras analizadas.

Hipótesis de resistencia a los antimicrobianos.

Ht: *Klebsiella variicola* será resistente a algunos de los antimicrobianos más utilizados en el antibiograma.

Ho: *Klebsiella variicola* no será resistente a algunos de los antimicrobianos más utilizados en el antibiograma.

CAPÍTULO 3

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Analizar la frecuencia y resistencia antimicrobiana de *Klebsiella variicola* en el Hospital Infantil de Morelia 2019-2020

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la incidencia de subespecies de *Klebsiella* en pacientes hospitalizados en el año 2019 en el Hospital Infantil de Morelia.
- Identificar resistencia y susceptibilidad antimicrobiana de las cepas estudiadas por edad, servicio y tipo de muestra biológica.

CAPÍTULO 4

6 MATERIAL Y METODOS

Es un estudio observacional, experimental y prospectivo.

7 UNIVERSO DE ESTUDIO

Pacientes que se encuentren hospitalizados en el hospital infantil de Morelia del 2019-2020.

7.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes con solicitud y elaboración de cultivos de aspirado/lavado bronquial, hemocultivo, urocultivo, coprocultivo, líquidos estériles, que según los criterios microbiológicos son positivos a bacilos Gram negativos.

7.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes sin infecciones por bacterias Gram negativas

7.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Cepas de pacientes que tengan varios cultivos con la misma cepa.
- Cepas que no se puedan recuperar en su estado de invernación.

7.4 DEFINICIÓN DE VARIABLES Y UNIDADES DE MEDIDA

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO	MEDICIÓN, OPERACIONALIZACIÓN
<i>Klebsiella variicola</i>	Aislamiento de <i>Klebsiella variicola</i> en medios específicos.	Cualitativa	Crecimiento de colonias aisladas en los cultivos e identificación por espectrofotometría de masas MALDI-TOF.
Edad	Años cumplidos de los niños de los cuales se obtuvieron los cultivos.	Cualitativa	Por grupo etario: Neonato= 0-28 días Lactantes: 29 días a 23 meses Preescolar: 2-5 años Escolar: 6-11 años Adolescente: 12 a 17 años
Muestra biológica	Materia como orina, sangre, secreción, exudado y líquidos estériles.	Cualitativa	Por medio de la área donde se procese como es urocultivos, hemocultivos, secreciones, respiratorias.
Resistencia y sensibilidad de las cepas.	Resistencia: Antimicrobianos que no tienen eficacia contra la <i>Klebsiella spp</i> estudiada.	Cuantitativo	Por el método de Kirby-Bauer identificar la sensibilidad que tiene esta cepa a los diferentes grupos de antibióticos.

7.7 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras que fueron usadas para esta investigación serán recolectadas del Laboratorio de Microbiología del Hospital "Eva Sámano de López Mateos", dichas muestras fueron provenientes de:

- Orina
- Hemocultivos
- Secreciones
- Lavados bronquiales

Estas muestras se procesaron para el aislamiento y la identificación de las cepas de *Klebsiella spp* causantes de la infección del paciente, y se recolectaron las cepas Para la identificación de su sensibilidad a los diferentes grupos de antibióticos fue por el método de concentración mínima inhibitoria por el equipo Phoenix (basado en un método de espectrofotometría colorimétrico)

1. Las cepas resistentes recolectadas durante el año 2019 en el Hospital Infantil (Aproximadamente 60 cepas) se enviaron a la D.C. Elvira Garza González a Monterrey al laboratorio del Hospital Universitario José Eleuterio Gonzalez que trabaja con la Universidad Autónoma de Nuevo León, en medios de transporte BAB.
2. Del 09 al 19 de Marzo del 2020 me presenté en el Hospital Universitario José Eleuterio Gonzalez en Monterrey donde se llevó a cabo la tipificación de las enzimas de resistencia de las cepas que se enviaron previamente.
3. La tipificación se llevó a cabo por medio del método espectrometría de masas (MALDI-TOF).

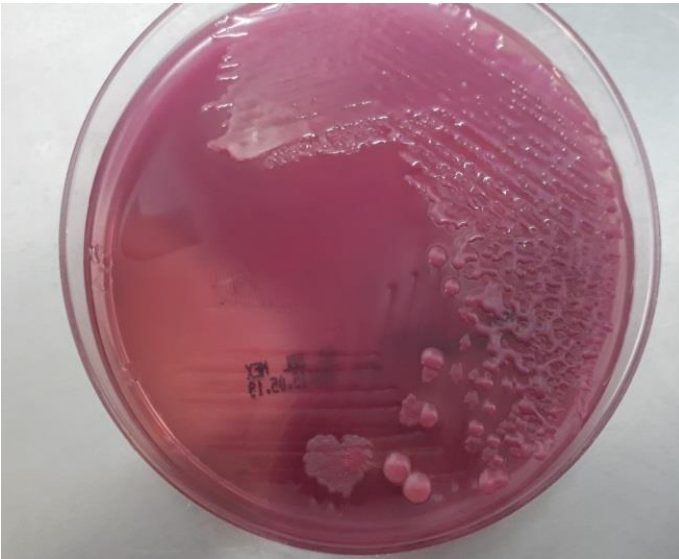
Esta técnica está basada en la ionización (MALDI) acoplada a un analizador (TOF), esta técnica permite el análisis de biomoléculas (Proteínas, péptidos y azúcares) y moléculas orgánicas grandes (Macromoléculas) que se fragmentan cuando se intentan ionizar por algún método más convencional.

De acuerdo a la Universidad de Alicante: En esta técnica la muestra se mezcla con la matriz en exceso sobre una superficie de metal de tal forma que ambas cocrystalizan cuando se evapora el solvente. Esta preparación es sometida a pulsos cortos de láser en alto vacío lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación y en transferencia de H⁺ a la muestra (ionización) dando lugar, normalmente, a especies monocargadas que son

analizadas mediante TOF. Este analizador permite la determinación de la masa en una región de alto vacío mediante una medida muy precisa del período de tiempo desde la aceleración de los iones en la fuente hasta que impactan con el detector (42).

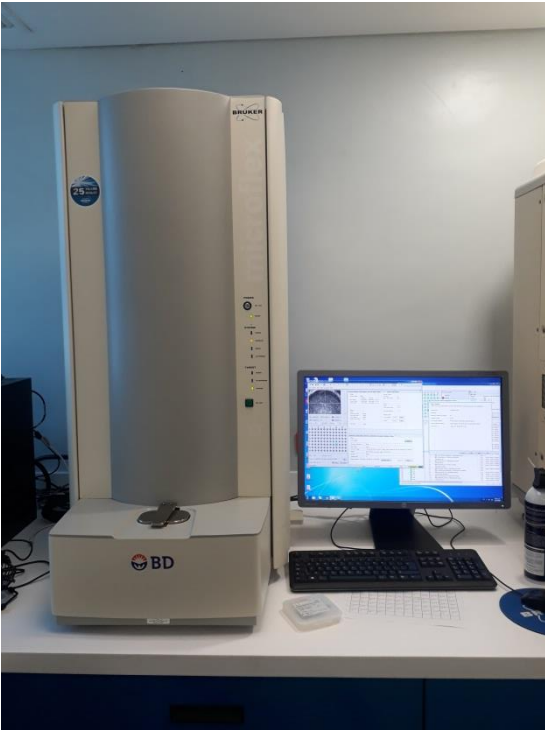
4. Después de corroborar la identificación de las cepas en el Hospital Universitario José Eleuterio Gonzalez, se hará la respectiva interpretación de resultados.

Imagen 4.1 Cepa de *K. pneumoniae*/*K. variicola* en agar MacConkey después de 24 horas de incubación a 37 ° C.



