

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS**

**AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y DEL AMBIENTE HOSPITALARIO  
DE *Klebsiella pneumoniae* COMO RESERVORIO DE  
GENES DE RESISTENCIA A CARBAPENÉMICOS**

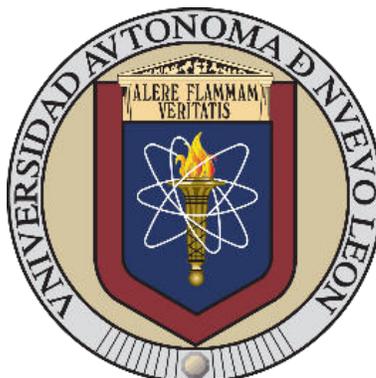
**PRESENTADA POR:**

**Q.B.P. ANA MARÍA ABIGAIL FLORES MUÑOZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

**ABRIL 2025**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y DEL AMBIENTE HOSPITALARIO  
DE *Klebsiella pneumoniae* COMO RESERVORIO DE GENES DE  
RESISTENCIA A CARBAPENÉMICOS**

**Por:**

**Q.B.P. ANA MARÍA ABIGAIL FLORES MUÑOZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia**

**Lugar de Realización del Proyecto:**

**Laboratorio de Biotecnología I, Facultad de Ciencias Químicas,**

**UANL.**

**Laboratorio Microbiología Molecular, Facultad de Medicina,**

**UANL.**

**Abril, 2025**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Ciencias Químicas y al Laboratorio de Biotecnología por abrirme las puertas, también al Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Medicina por su tiempo durante mi estancia. Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por la beca durante la realización de este proyecto. A la Dra. Flora y al Dr. Adrián, por todo lo que me enseñaron sobre Microbiología. A los chicos del servicio social y tesis: a Aurora, Jacob, Ale y Samuel. A mis profesores, la Dra. Lucy, al Dr. Eder, a la Dra. Karla, al Dr. Francisco, a la Dra. Araceli. A mi papá, por ser mi fortaleza; a mi mamá, por sus constantes porras y su apoyo; a mis hermanas por su amor y aliento. A mi abuelita, que sigue preocupándose por mí. A mis primos Laurita, Trejo y Arturo, gracias por darme tantos consejos para sobrevivir en Monterrey. A mis amigos: Cami y Evelin, por los taquitos, elotes, risas, películas; a Gus, quien me enseñó todo sobre los Tigres, me ha acompañado y apoyado, ¿cuál es tu profesión?; a Quique, por los bailes y el beis; a Aldo, por todas sus recomendaciones y apoyo, fueron mi SOS posgrado. Gracias a los integrantes del Laboratorio de Química Industrial por recibirme. A mi amiga Alo, siempre cercana, aunque lejos. A mis compadres David y Diana, a mi ahijado José David, a su hermana Eva Sofía. Gracias a mi roomie Erika, a Jorge por su apoyo, así como a mis compañeros de UVM: Alice, Angie, Francis, Antonio, Ana, Marina, Jessi, Neft, Andy, Lucio. Finalmente agradezco infinitamente a la comunidad de la parroquia de Ntra. Señora del Rosario en San Nicolás por acogerme con tanto cariño. Gracias al Padre Alfredo, a Lety y su esposo Miguel Ángel, a Sara, a mis tíos Carmen, Daniel, Cinthia y Adrián y a toda su familia. También a la hna. Juanita, por su especial acompañamiento. Los quiero muchísimo, no hubiera podido lograrlo sin el apoyo de cada uno de ustedes.

“Todo viene de Dios y todo ha de volver a Él”

**Rom 11, 36**

## RESUMEN

**Q.B.P. Ana María Abigail Flores Muñoz**      **Fecha de graduación: Abril, 2025**  
**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
**Facultad de Ciencias Químicas**

**Título del estudio: AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y DEL AMBIENTE  
HOSPITALARIO DE *Klebsiella pneumoniae* COMO RESERVORIO DE  
GENES DE RESISTENCIA A CARBAPENÉMICOS.**

**Número de páginas: 56**

**Candidata para el grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con  
orientación en Farmacia**

### **Propósito y método de estudio**

Este estudio incluyó aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* obtenidos de muestras de sangre, orina y líquido cefalorraquídeo de 39 pacientes hospitalizados. Asimismo, se analizaron 54 aislamientos recuperados del ambiente hospitalario, los cuales se recolectaron de superficies corporales (fosas nasales, pliegue retroauricular, superficies palmares, y pliegue antecubital) de pacientes, familiares de pacientes, y personal de enfermería, así como de superficies cercanas a la cama del paciente (barandal de cama y mesa) y dispositivos médicos insertados en pacientes (sonda urinaria, catéter venoso central). La identificación de los aislamientos se confirmó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se determinó su perfil de susceptibilidad mediante la técnica de microdilución en caldo. Los antibióticos evaluados fueron: cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacino, levofloxacino, aztreonam, trimetoprima/sulfametoxazol, meropenem, imipenem, gentamicina, amikacina y tazobactam/piperacilina. Adicionalmente, se evaluó la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido ( $\beta$ LEE) mediante la técnica de doble disco, así como la producción de biopelículas mediante el método de cristal violeta. Se realizó la detección de carbapenemasas a través de métodos fenotípicos (Carba NP e inactivación de carbapenémicos) y genotípicos (PCR), con el objetivo de identificar los genes: *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> y *bla*<sub>OXA-48</sub>. Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de conjugación bacteriana para determinar su capacidad de transferencia de genes de resistencia.