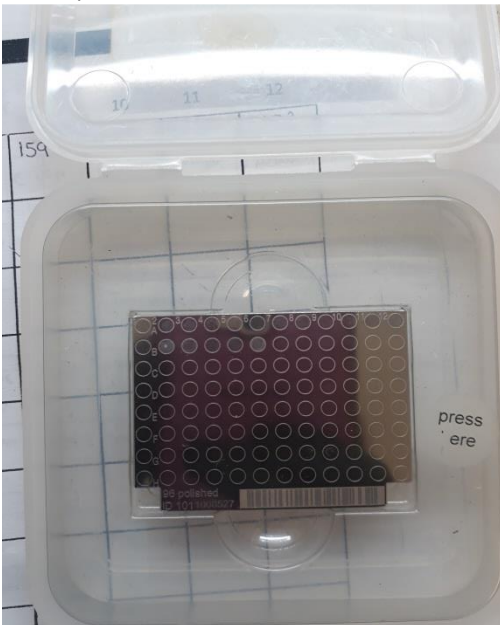
Fuente: Imagen propia tomada del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

Imagen 5.1 Espectrómetro de masas MALDI-TOF relación masa/peso, utilizado para la identificación de las cepas bacterianas



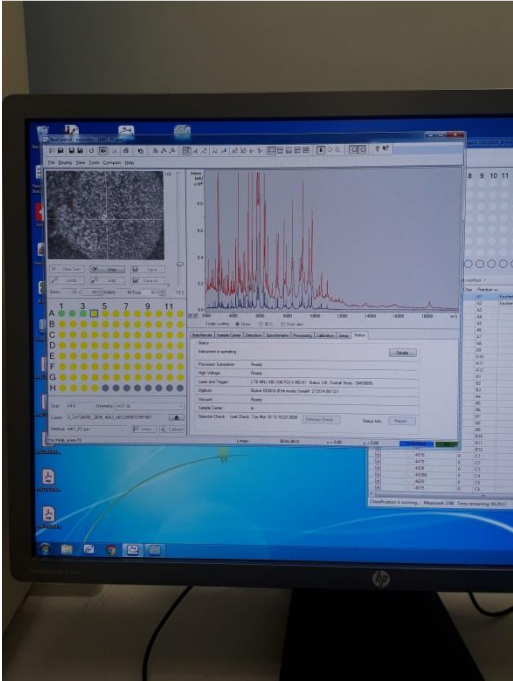
Fuente: Imagen propia tomada en el laboratorio del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González en Monterrey, Nuevo León.

Imagen 6.1 Placa de metal reutilizables con los pocillos correspondientes para colocar la muestra, y posteriormente ser leída en el espectrómetro.



Fuente: Imagen propia tomada en el laboratorio del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González en Monterrey, Nuevo León.

Imagen 7.1 Para la lectura de los resultados; Los picos muestran la frecuencia que arroja la bacteriana en comparación con los que se tiene en su base de datos. El score debe ser de 2 para que se considere correcta la especie indicada



Fuente: Imagen propia tomada en el laboratorio del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González en Monterrey, Nuevo León.

CAPÍTULO 5

8 RESULTADOS

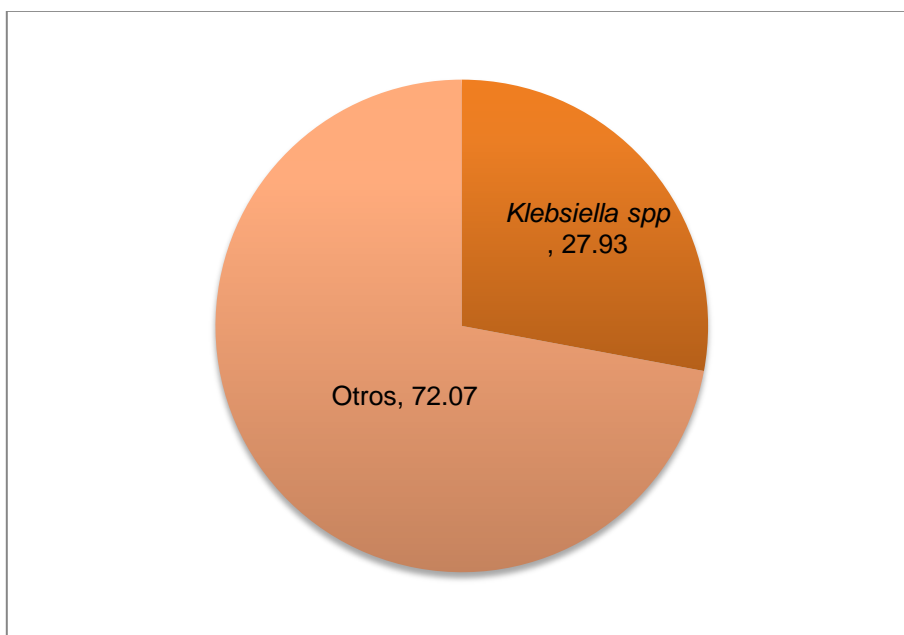
En el año 2019 de las 6737 muestras de aspirado/lavado bronquial, líquidos corporales, hemocultivo y urocultivo recolectadas durante ese año, 784 tuvieron desarrollo bacteriano y de estas se obtuvieron 219 cepas correspondientes a *Klebsiella spp* lo que corresponde a una incidencia del 28% como se muestra en la tabla y figura 1.

Tabla 1. Incidencia de *Klebsiella spp* en el Hospital Infantil de Morelia 2019.

Microorganismo	No. de muestra	Porcentaje %
<i>Klebsiella spp</i>	219	27.93
Otros microorganismos	565	72.07
Total	784	100

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

Figura 1. Incidencia de *Klebsiella spp* en el Hospital Infantil de Morelia 2019.



Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

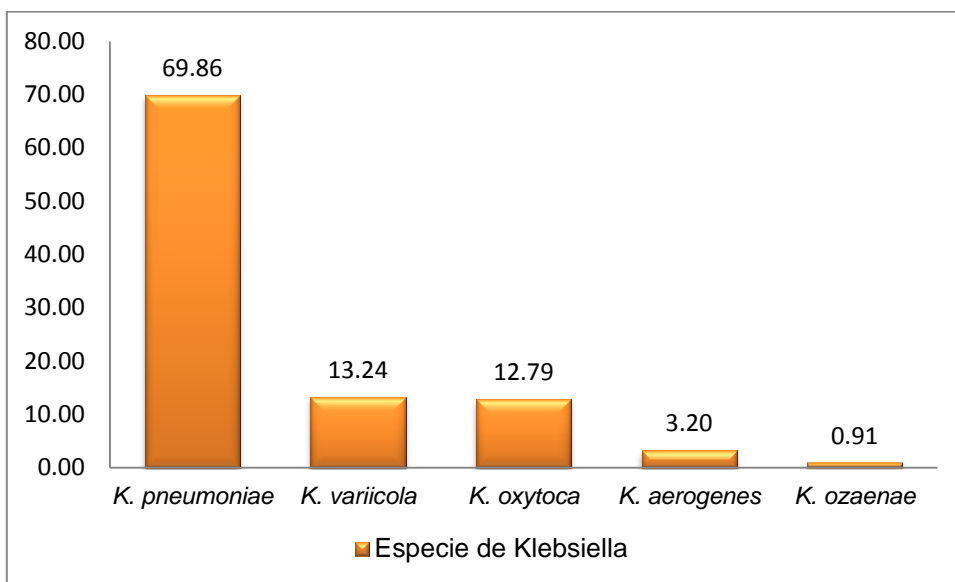
Las especies de *Klebsiella* predominantes son la *K. pneumoniae* con 70%, seguida de la *K. variicola* con 13 % (ver tabla y figura 2).

Tabla 2. Especies de *Klebsiella*.

Especie de <i>Klebsiella</i>	No. de muestras	Porcentaje %
<i>K. pneumoniae</i>	153	69.86
<i>K. variicola</i>	29	13.24
<i>K. ozaenae</i>	2	0.91
<i>K. oxytoca</i>	28	12.79
<i>K. aerogenes</i>	7	3.20
Total	219	100

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

Figura 2. Especies de *Klebsiella*.



Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

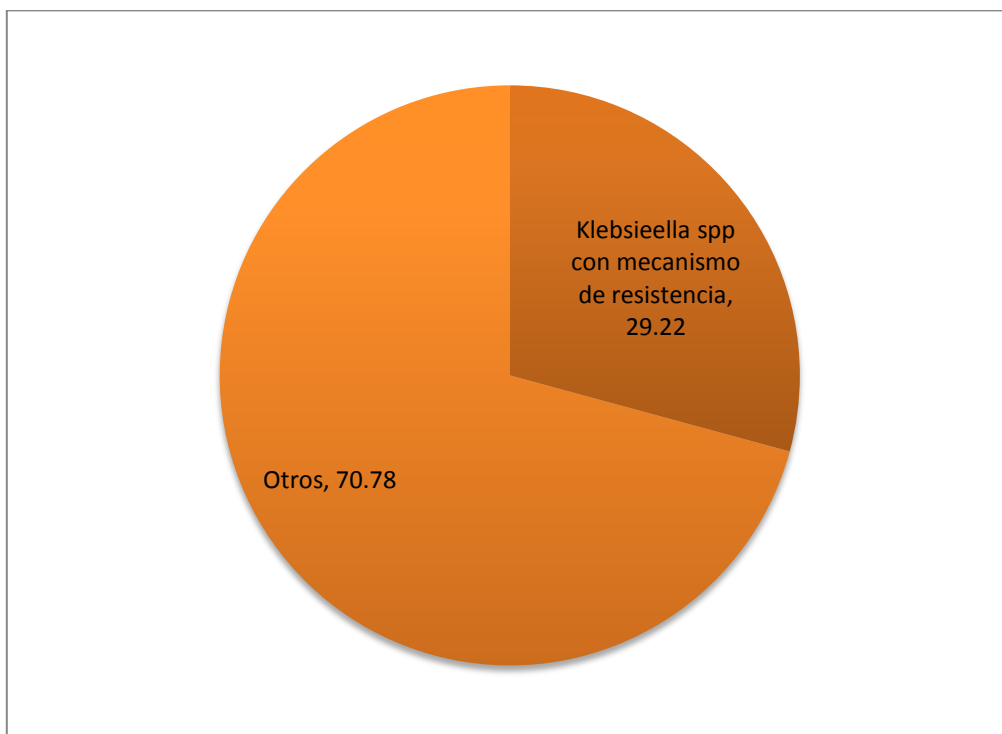
Klebsiella spp presento una resistencia antimicrobiana a los grupos antibióticos BLEES, quinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas y carbapenems de 30%, lo que indica que 3 de cada 5 cepas de *Klebsiella* son resistentes a múltiples antibióticos, como se muestra en la tabla y figura 3.

Tabla 3. Total de *Klebsiella spp* con algún mecanismo de resistencia.

Microorganismo	No. de muestra	Porcentaje %
<i>Klebsiella spp</i> con mecanismo de resistencia	64	29.22
Otros	155	70.78
Total	219	100

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

Figura 3. Total de *Klebsiella spp* con algún mecanismo de resistencia.



Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

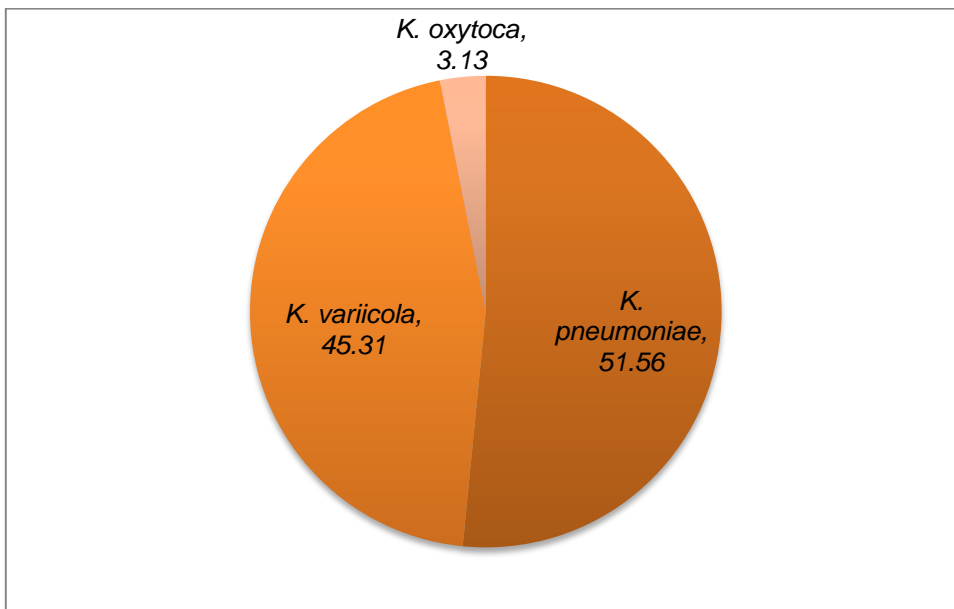
Las principales especies de *Klebsiella* resistentes a los grupos antibióticos (BLEES, quinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas y carbapenems) corresponden a *K. pneumoniae* con un 51%, *K. variicola* 45% y *K. oxytoca* 3% (Ver tabla y figura 4).

Tabla 4. Especies de *Klebsiella* con algún mecanismo de resistencia a los antibióticos.

Micoorganismo	No. de muestra	Porcentaje %
<i>K. pneumoniae</i>	33	51.56
<i>K. variicola</i>	29	45.31
<i>K. oxytoca</i>	2	3.13
Total	64	100

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

Figura 4. Especies de *Klebsiella* con algún mecanismo de resistencia a los antibióticos.



Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

El rango de la edad fue clasificado por grupo etario donde neonato abarca de 0-28 días, lactantes de 29 días-23 meses, preescolar de 2-5 años, escolar de 6-11 años, adolescente de 12-17 años.

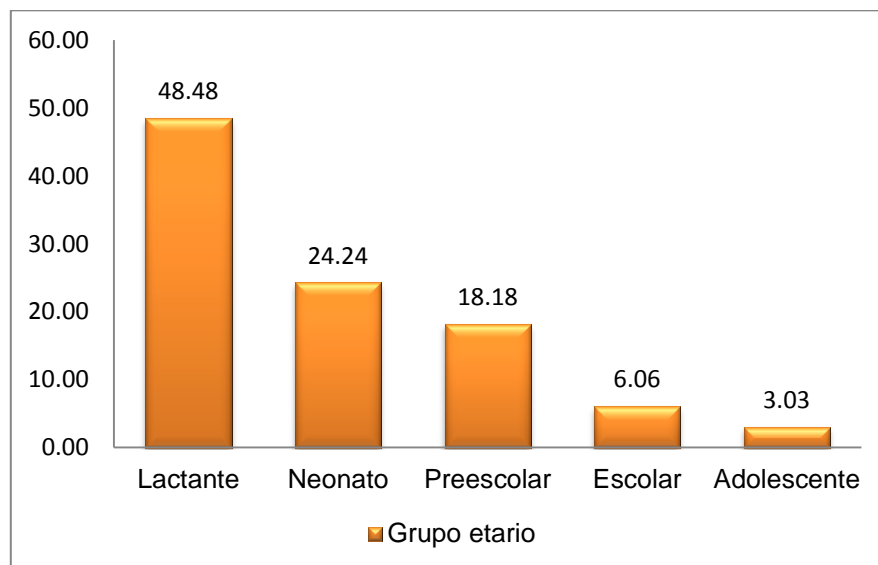
Las cepas resistentes de *K. pneumoniae* predominan en lactantes con un 48 %, seguido del neonato 24%, preescolar 18%, escolar 6% y adolescente en un 3%, como se puede ver en la tabla y figura 5.

Tabla 5. Edad de pacientes por resistencia de *K. pneumoniae*

Edad	No. de muestras	Porcentaje %
Lactante	16	48.48
Neonato	8	24.24
Preescolar	6	18.18
Escolar	2	6.06
Adolescente	1	3.03
Total	33	100

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

Figura 5. Edad de pacientes por resistencia de *K. pneumoniae*



Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

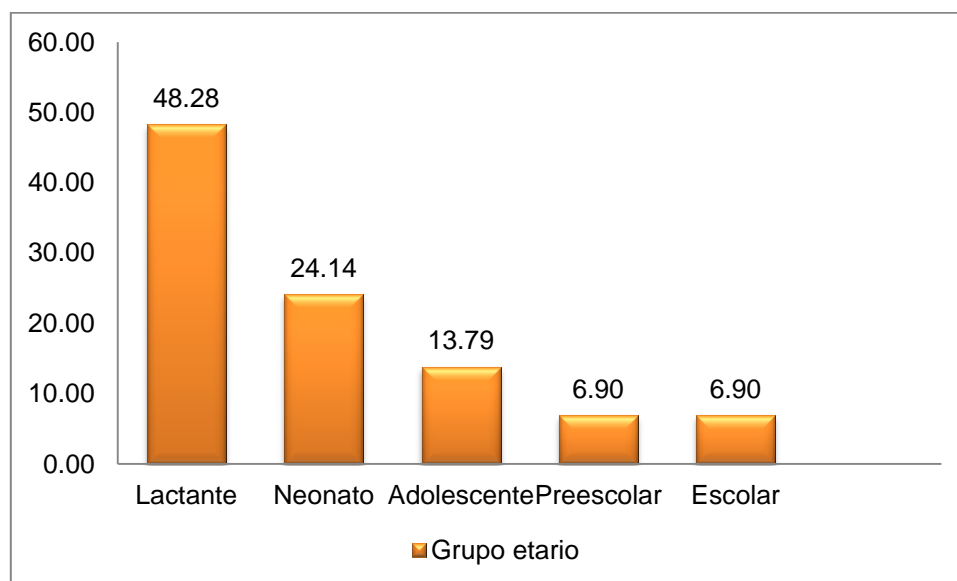
Para el caso de las cepas resistentes de *K. variicola* se encontró mayor incidencia en lactantes con un 48%, seguido de neonato 24%, adolescentes 13%, preescolar y escolar con un 6%, como se puede ver en la tabla y figura 6.