### **Contribuciones y conclusiones**

Los hallazgos obtenidos destacan la relevancia clínica de *K. pneumoniae* como un patógeno de alta prevalencia en entornos hospitalarios, capaz de persistir en el ambiente hospitalario. Se observó una tendencia hacia la multirresistencia, con más del 50 % de resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacino y cefalosporinas de tercera generación en ambos grupos de aislamientos. Además, más del 60 % de los aislamientos son productores de  $\beta$ LEE, lo que agrega dificultad en el tratamiento. La detección del gen *bla*<sub>NDM</sub>, en 11 aislamientos

resalta la importancia de la vigilancia genotípica para identificar genes de resistencia bacteriana. Aunque los ensayos de conjugación no evidenciaron transferencia horizontal de genes *in vitro*, se demostró una capacidad de formación biopelículas, especialmente en los aislamientos clínicos. Esta característica contribuye a la resistencia antimicrobiana y facilita la persistencia de estas cepas en los pacientes. En conjunto estos hallazgos resaltan la importancia de implementar medidas de control y estrategias de vigilancia en los hospitales, para prevenir la diseminación de estas cepas resistentes.

---

Dra. Flora Eduarda Cruz López  
Directora de tesis

---

Dr. Julio Adrián Martínez Meléndez  
Co-director de tesis

## TABLA DE CONTENIDO

<b>3.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1.	<b>Infecciones asociadas a la atención de la salud</b> .....	1
1.2.	<b>Características microbiológicas e importancia clínica de <i>K. pneumoniae</i></b> 2	
<b>4.</b>	<b>Factores de virulencia asociados a <i>K. pneumoniae</i></b> .....	<b>3</b>
1.3.1.	<b>Cápsula</b> .....	3
1.3.2.	<b>Fimbrias</b> .....	4
1.3.3.	<b>Lipopolisacáridos</b> .....	4
1.3.4.	<b>Sideróforos</b> .....	4
1.3.5.	<b>Biopelícula</b> .....	5
1.4.	<b>Farmacorresistencia en <i>K. pneumoniae</i></b> .....	6
1.5	<b>Opciones terapéuticas</b> .....	7
1.6	<b>Mecanismos de resistencia a antimicrobianos</b> .....	9
1.6.1	<b>Transferencia de genes asociados a resistencia</b> .....	13
<b>5.</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>16</b>
<b>6.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>7.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
4.1	<b>Objetivo general</b> .....	20
4.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	20
4.2.1	Identificar aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario de <i>K. pneumoniae</i> a nivel especie .....	20
4.2.2	Evaluar el perfil de susceptibilidad a diferentes agentes antimicrobianos en aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario de <i>K. pneumoniae</i> .....	20
4.2.3	Determinar la presencia de genes de resistencia a carbapenémicos en aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario de <i>K. pneumoniae</i> .....	20
4.2.4	Determinar la capacidad de los aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario de <i>K. pneumoniae</i> para producir biopelícula.....	20
4.2.5	Determinar la capacidad de los aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario de <i>K. pneumoniae</i> para transferir genes asociados a resistencia a carbapenémicos. ....	20
<b>8.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
5.1	<b>Obtención de aislamientos</b> .....	<b>21</b>
5.2	<b>Obtención de DNA por lisis térmica</b> .....	21
5.3	<b>Identificación de los aislamientos</b> .....	22

5.4 Pruebas de susceptibilidad .....	22
5.4.1 Dilución en caldo.....	22
5.4.2 Preparación del inóculo .....	23
5.4.3 Preparación del panel de antibióticos.....	23
5.5 Determinación de producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) .....	25
5.6 Determinación de la producción de carbapenemasas .....	25
5.6.1 Prueba Carba NP .....	25
5.6.2 Prueba de inactivación de carbapenémicos .....	26
5.6.3 Identificación de genes de carbapenemasas .....	26
5.7 Determinación de la producción de biopelícula .....	27
5.7.1 Preparación del inóculo .....	27
5.7.2 Microplaca.....	28
5.8 Extracción de plásmidos.....	28
5.9 Detección de genes de carbapenemasa en plásmidos.....	29
5.10 Transferencia de genes de resistencia .....	29
5.11 Análisis estadístico .....	30
5.12 Disposición de residuos.....	30
<b>9. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
6.1 Identificación de los aislamientos a nivel especie.....	31
6.2 Determinación del perfil de susceptibilidad.....	31
6.3 Detección de los genes <i>bla</i> <sub>NDM</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC</sub> y <i>bla</i> <sub>OXA48</sub> .....	33
6.4 Producción de biopelícula .....	33
6.5 Transferencia de genes de resistencia.....	35
6.6 Análisis estadístico.....	35
<b>10. DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
<b>11. CONCLUSIONES .....</b>	<b>41</b>
<b>12. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>42</b>
<b>13. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>43</b>
<b>14. APÉNDICE A.....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los $\beta$ -lactámicos creado utilizando MolView ( <a href="http://www.molview.org">www.molview.org</a> )	8
Figura 2. Estructura de los carbapenémicos (Lima et al., 2020).	12
Figura 3. Panel de antibióticos para aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> .	24
Figura 4. Perfil de susceptibilidad de aislamientos.	32
Figura 5 Producción de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en aislamientos.	32
Figura 6 Producción de carbapenemasas en aislamientos.	33