Tabla 6. Edad de pacientes por resistencia de *K. variicola*

Edad	No. de muestras	Porcentaje %
Lactante	14	48.28
Neonato	7	24.14
Adolescente	4	13.79
Preescolar	2	6.90
Escolar	2	6.90
Total	29	100

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

Figura 6. Edad de pacientes por resistencia de *K. variicola*



Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

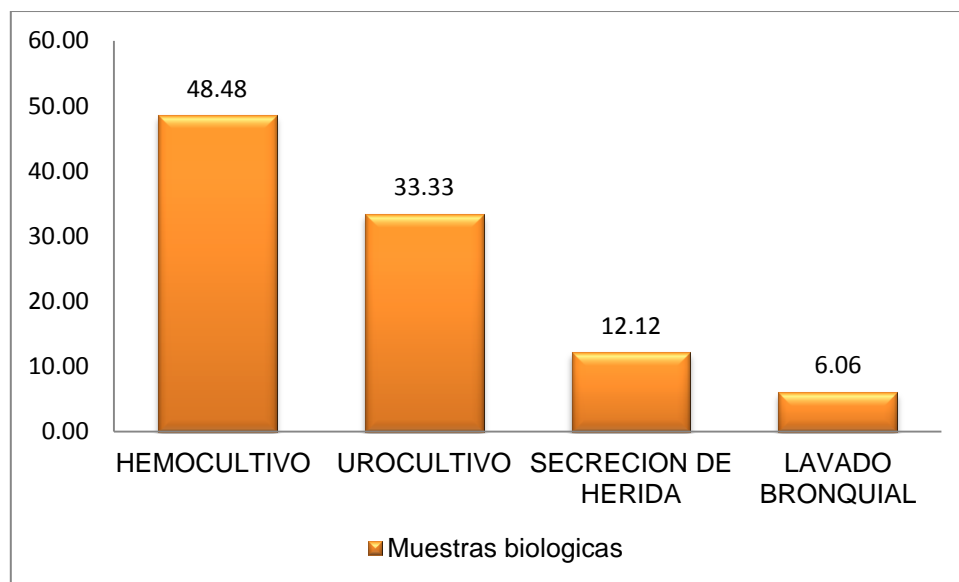
De los principales tipos de muestras biológicas de donde se obtuvieron los aislamientos de *K. pneumoniae* resistente corresponden en un 48% a hemocultivos, 33% a urocultivos, 12% secreción de herida, 3% aspirado bronquial y lavado bronquial. Lo que nos indica que se encontró en su mayoría aislada de los hemocultivos (Ver tabla y figura 7).

Tabla 7. Tipos de muestras biológicas de los correspondientes aislamientos resistente de *K. pneumoniae*

Muestra biológica	No. de muestra	Porcentaje %
Hemocultivo	16	48.48
Urocultivo	11	33.33
Secreción de herida	4	12.12
Lavado bronquial	2	6.06
Total	33	100

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

Figura 7. Tipos de muestras biológicas de los correspondientes aislamientos resistentes de *K. pneumoniae*



Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

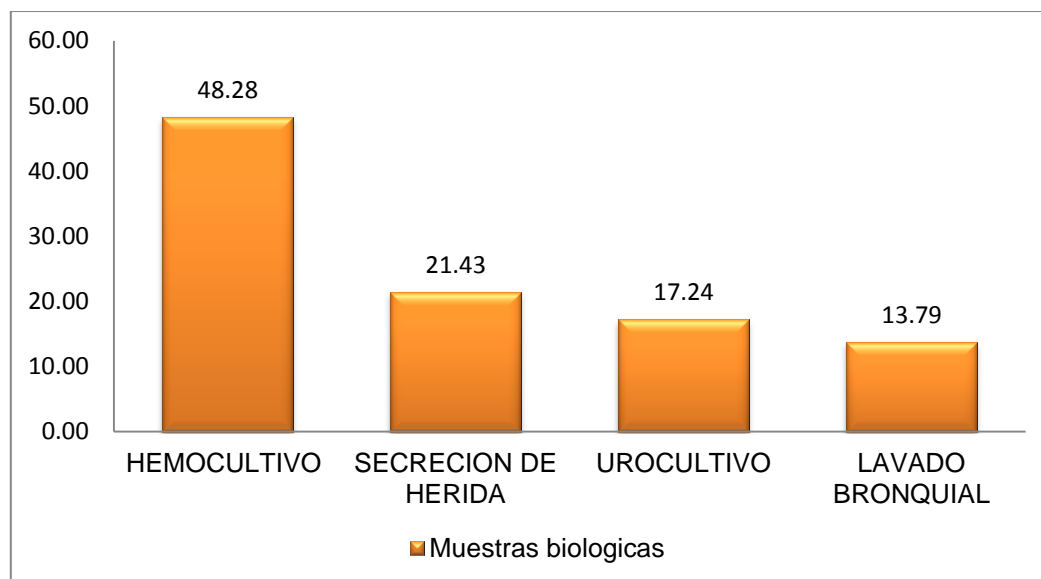
De los principales tipos de muestras biológicas correspondientes a los aislamientos de *K. variicola* resistente se identificó el mayor número de cepas resistentes en los hemocultivos con un 48%, seguido de las secreciones en un 21%, urocultivos en un 17%, y lavado bronquial en 13.79%. Lo que nos indica que se encontró en su mayoría aislada de los hemocultivos (Ver tabla y figura 8).

Tabla 8. Tipo de muestras biológicas de los correspondientes aislamientos resistentes de *K. variicola*

Muestra biológica	No. de muestra	Porcentaje %
Hemocultivo	14	48.28
Secreción de herida	6	21.43
Urocultivo	5	17.24
Lavado bronquial	4	13.79
Total	29	100

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

Figura 8. Tipo de muestras biológicas de los correspondientes aislamientos resistentes de *K. variicola*



Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

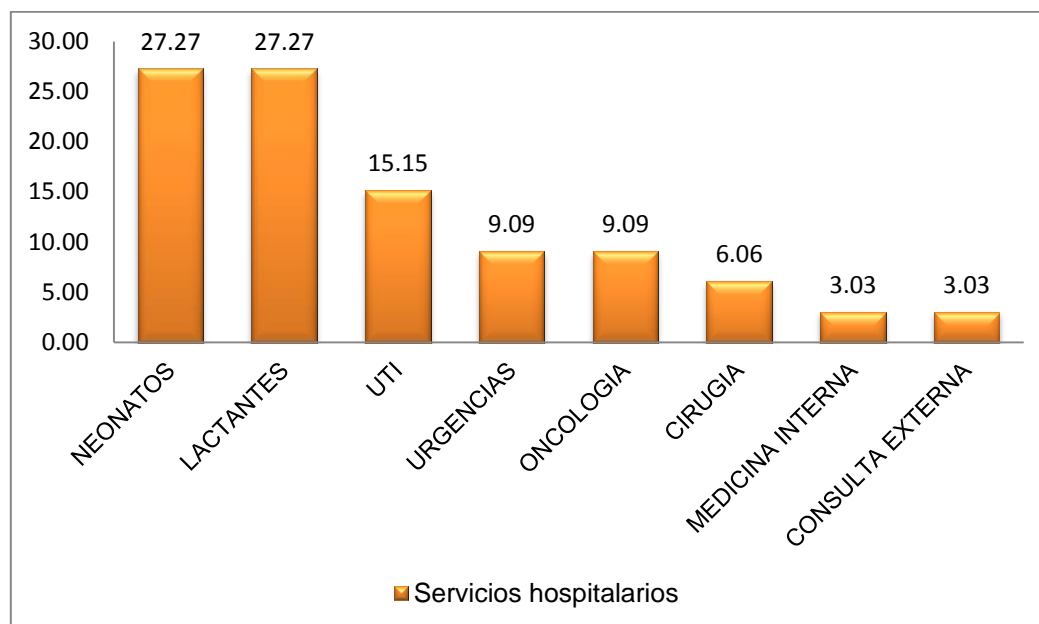
En la distribución de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a los antibióticos (BLEES, quinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas y carbapenems) dentro de los servicios hospitalarios se encontró la mayor parte en neonatos y lactantes con un 27%, un 15% en UTI, 9% en urgencias y oncología, 6% en cirugía, 3% en medicina interna y consulta externa, como lo muestra la tabla y figura 9.

Tabla 9. Distribución de *Klebsiella pneumoniae* resistente a los antimicrobianos en los servicios hospitalarios.

Servicios hospitalarios	No. de muestra	Porcentaje %
Neonatos	9	27.27
Lactantes	9	27.27
UTI	5	15.15
Urgencias	3	9.09
Oncología	3	9.09
Cirugía	2	6.06
Medicina interna	1	3.03
Consulta externa	1	3.03
Total	33	100

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

Figura 9. Distribución de *Klebsiella pneumoniae* resistente a los antimicrobianos en los servicios hospitalarios.



Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

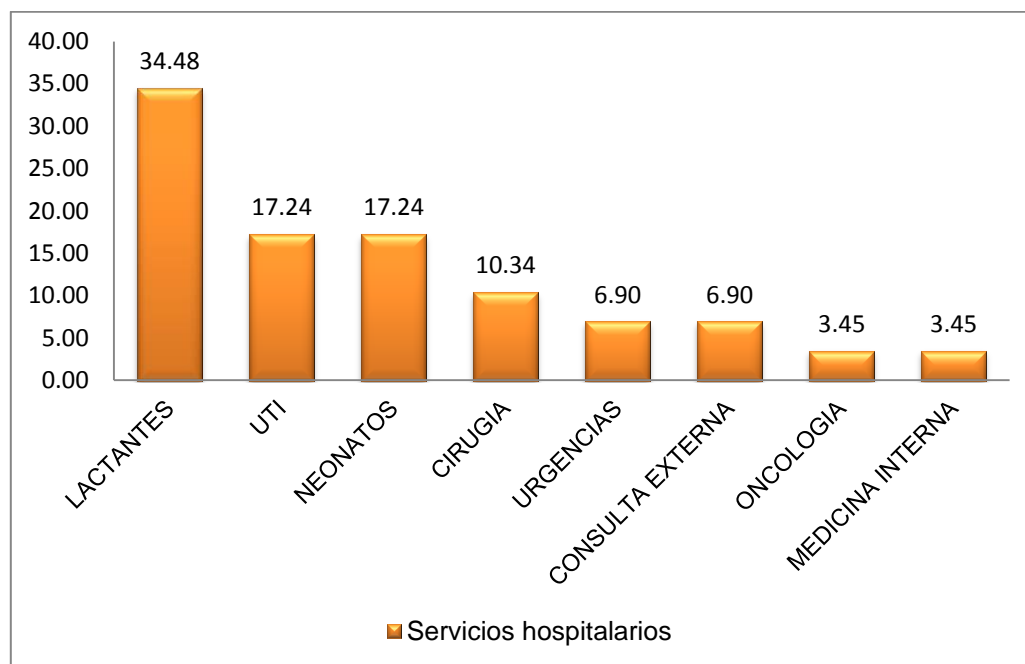
En la distribución de cepas de *K. variicola* resistentes a los grupos antibióticos (BLEES, quinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas y carbapenems) dentro de los servicios hospitalarios se encontró un 34% en lactantes, 17% en UTI y neonatos, 10% en cirugía, 6% urgencias y consulta externa, 3% oncología y medicina externa, como lo muestra la tabla y figura 10.

Tabla 10. Distribución de *K. variicola* resistente a los antimicrobianos en los servicios hospitalarios

Servicios hospitalarios	No. de muestra	Porcentaje %
Lactantes	10	34.48
UTI	5	17.24
Neonatos	5	17.24
Cirugía	3	10.34
Urgencias	2	6.90
Consulta externa	2	6.90
Oncología	1	3.45
Medicina interna	1	3.45
Total	29	100

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

Figura 10. Distribución de *K. variicola* resistente a los antimicrobianos en los servicios hospitalarios



Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

Al realizarse los antibiogramas correspondientes se observa notablemente la resistencia de *K. pneumoniae* a las penicilinas como amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) 30%, ticarcilina/ácido clavulánico (TIM) 21%, ampicilina/sulbactam (SAM) 50%.

Las cefalosporinas como cefuroxima (CXM) en un 39%; cefazolina (KZ) 90%, ceftriaxona (CRO) 66%, cefepime (FEP) 87%, cefotaxima (CTX) 27%, ceftazidime (CAZ) 24%.

Los monobactams como el aztreonam (ATM) en un 27%.

Los aminoglucosidos como amikacina (AN) en un 32%, gentamicina (GM) 39%, tobramicina (TO) 15%, netilmicina (NET) 15%.

Los carbapenemicos como meropenem (MEM) en un 9%, ertapenem (ETP) 12%.

La tetraciclina (TET) en un 15%, la rifampicina (RA) 9%, tigleciclina (TIG) 9%.

Las quinolonas como ciprofloxacino (CIP) en un 42%, levofloxacina (LVX) 15%.

Las sulfonamidas como trimetoprim/sulfametoxazol (SXT) en un 66% (Ver tabla y figura 11)

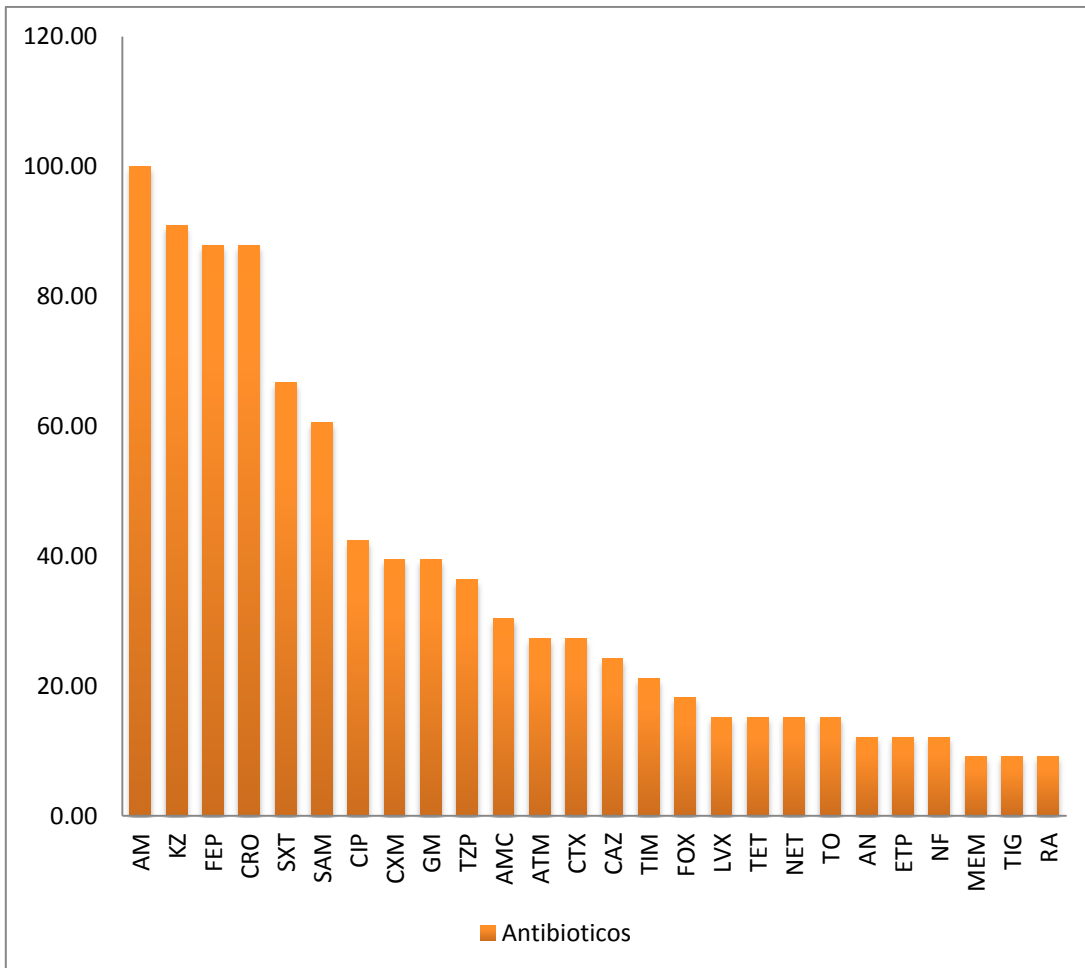
Tabla 11. Resistencia de *K. pneumoniae* a los antibióticos.