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de Ambler de $\beta$ -lactamasas.....	9
Tabla 2. Clasificación de Bush de $\beta$ -lactamasas.....	10
Tabla 3. Familias $\beta$ LEE.....	11
Tabla 4. Cebadores para la identificación de <i>K. pneumoniae</i> .....	22
Tabla 5. Cebadores para la identificación de genes de resistencia a carbapenémicos. 27	
Tabla 6. Producción de biopelícula en aislamientos .....	33
Tabla 7. Perfil de resistencia aislamientos portadores de NDM .....	34
Tabla 8. Prueba chi-cuadrada. ....	36

## NOMENCLATURA

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración mínima inhibitoria
g	Gravedades
mg	Miligramos
min	Min
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
UV	Ultravioleta
V	Voltios
µg	Microgramos
µL	Microlitros

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 1.1. Infecciones asociadas a la atención de la salud

Las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) son aquellas infecciones que desarrollan los pacientes después de su ingreso a una unidad de salud o durante la atención médica dentro de la misma (Masoudifar et al., 2021). Estas infecciones destacan como uno de los problemas de salud más relevantes a nivel mundial, ya que desencadenan una hospitalización prolongada, aumentando hasta diez días la estancia de los pacientes, lo cual eleva los costos dentro del sistema de salud (Facciola A et al., 2019; Masoudifar et al., 2021). El Centro para el Control y la Prevención de enfermedades (CDC) estima que cada año se gastan aproximadamente de 5 a 6 billones de dólares en Estados Unidos en el tratamiento de las IAAS (Murphy & Clegg, 2012). Entre los factores de riesgo que favorecen el desarrollo de IAAS encontramos: comorbilidades en el paciente como diabetes o enfermedades cardiovasculares, inmunosupresión, la virulencia del patógeno, la resistencia a los antibióticos del agente causal, la presencia de dispositivos invasivos como catéteres o el haber sido sometido a algún procedimiento quirúrgico (Blot et al., 2022; Facciola A et al., 2019; Mazzeffi et al., 2021). Por otro lado, hasta el 30 % de las IAAS se originan por medio del contacto directo o indirecto entre pacientes, profesionales de la salud, objetos contaminados y familiares de los pacientes (Bhalla et al., 2004).

Dentro de los principales agentes causales de IAAS encontramos a las bacterias del grupo “ESKAPE” (Masoudifar et al., 2021); ESKAPE es el acrónimo de: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. Este acrónimo se debe a que las bacterias dentro de este grupo logran “escapar” al tratamiento antimicrobiano convencional (Stojowska-swędrzyńska et al., 2022). Dentro de estas especies, las que destacan y se aíslan con mayor frecuencia como agentes causales de IAAS son: *A. baumannii* con una frecuencia del 15.8 %, *P. aeruginosa* en un 14.3 %, *S. aureus* con un 14.2%, y *K. pneumoniae* con un 11.3 % (Llaca-Díaz et al., 2013).

Los miembros del grupo ESKAPE se caracterizan porque cuentan con distintos mecanismos que los hace resistentes a diversos agentes antimicrobianos; además, poseen virulencia elevada, ya que pueden evadir el sistema inmune del hospedero y presentar ciertas características como la producción de toxinas, la formación de biopelícula, entre otras. Lo anterior no solo dificulta la recuperación del paciente, sino que se relaciona directamente con una alta mortalidad en los pacientes infectados debido a la limitada eficacia de los tratamientos disponibles (Santajit & Indrawattana, 2016).

Por otro lado, se ha comprobado que los miembros del grupo ESKAPE son capaces de persistir en superficies inanimadas, como puertas, barandales de cama, mesas de pacientes, etc., durante semanas o meses, lo que contribuye a la transmisión y diseminación de estos agentes patógenos, ya que el hospital actúa como un importante reservorio y contribuye en la diseminación y transmisión entre pacientes (Facciola A et al., 2019).

## **1.2. Características microbiológicas e importancia clínica de *K. pneumoniae***

Uno de los miembros destacados del grupo ESKAPE es *K. pneumoniae*, una bacteria gramnegativa, miembro de la familia de las Enterobacterias, con forma de bastón, encapsulada e inmóvil (Foroohimanjili et al., 2020). Reside en la microbiota intestinal de mamíferos, así como en reservorios del medio ambiente, como agua, suelo y plantas (Barati et al., 2016; Shadkam et al., 2021). *K. pneumoniae* es un patógeno oportunista; es decir, es un microorganismo con baja virulencia que llega a causar una infección cuando el sistema inmunológico del huésped se encuentra comprometido (Guerra et al., 2022).

*K. pneumoniae* es un agente causal de IAAS, causa hasta el 66 % de las infecciones en vías urinarias, en vías respiratorias inferiores un 15 %, en tejidos blandos un 10 % y sepsis (Barati et al., 2016; Martin & Bachman, 2018; Shadkam et al., 2021). En Estados Unidos, *K. pneumoniae* es el tercer agente causal de IAAS, con una incidencia del 9.9 % (Martin & Bachman, 2018). En América Latina, la incidencia de infecciones causadas por *K. pneumoniae* varía: en Brasil y en

Venezuela es del 13 %; en México del 11 % y en Colombia del 23 % (Barati et al., 2016; Huerta-Gutiérrez et al., 2019; D. Yang & Zhang, 2008).

#### **4. Factores de virulencia asociados a *K. pneumoniae***

*K. pneumoniae* cuenta con componentes estructurales que provocan daños en el hospedero y contribuyen al establecimiento de una infección. Entre los factores de virulencia que destacan encontramos cápsula, fimbrias, lipopolisacáridos (LPS), sideróforos y la formación de biopelícula (Foroohimanjili et al., 2020).

##### **1.3.1. Cápsula**

La cápsula es una estructura que envuelve las células bacterianas, generalmente está compuesta de polisacáridos. Esta estructura le confiere una protección que impide el reconocimiento por parte del sistema inmunológico del hospedero, ayudándole a evadir la fagocitosis por parte de los macrófagos y neutrófilos (Clegg & Murphy, 2016).

Existen más de 78 tipos de antígenos capsulares (o serotipos) en *K. pneumoniae*, cada uno con una composición distinta de monosacáridos. Esta versatilidad antigénica permite evadir la respuesta inmune adaptativa del hospedero. Por ejemplo, la cápsula del serotipo K1 está relacionada con cepas hipervirulentas y se ha asociado con infecciones más complicadas como bacteriemias, neumonías e infecciones del tracto urinario. Además, debido a la composición de algunos polisacáridos como los del serotipo K50 (di-manosa y ramnosa) o K53 (D-ácido glucurónico, D-galactosa, D-manosa), pueden contribuir en la capacidad de la bacteria para sobrevivir en ambientes con pocos nutrientes (Clegg & Murphy, 2016; Wyres et al., 2020).

Por otro lado, la cápsula contribuye en las fases iniciales de la formación de biopelícula, como la adherencia y maduración en la superficie. Así mismo, los polisacáridos capsulares de *K. pneumoniae* pueden inhibir el crecimiento de otras bacterias en un mismo entorno, lo que le proporciona una ventaja selectiva a *K. pneumoniae* (Guerra et al., 2022).

### **1.3.2. Fimbrias**

Las fimbrias son estructuras que sobresalen de la membrana bacteriana y actúan como adhesinas, ayudándoles a permanecer tanto en superficies inanimadas (catéteres o dispositivos médicos) como en superficies bióticas (células epiteliales del hospedero) (Guerra et al., 2022). *K. pneumoniae* expresa principalmente dos tipos de fimbrias: tipo 1 y tipo 3. Las fimbrias tipo 1 son fundamentales en la adherencia inicial a receptores celulares del hospedero que contienen manosa, lo cual les confiere la capacidad de establecerse en las superficies epiteliales, como las del tracto respiratorio o urinario, colaborando con la colonización y formación de biopelículas. Estas estructuras son especialmente necesarias en las comunidades bacterianas intracelulares (Guerra et al., 2022). Mientras que las fimbrias tipo 3 están relacionadas en la formación madura de las biopelículas (Guerra et al., 2022; D. Yang & Zhang, 2008).

### **1.3.3. Lipopolisacáridos**

El lipopolisacárido (LPS), es un componente esencial de la membrana externa en las bacterias gramnegativas, incluida *K. pneumoniae*. El LPS tiene un papel fundamental en la virulencia de la bacteria, ya que es capaz de inducir la respuesta inflamatoria del sistema inmunológico, a través de los receptores tipo Toll, lo cual puede llevar a sepsis (Guerra et al., 2022). Además, el LPS tiene un rol en la formación de biopelículas, al promover la adhesión de las bacterias a diversas superficies, ya que se ha descrito que las cepas mutantes que carecen de LPS tienen deficiencia en la formación de biopelícula. Por otra parte, la diversidad estructural en los oligosacáridos que conforman al LPS también permiten evadir la detección por anticuerpos específicos (Clegg & Murphy, 2016).

### **1.3.4. Sideróforos**

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular que *K. pneumoniae* utiliza para captar iones de hierro del ambiente en el que se encuentre. El hierro es un nutriente de importancia para el metabolismo y supervivencia de la bacteria. Dentro del cuerpo humano el hierro se encuentra en baja concentración, por lo que la producción de sideróforos es de vital importancia como factor de virulencia

en las bacterias. Los sideróforos compiten contra proteínas como la lactoferrina y la transferrina, que son proteínas de unión al hierro (Clegg & Murphy, 2016). *K. pneumoniae* produce varios tipos de sideróforos, entre ellos: enterobactina, yersiniabactina, salmochelina y aerobactina; cada uno cuenta con diferente afinidad de unión del hierro (Wyres et al., 2020). La yersiniabactina y la aerobactina están relacionadas con cepas hipervirulentas y son necesarias para el desarrollo de las infecciones (Clegg & Murphy, 2016; Martin & Bachman, 2018).