Antibióticos	No. de muestra	Porcentaje %
AM	33	100
KZ	30	90.91
FEP	29	87.88
CRO	29	87.88
SXT	22	66.67
SAM	20	60.61
CIP	14	42.42
CXM	13	39.39
GN	13	39.39
TZP	12	36.36
AMC	10	30.30
ATM	9	27.27
CTX	9	27.27
CAZ	8	24.24
TIM	7	21.21
FOX	6	18.18
LVX	5	15.15
TET	5	15.15
NET	5	15.15
TO	5	15.15

AN	4	12.12
ETP	4	12.12
NF	4	12.12
MEM	3	9.09
TIG	3	9.09
RA	3	9.09

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

Figura 11. Resistencia de *K. pneumoniae* a los antibióticos.



Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

Al realizarse los antibiogramas correspondientes se observa notablemente la resistencia de *K. variicola* a las penicilinas como ampicilina (AM) en un 96%, amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) 17%, ampicilina/sulbactam (SAM) 86%.

Las cefalosporinas como cefuroxima (CXM) en un 10%; cefazolina (KZ) 93%, ceftriaxona (CRO) 100%, cefepime (FEP) 93%, ceftazidime (CAZ) 3%.

Los monobactams como el aztreonam (ATM) en un 6%.

Los aminoglucosidos como amikacina (AN) en un 3%, gentamicina (GM) 55%.

Los carbapenemicos como meropenem (MEM) en un 10%, ertapenem (ETP) 6%.

La tetaclina (TET) en un 15%, la rifampicina (RA) 9%, tigeciclina (TIG) 10%.

Las quinolonas como ciprofloxacino (CIP) en un 72%, levofloxacina (LVX) 37%, nitrofurantoína (NF) 3%.

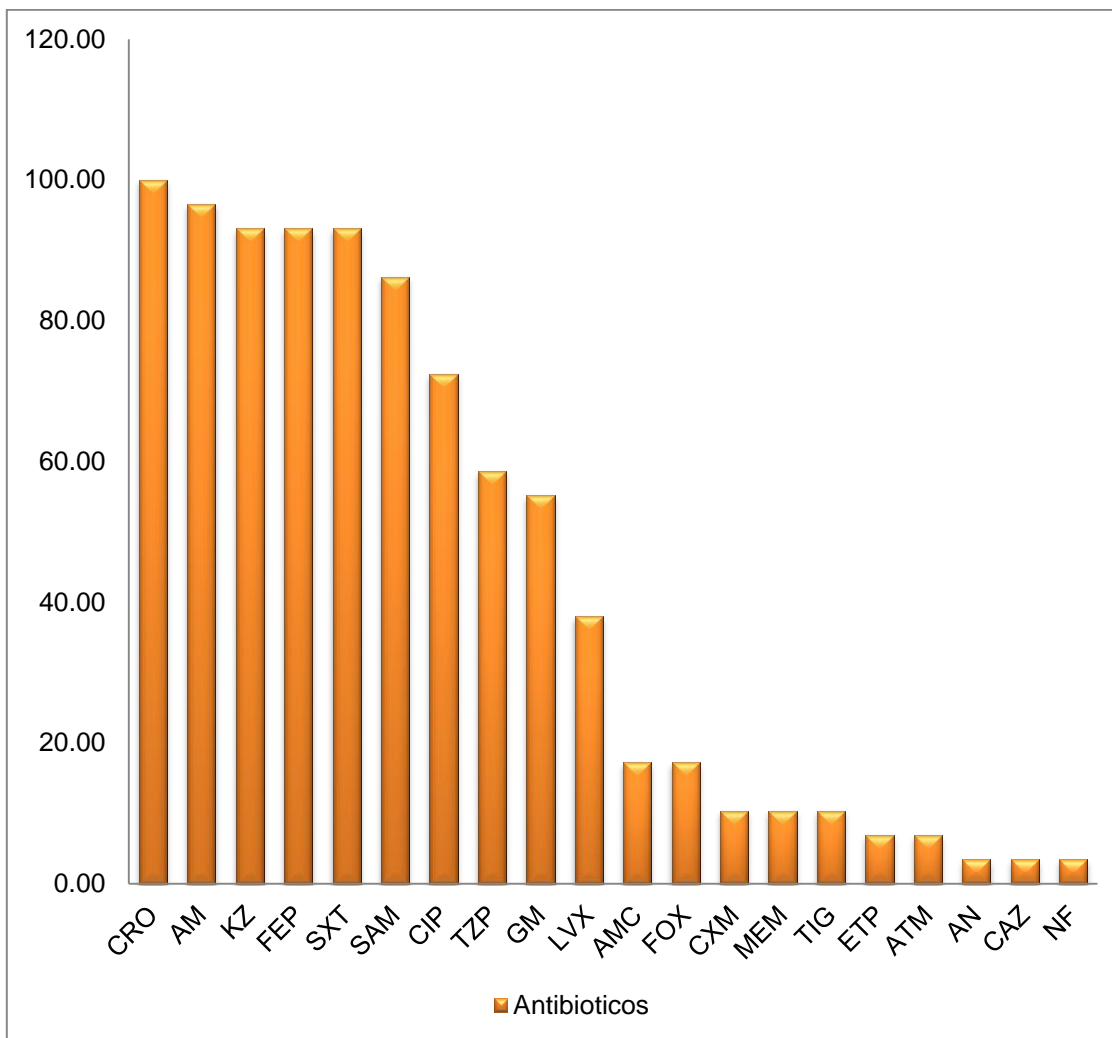
Las sulfonamidas como trimetoprim/sulfametoxazol (SXT) en un 93% (Ver tabla y figura 12)

Tabla 12. Resistencia de *K. variicola* a los antibióticos.

Antibióticos	No. de muestra	Porcentaje %
CRO	29	100.00
AM	28	96.55
KZ	27	93.10
FEP	27	93.10
SXT	27	93.10
SAM	25	86.21
CIP	21	72.41
TZP	17	58.62
GM	16	55.17
LVX	11	37.93
AMC	5	17.24
FOX	5	17.24
CXM	3	10.34
MEM	3	10.34
TIG	3	10.34
ETP	2	6.90
ATM	2	6.90
AN	1	3.45
CAZ	1	3.45
NF	1	3.45

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

Figura 12. Resistencia de *K. variicola* a los antibióticos.



Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

CAPÍTULO 6

9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis de los resultados obtenidos durante la investigación por medio del método de la chi cuadrada de Pearson usando como base la $p < 0.5$, se tomaron en cuenta los grupos de antibióticos en los que se encontró mayor incidencia en la resistencia (BLEES, quinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas y carbapenems) y fue comparada su sensibilidad entre cepas de *K. pneumoniae* y *K. variicola*.

En relación con la producción de BLEES tanto *K. pneumoniae* como *K. variicola* tienen positividad, al realizar los cálculos de la χ^2 , se observa que la chi calculada es menor a la chi de la tabla, por lo tanto, se dice que no existe diferencia significativa como se muestra en la tabla 13 y la sustitución de los datos y resultados de la fórmula.

Tabla 13. *K. pneumoniae* y *K. variicola* productoras de BLEES.