### **1.3.5. Biopelícula**

Las biopelículas son una matriz estructural compleja, compuesta de exopolisacáridos de origen bacteriano, formada por polisacáridos, proteínas, DNA y nutrientes, dentro de las cuales residen bacterias (Clegg & Murphy, 2016; Singh et al., 2019). La capacidad de formar biopelículas es de gran importancia, ya que contribuye en la persistencia enfermedad en el huésped debido a que protegen a los microorganismos de la acción del sistema inmunológico y de los antibióticos, convirtiéndose en más difíciles de erradicar (Barati et al., 2016; Singh et al., 2019).

La formación de la biopelícula involucra varias etapas: adhesión, formación de microcolonias, el desarrollo de la matriz de biopelícula y por último la liberación de células bacterianas planctónicas de la matriz. Durante la adhesión, las bacterias se fijan sobre superficies de dispositivos médicos como catéteres o sondas, o en tejidos epiteliales como los que recubren las vías urinarias o el tracto respiratorio (Vuotto et al., 2017). Una vez adheridas, comienzan a multiplicarse y a formar pequeños grupos denominados microcolonias, las cuales secretan proteínas y exopolisacáridos, lo que proporcionará un soporte estructural y la comunicación entre bacterias, dando lugar a la liberación de bacterias que se encuentran en estado libre y no adheridas, conocidas como células planctónicas (Murphy & Clegg, 2012).

Los microorganismos dentro de las biopelículas interactúan a través de señales químicas y crean una estructura protectora que les permite sobrevivir en condiciones adversas. Esta estructura facilita su adherencia en piel, tejidos

blandos, pulmones, vejiga, así como en superficies inanimadas, volviéndose difícil de remover y aumentando su capacidad de supervivencia y resistencia a agentes antimicrobianos (Lam et al., 2021a; Singh et al., 2019; Vuotto et al., 2017). En superficies inertes comunes en el ambiente hospitalario, p. ej., en catéteres o sondas, las biopelículas representan un desafío importante debido a la presión selectiva generada por el uso de antibióticos, lo cual incrementa la resistencia y dificulta aún más la terapia (Shadkam et al., 2021). Además, el lento crecimiento de las bacterias en estado de latencia dentro de la matriz de la biopelícula crea un ambiente que también aumenta la resistencia a los antibióticos, gracias a la interacción entre células dentro de la matriz, ya que pueden transferir elementos genéticos asociados a la resistencia. Además, las proteínas de unión a los antibióticos se expresan en menor cantidad que en las células bacterianas planctónicas (Murphy & Clegg, 2012).

#### **1.4. Farmacorresistencia en *K. pneumoniae***

El aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos es considerado un problema mundial que amenaza a la salud. Esta problemática va en aumento y tiene como consecuencias: estancias hospitalarias más largas para los pacientes, mayor costo médico, mayor mortalidad y reduce las opciones de tratamientos en enfermedades infecciosas (Magiorakos et al., 2012).

Las infecciones causadas por bacterias resistentes a los fármacos poseen un pronóstico severo para los pacientes (Jia et al., 2019). Se calcula que más de un millón de personas al año, contraen infecciones causadas por bacterias resistentes; en América Latina y en Estados Unidos se atribuyen 900,000 muertes a esta causa, y en Europa, 25,000 muertes al año (Sievert et al., 2013).

Este panorama es preocupante en el caso de patógenos como *K. pneumoniae*, cuyo tratamiento se encuentra cada vez más limitado debido a la resistencia a múltiples fármacos. En 2021, en un hospital de tercer nivel en Guadalajara, México, se reportó una elevada resistencia en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* recuperados de sangre a varios grupos de antibióticos, incluyendo fluoroquinolonas (ciprofloxacino 18 %), aminoglucósidos (gentamicina 55 %),

sulfonamidas (56 %), monobactámicos (59 %), y a cefalosporinas de 3ra (ceftriaxona 60 %) y 4ta generación (cefepima 56 %) (Toledano-Tableros et al., 2021).

Por ello, es importante fomentar en el entorno hospitalario una vigilancia epidemiológica activa, así como la prevención y el control del uso de los antibióticos (Larcher et al., 2022). Estas medidas permiten identificar bacterias farmacorresistentes y aplicar medidas que reduzcan su diseminación, además de controlar el uso de antibióticos para prevenir el desarrollo de nuevas cepas resistentes.

### **1.5 Opciones terapéuticas**

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son los antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas, representando el 65 % de las prescripciones de antibióticos intravenosos en Estados Unidos de América. Los  $\beta$ -lactámicos son el principal grupo de antibióticos empleado en el tratamiento de infecciones por enterobacterias (Larcher et al., 2022). Es una clase de antibióticos eficaz, con buena tolerancia en los pacientes, aunque se registran reacciones alérgicas en un pequeño porcentaje de pacientes como principal efecto adverso (Bush & Bradford, 2016).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son una clase de fármacos bactericidas que se caracterizan por tener un anillo  $\beta$ -lactámico en su estructura. La conformación de los  $\beta$ -lactámicos consiste en un anillo de cuatro miembros fusionado a un segundo anillo, y su nombre se debe a que el átomo de nitrógeno está unido al carbono  $\beta$  (Gerald & Gerald, 1988).