BLEES	Positivas	Negativas	
<i>K. pneumoniae</i>	29 <small>E=29.80</small>	4 <small>E= 3.19</small>	33
<i>K. variicola</i>	27 <small>E=26.19</small>	2 <small>E=2.80</small>	29
	56	6	62

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

$$\chi^2 = \frac{(-0.8)(-0.8)}{29.80} + \frac{(0.81)(0.81)}{26.19} + \frac{(0.81)(0.81)}{3.19} + \frac{(-0.8)(-0.8)}{2.80}$$

$$\chi^2 \text{ cal} = 0.02 + 0.02 + 0.20 + 0.22 = 0.46$$

$$GL = (col-1) (fil-1)$$

$$GL \quad P \quad P \quad P$$

$$0.1 \quad 0.05 \quad 0.01$$

$$1 \quad 2.706 \quad 3.841 \quad 6.635$$

$$P = 0.05 = 3.84 \chi^2 \text{ tabulada}$$

X^2 calculada=0.46 < X^2 tabulada \rightarrow Ho

De acuerdo a la resistencia del grupo de las quinolonas se muestra que hay una diferencia significativa entre la X^2 calculada y la X^2 tabulada por lo tanto muestra la resistencia provocada por *K. variicola* como se puede ver en la tabla 14.

Tabla 14. Resistencia de *K. pneumoniae* y *K. variicola* a las quinolonas.

Quinolonas	Sensibles	Resistentes	
<i>K. pneumoniae</i>	13 <small>E=7.6</small>	6 <small>E=11.4</small>	19
<i>K. variicola</i>	5 <small>E=10.4</small>	21 <small>E=15.6</small>	26
	18	27	45

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

$$X^2 = \frac{(5.4)(5.4)}{7.6} + \frac{(-5.4)(-5.4)}{10.4} + \frac{(-5.4)(-5.4)}{11.4} + \frac{(5.4)(5.4)}{15.6}$$

$$X^2 \text{ cal} = 3.83 + 2.80 + 2.55 + 1.86 = 11.04$$

X^2 calculada= 11.04 > X^2 tabulada \rightarrow Ht

En relación a la resistencia a los aminoglucósidos tanto *K. pneumoniae* como *K. variicola* tienen positividad, sin que exista diferencia significativa como se muestra en la tabla 15.

Tabla 15. Resistencia de *K. pneumoniae* y *K. variicola* a los aminoglucósidos.

aminoglucósidos	Sensibles	Resistentes	
<i>K. pneumoniae</i>	18 <small>E=15.76</small>	12 <small>E=14.23</small>	30
<i>K. variicola</i>	13 <small>E=15.23</small>	16 <small>E=13.76</small>	29
	31	28	59

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

$$X^2 = \frac{(2.24)(2.24)}{15.76} + \frac{(-2.23)(-2.23)}{15.23} + \frac{(-2.23)(-2.23)}{14.23} + \frac{(2.24)(2.24)}{13.76}$$

$$X^2 \text{ cal} = 0.31 + 0.32 + 0.34 + 0.36 = 1.33$$

X^2 calculada= 1.33 < X^2 tabulada \rightarrow Ho

Al comparar la resistencia de *K. pneumoniae* y *K. variicola* se muestra una diferencia notable en la resistencia a las sulfonamidas provocada por *K. variicola* como lo muestra la tabla 16.

Tabla 16. Resistencia de *K. pneumoniae* y *K. variicola* a las sulfonamidas.

Sulfonamidas	Sensibles	Resistentes	
<i>K. pneumoniae</i>	8 E= 4.91	20 E=23.08	28
<i>K. variicola</i>	2 E=5.08	27 E=23.91	29
	10	47	57

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

$$X^2 = \frac{(3.09)(3.09)}{4.91} + \frac{(-3.08)(-3.08)}{5.08} + \frac{(-3.08)(-3.08)}{23.08} + \frac{(3.09)(3.09)}{23.91}$$

$$X^2 \text{ cal} = 1.94 + 1.86 + 0.41 + 0.39 = 4.6$$

X^2 calculado=4.6 > X^2 tabulada \rightarrow Ht

En relación con la producción de carbapenem tanto *K. pneumoniae* como *K. variicola* tienen positividad, sin que exista diferencia significativa (Ver tabla 8)

Tabla 17. *K. pneumoniae* y *K. variicola* productoras de carbapenem.

Carbapenem	Sensibles	Resistentes	
<i>K. pneumoniae</i>	29 E= 29.36	2 E= 1.63	31
<i>K. variicola</i>	25 E=24.63	1 E=1.36	26
	54	3	57

Fuente: Elaboración propia con información del laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia, Mich.

$$X^2 = \frac{(-0.36)(-0.36)}{29.36} + \frac{(0.37)(0.37)}{24.63} + \frac{(0.37)(0.37)}{1.63} + \frac{(-0.36)(-0.36)}{1.36}$$

$$X^2 \text{ cal} = 0.004 + 0.005 + 0.08 + 0.09 = 0.17 \quad X^2 \text{ calculada} = 0.17 < X^2 \text{ tabla} \rightarrow \text{Ho}$$

CAPÍTULO 7

10 DISCUSION

El Hospital Infantil de Morelia presenta una incidencia del 28% de *Klebsiella spp*, un 70% de *K. pneumoniae*, otros autores como Echeverri y col¹² describen que en hospitales de Medellín Colombia la incidencia de *K. pneumoniae* fue de 77%, porcentaje muy similar a la frecuencia encontrada en el estudio del Hospital Infantil de Morelia, lo cual probablemente refleja que los hospitales de Colombia son similares en nuestro país y Latinoamérica.

K. variicola se aisló en un 13% en el laboratorio del hospital, mientras que otros autores Rodríguez-Medina y col³⁷ señalaron que en el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en Cuernavaca presenta 24.4% en la incidencia de esta especie, lo que representa casi el doble de la incidencia obtenida en nuestro estudio, quizá se deba a que en el INSP la muestra incluyo varias unidades hospitalarias.

Se encontró un total de 51% de cepas resistentes de *K. pneumoniae* y un 45% de resistencia en *K. variicola*, autores como Martínez-Romero y col²⁴ describen en su investigación que de sus cepas estudiadas un 95% correspondían al genoma de *K. variicola* sin especificar el porcentaje de resistencia, pero al considerar que identifican el genoma de *K. variicola* es de suponerse que también corresponda a una mayor resistencia.

K. variicola se aisló en un 48% en muestras de hemocultivos en pacientes lactantes de nuestro hospital, en la literatura no se encontraron otros resultados sobre el tipo de aislamientos que nos permitieran hacer una comparación, sin embargo, consideramos que el mayor porcentaje de hemocultivos con *K. variicola* se puede explicar porque en el Hospital Infantil es el tipo de muestra biológica que más se estudia en el laboratorio de microbiología y parasitología.

El análisis estadístico sobre la resistencia usando el método de la Chi cuadrada de Pearson nos dio como resultado para las BLEEs $X^2= 0.52$, quinolonas $X^2=14.31$, aminoglucosidos $X^2=1.37$, sulfonamidas $X^2=6.75$, carbapenemasas $X^2=0.18$ lo que nos indica que los grupos quinolonas y sulfonamidas tiene una $P>0.05$, probando que estos 2 grupos de antibióticos son significativos para *K. variicola* por que presentan mayor resistencia principalmente en neonatos y lactantes, lo que sugiere que *K. variicola* y *K. pneumoniae* pueden compartir mecanismos de resistencia como lo son las bombas de reflujo y la alteración del sitio blanco, refiriendo a que estos mecanismos en particular son los usados para combatir el antibiótico.

El presente estudio confirmó la presencia de una de las especies del género *Klebsiella* en nuestras muestras obtenidas (*K. variicola*), el cual no se puede diferenciar con los clásicos métodos bioquímicos por su parecido fenotípico, con anterioridad esta bacteria se encontraba principalmente colonizando las plantas y algunas fuentes ambientales, hasta que estudios comprobaron que también provocaba fitonosis.

11 CONCLUSIONES

El Hospital Infantil de Morelia presenta una incidencia del 28% en *Klebsiella spp*, donde las principales especies son *K. pneumoniae*, *K. variicola*, *K. oxytoca*, *K. ozanae* y *K. aerogenes*.

3 de cada 5 cepas de *Klebsiella spp* presenta resistencia a algún grupo antibiótico.

Se identificó un 13% de *K. variicola* resistente a los antimicrobianos, predomina en lactantes y neonatos, la mayor parte de esta bacteria es identificada en los hemocultivos.