La clase de los  $\beta$ -lactámicos se divide en penicilinas, monobactámicos, cefalosporinas y carbapenémicos (Lima et al., 2020). En las penicilinas, el anillo  $\beta$ -lactámico se une a un anillo de cinco miembros que contiene azufre, mientras que en la estructura de las cefalosporinas encontramos un anillo de seis miembros unido igualmente a un azufre; en los monobactámicos, no se encuentra un anillo secundario ligado al  $\beta$ -lactama, y en los carbapenémicos, un anillo de cinco carbonos se une al anillo  $\beta$ -lactámico (Figura 1).

La estructura conservada que comparten los antibióticos  $\beta$ -lactámicos es similar a la conformación química del dipéptido D-Ala-D-Ala (Figura 1). Este dipéptido participa en la formación de cadenas del peptidoglicano, que es el principal componente de la pared celular de las bacterias. El peptidoglicano está compuesto por carbohidratos que se repiten de manera alternada: N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. El mecanismo de acción de los  $\beta$ -lactámicos consiste en inhibir la formación del peptidoglicano, al unirse covalentemente a unas proteínas de membrana denominadas PBP (*penicillin binding protein*), que son enzimas transpeptidasas y carboxilasas esenciales en la fase terminal del ensamblaje de la pared celular (Gerald & Gerald, 1988; Kim et al., 2023). La inhibición de la actividad enzimática de la transpeptidación en las PBP debilita la pared celular, propiciando que la bacteria se lise (Fresnadillo Martínez et al., 2010a).

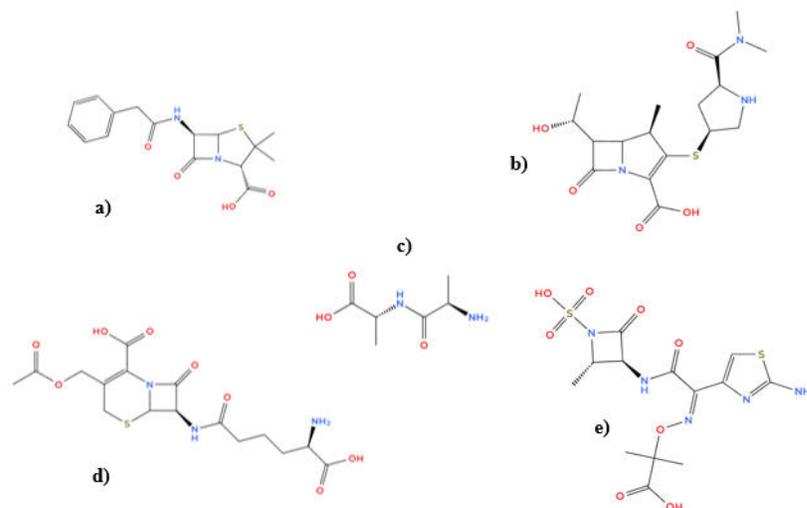


Figura 1. Estructura de los  $\beta$ -lactámicos creado utilizando MolView ([www.molview.org](http://www.molview.org))

a) penicilinas, b) carbapenémicos, c) D-Ala-D-Ala, d) cefalosporinas, e) monobactámicos.

## 1.6 Mecanismos de resistencia a antimicrobianos

La resistencia bacteriana a numerosos fármacos antimicrobianos, incluidos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, representa un problema clínico en aumento, que pone en peligro la eficacia de los tratamientos, en particular, los aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a los  $\beta$ -lactámicos. Dichos aislamientos pueden presentar uno o varios mecanismos de resistencia, como la alteración en las PBP, sobreexpresión de bombas eflujo, disminución en la permeabilidad de la membrana externa o enzimas hidrolíticas (Shadkam et al., 2021). De los mecanismos de resistencia mencionados, la acumulación de genes que codifican enzimas hidrolíticas es el más común entre las Enterobacterias (Navon-Venezia et al., 2017).

Entre las enzimas hidrolíticas más frecuentes encontramos a las  $\beta$ -lactamasas, enzimas capaces de romper el anillo  $\beta$ -lactámico, formando un metabolito incapaz de unirse a las PBP y de ejercer su actividad bactericida (Vachvanichsanong et al., 2020). Las  $\beta$ -lactamasas se clasifican en dos esquemas (21): el de Ambler, y el de Bush. El esquema de Ambler es el más difundido y se basa en la similitud de aminoácidos (Tabla 1), dividiéndolas en clase A, B, C y D (Codjoe & Donkor, 2017). El esquema de Bush (Bush & Bradford, 2016) se basa en la inhibición de la actividad de las  $\beta$ -lactamasas por diferentes compuestos como el ácido clavulánico, el EDTA u oxacilina; se definen cuatro grupos basándose en los sustratos hidrolizados y los perfiles de inhibición (Tabla 2).

Tabla 1. Clasificación de Ambler de  $\beta$ -lactamasas

Grupo		Ejemplos
<b>A</b>	Serincarbapenemasas	<i>bla</i> <sub>CTX</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>GES</sub>
<b>B</b>	Metalo- $\beta$ -lactamasas	<i>bla</i> <sub>NDM</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP</sub>
<b>C</b>	Cefalosporinasas	AmpC
<b>D</b>	Oxacilinasas	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-24</sub>

Tabla 2. Clasificación de Bush de  $\beta$ -lactamasas

Grupo	Actividad	Ejemplos
1	Cefalosporinas que no son inhibidas por el ácido clavulánico.	CTX
2	Penicilinas, cefalosporinas y carbapenemasas que son inhibidas por inhibidores de $\beta$ -lactamasas.	TEM-3 SHV
3	Metalo- $\beta$ -lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenemasas que son inhibidas por EDTA.	CcrA
4	Penicilinas que no son inhibidas por el ácido clavulánico.	Penicillinasas

Dentro del grupo de las serincarbapenemasas se encuentran las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido ( $\beta$ LEE). Las cepas productoras de  $\beta$ LEE son resistentes a penicilinas, cefalosporinas (primera, segunda y tercera generación) y monobactámicos (Chaïbi et al., 2023). Estas enzimas son codificadas por genes que se agrupan en varias familias (Tabla 3

), algunas de estas familias están muy relacionadas, como las tipo TEM y SHV. Por otro lado, las  $\beta$ -lactamasas de la familia CTX-M presentan una mayor diversidad genética en comparación con las familias TEM y SHV (Castanheira et al., 2021), lo cual les confiere versatilidad para actuar frente a diferentes antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Esta diversidad se debe a la presencia de múltiples variantes, lo que permite que distintas enzimas dentro de cada grupo tengan afinidad por una gama distinta de antibioticos y confieran resistencia frente a ellos.

Tabla 3. Familias  $\beta$ LEE

Familia	Nomenclatura
<b>TEM</b>	Temoneira
<b>SHV</b>	Sulfhydryl reagent variable
<b>CTX-M</b>	Cefotaxime-hydrolysing B-lactamase isolated in Munich
<b>GES</b>	Guiana-extended spectrum

Los carbapenémicos son una de las clases con mayor relevancia de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Presentan espectro contra bacterias gramnegativas y grampositivas y son resistentes a la hidrólisis por la mayoría de las  $\beta$ -lactamasas (Lima et al., 2020).

Los carbapenémicos son de las últimas opciones de antibióticos para tratar las infecciones ocasionadas por enterobacterias productoras de  $\beta$ LEEs (Navon-Venezia et al., 2017). Una de las diferencias entre los carbapenémicos y las penicilinas es que en su estructura presentan un átomo de carbono en la posición 1, en lugar de un azufre, lo cual les otorga una protección contra la mayoría de las  $\beta$ -lactamasas (Codjoe & Donkor, 2017; Fresnadillo Martínez et al., 2010b) (Figura 2). Los carbapenémicos mayormente utilizados en la clínica son el meropenem, imipenem y ertapenem (Potter et al., 2016) (Figura 2).