El análisis estadístico sobre la resistencia demostró el cumplimiento de la hipótesis alternativa que indica que de las especies obtenidas con mayor frecuencia en el Hospital Infantil de Morelia son *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *K. variicola*, a posteriori es rechazada la hipótesis nula dado que *K. variicola* tiene resistencia a mayor grupo de antibióticos, mostrando una diferencia significativa a los grupo de antibióticos quinolonas y sulfonamidas, siendo un gran reto en el tratamiento de los pacientes al tener menos opciones para tratar a la bacteria.

12 SUGERENCIAS

Establecer en el laboratorio de microbiología y parasitología del Hospital Infantil de Morelia métodos para identificar el genotipo de *Klebsiella*, que pueda identificar a *K. variicola*, determinar su sensibilidad antimicrobiana y así llegar a un mejor tratamiento.

Desarrollar una línea de investigación sobre *Klebsiella* en el Hospital Infantil de Morelia.

CAPÍTULO 8

13 REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Brooks G, Carrol K, Butel J, Morse S, Mietzner T. JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG Microbiología Médica. 1ª edición. Mc Graw-Hill Editorial. México DF. 2004; 41-44.
2. Prats G. Microbiología clínica. Panamericana. 2006; 17-22.
3. Murray R. Microbiología médica. 7ª edición. ELSEVIER; 2019; 130-148.
4. Allen S, Janda W, Koneman W, Procop G, Winn W, & Woods G. Koneman Diagnostico Microbiológico. 6ª edición. Panamericana. 2006; 640-759.
5. Munita J. & Arias C. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiology Spectrum. 2015; 1-24.
6. Basualdo J, Coto C, y de Torres R. Microbiología biomédica. 2ª edición. Editorial atlante s.r.l. Buenos aires. 2006; 324-345.
7. Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A., Criscuolo A. and Brisse S. Description of *Klebsiella africanensis* sp. nov., *Klebsiella variicola* subsp. *tropicalensis* subsp. nov. and *Klebsiella variicola* subsp. *variicola* subsp. nov. Research in Microbiology. 2019; 165-170.
8. Long W, Linson E, Ojeda M, Cantú C, Davis J, Brettin T, and Olsen R. Whole-Genome Sequencing of Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates Reveals Misidentification and Misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. American Society For Microbiology. 2017(2); 1-15
9. Martínez-Romero E, Rodríguez-Medina N, Beltrán-Rojel M, Toribio-Jiménez J. y Garza-Ramos U. *Klebsiella variicola* and *Klebsiella quasipneumoniae* with capacity to adapt to clinical and plant settings. Rev Salud pública de México. 2018; 29-40
10. Rodríguez-Medina N, Barrios-Camacho H, Duran-Bedolla J and Garza Ramos U. *Klebsiella variicola*: an emerging pathogen in humans. Emerging Microbes & Infections. 2019; 973-987.
11. Barrios-Chamacho H, Aguilar-Berra A, Beltrán-Rojel N, Aguilar-Vera E, Duran-Bedolla J, Rodríguez-Medina N, Lozano-Aguirre L, Pérez-Carrascal O, Rojas J, and Garza-Ramos U. Molecular epidemiology of *Klebsiella variicola* obtained from different sources. Scientific Reports. 2019; 1-10

12. Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, and Brisse S. *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and Related Phylogroups by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Frontier in Microbiology*. 2018 (9); 1-7.
13. Feng Y, McNally A, and Zong Z. Occurrence of colistin-resistant hypervirulent *Klebsiella variicola*. *Jornal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018; 1-4.
14. Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 11ª edición. McGraw-Hill interamericana; 2007, p 1905- 1173.
15. Flóres J., Armijo JA., Mediavilla A. *Farmacología humana*. 6ª edición. ELSEVIER MASSON; 2014. p 945-1027.
16. Martínez JL. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2014; 11: 33-39.
17. Arzanlou M., Chain W. & Venter H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays in Biochemistry*. 2017; 61(1): 49-59.
18. Vignoli R, y Gales A. Mecanismos de resistencia a los antibióticos. *Microbiología clínica: desde el laboratorio al manejo del paciente*. 2019; 34-42.
19. Ophelie C. & Molin M. Detección Fenotípica de Carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* en Pacientes que acudieron al Hospital de Clínicas San Lorenzo de febrero a julio 2013. *Mem Inst investig Cienc Salud*. 2016; 14(1): 25-31
20. Morejón M. Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*. 2013; 52(4): 272-280.
21. Bush K. Past and Present Perspectives on Betalactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018; 62(10): 10-18.
22. Rozwandowics M., Brouwer M., Fischer J., Wagenaar J., Gonzalez-Zorn B. & Guerra B. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 2018; 73(5): 1121-1137.
23. Abarca G. y Herrera ML. Betalactamasas: su importancia en clínica y su detección en el laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*. 2009; 36(1): 75-95.
24. Miller S. & Humphries RM. Clinical laboratory detection of carbapenem-resistant and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2016; 18(48).

25. Trecarichi EM. & Tumbarello M. Therapeutic options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Virulence*. 2017; 8(4): 470-484.
26. Olaitan AO., Morand S. & Rolan JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2014; 5 (643): 1-18.
27. Malchione ML., Torres LM., Hartley D., Koch M & Goodman J. Carbapenem and colistin resistance in Enterobacteriaceae in Southeast Asia: Review and mapping of emerging and overlapping challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2019; 54: 381-399.
28. Logan K. & Weinstein R. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *Infections Diseases Society of America*. 2017; 215(1): 28-36.
29. Oteo J., Bou G., Chaves F. y Oliver A. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multiresistentes. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016; x(x)1-9.
30. Xia J., Gao J. & Tang W. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. *BioScience Trends*. 2016; 10(1): 14-21.
31. Hernández-Gómez C., Blanco VM., Motoa G., Correa A., Maya JJ., de la Cadena E. y Perenguez M. Evolución de la resistencia antimicrobiana en bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica, Revista del Instituto Nacional de Salud*. 2014; 34(1): 91-100.
32. Maldonado NA., Munera MI., López JA., Sierra P., Robledo C. y Robledo J. Tendencias de la resistencia a antibióticos en Medellín y en los municipios del área metropolitana entre 2007 y 2012: resultados de seis años de vigilancia. *Revista del Instituto Nacional de Salud*. 2014; 34: 433-446.
33. Badamchi A., Khatabadi R., Naghadalipoor M., Reza M., Tabatabaie A. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients admitted to a third-level hospital in Tehran, Iran. *Curr Pediatr Res*. 2018; 22(3); 258-262.
34. Navarro F., Calvo J., Cantón R., Fernández-Cuenca F. y Mirelis B. Detección fenotípica de resistencia en microorganismos Gram negativos. *Enferm Infecc y Microbiol Clin*. 2011; 29(7): 524-234.
35. Martínez D. Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2009; 29: 78-83.

36. Disktejn Y., Lellouche J., Swachtz D., Nutman A., Rakovitsky N. & Dishon Y. Colistin Resistance Development Following Colistin-Meropenem Combination Therapy vs. Colistin Monotherapy in Patients with Infections Caused by Carbapenem-Resistant Organisms. Oxford University Press; Infectious Diseases Society of America. 2019.
37. Santisteban Y., Carmona Y., Pérez Y., Díaz L., García S. y Kobayashi N. Infecciones por los géneros *Klebsiella* y *Acinetobacter* en hospitales pediátricos cubanos y resistencia antibiótica. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2014; 66(3): 400-414.
38. Jimeno A., Alcalde MM. & Blázquez A. Detección de un brote epidémico por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de metalo-beta-lactamasa. *Revista Clínica Española*. 2011; 4: 187-191.
39. Cercenado E. Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio. *Rev Esp Quimioter*. 2015; 28(1): 8-11.
40. Valenza G. Multiresistente gramnegative Stäbchenbakterien auf der Intensivstation. *Medizinische Klinik - Intensivmedizin Und Notfallmedizin*. 2019; 1-12.
41. Cavalieri S. y col. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Editora coordinadora. Seattle Washington. 2002; 3-15.
42. Universidad de Alicante. [Internet] ESPECTOMETRIA DE MASAS (MALDI-TOF).2019. [Consultado el 22 de marzo del 2020] Disponible en: <https://sstti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-genomica-y-proteomica/espectrometria-de-masas-maldi-tof.html>