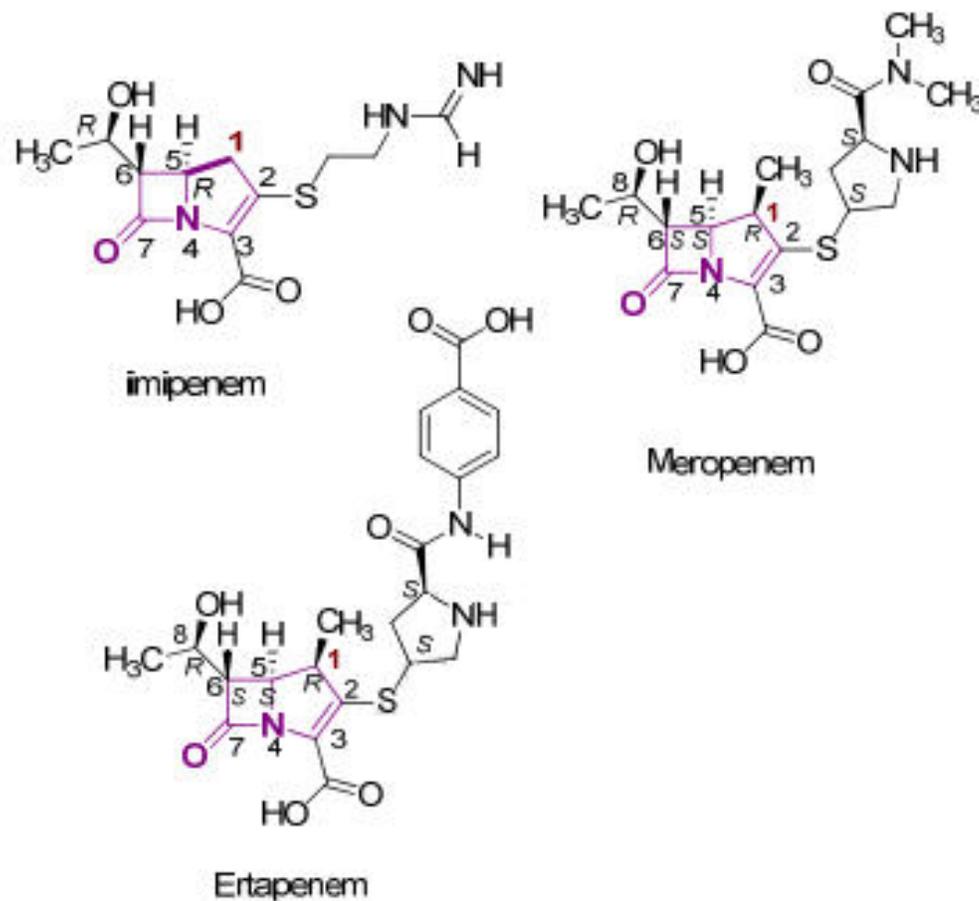


Figura 2. Estructura de los carbapenémicos (Lima et al., 2020).

*K. pneumoniae* se ha convertido en la principal enterobacteria resistente a carbapenémicos con elevada diseminación por todo el mundo, lo cual representa una amenaza significativa para la salud (Navon-Venezia et al., 2017). Se ha reportado que la resistencia a los carbapenémicos en aislamientos de *K. pneumoniae* alcanza el 62 % en Grecia, el 50 % en Estados Unidos, y el 20 % en México (Garza-González et al., 2021; Logan & Weinstein, 2017).

Uno de los mecanismos involucrados en el desarrollo de resistencia a los carbapenémicos se debe a la inactivación enzimática por carbapenemasas. Las carbapenemasas son la familia más versátil de las  $\beta$ -lactamasas, ya que hidrolizan a la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo a los carbapenémicos (Halat & Moubareck, 2022). Se encuentran distribuidas en los diferentes grupos de la clasificación de Ambler de las  $\beta$ -lactamasas (Bush &

Bradford, 2016) (Tabla 1). Dentro de la clase A, se incluyen a las carbapenemasas que tienen un residuo de serina como la KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasa). En la clase B encontramos a las metalo- $\beta$ -lactamasas, como la IMP (Imipenemasa), VIM (Verona Integron Metalo- $\beta$ -lactamasa) y NDM (New Delhi Metalo- $\beta$ -lactamasa); dichas enzimas son inhibidas por el EDTA ya que requieren de dos iones de zinc en su sitio catalítico para su actividad. Las carbapenemasas de clase D son las oxacilinasas, y presentan diferentes variantes, numeradas por su descubrimiento, donde la OXA-48 es la que destaca entre las enterobacterias (Chaïbi et al., 2023).

La presencia de las carbapenemasas limita las opciones terapéuticas a la colistina y la tigeciclina (Lam et al., 2021b). Sin embargo, la resistencia a la colistina ha aumentado en *K. pneumoniae* debido a la presencia de genes *mrc* asociados a plásmidos, y se han encontrado en cepas que además portan el gen *bla<sub>NDM</sub>* (Al Naiemi et al., 2005).

### **1.6.1 Transferencia de genes asociados a resistencia**

El genoma de *K. pneumoniae* contiene genes de resistencia a los antibióticos que se han adquirido por medio de plásmidos y elementos genéticos transferibles, lo cual deriva en la aparición de cepas multidrogasresistentes (MDR) (X. Yang et al., 2021).

Los genes de resistencia se pueden encontrar dentro de transposones; los cuales son fragmentos de DNA que tienen la capacidad de moverse dentro del genoma de una célula, y que pueden llevar genes de resistencia e integrarse a su vez dentro de plásmidos. Los plásmidos son moléculas de DNA circular de doble cadena autorreplicativo, que confieren características adicionales a las cepas que lo portan, incluyendo resistencia a fármacos (Actis et al., 1999; Chen et al., 2014; Sánchez-B Esp et al., 2012). Aunque los plásmidos no son esenciales para las bacterias, les confieren la capacidad de sobrevivir en condiciones adversas, como la presencia de antibióticos en el medio o les confiere la habilidad para competir contra otros microorganismos. Por otro lado, el intercambio de genes también puede ocurrir por medio de integrones, los cuales son capaces de

capturar y expresar genes de resistencia; sin embargo, no se mueven por sí mismos y suelen estar en transposones o plásmidos (Sánchez-B Esp et al., 2012).

La adquisición de nuevos genes de resistencia dentro de plásmidos a través de transposones o secuencias de inserción, y la capacidad que tienen para replicarse, convierte a las bacterias en reservorios para la propagación de estos mismos genes (Rozwandowicz et al., 2018). Existen diferentes tipos de plásmidos: a) los integrativos, que tienen la capacidad de introducirse en el cromosoma, y b) los conjugativos, que portan genes que codifican *pili* y cuya función es la transferencia de plásmidos de bacteria a bacteria (Sánchez-B Esp et al., 2012). Los plásmidos conjugativos son los principales responsables de la difusión de genes que codifican la resistencia a los antibióticos. La resistencia a carbapenémicos puede ser difundida entre aislamientos de *K. pneumoniae* a través de plásmidos (Pecora et al., 2015). Los plásmidos que se encuentran en mayor frecuencia entre las enterobacterias son los IncA/C, IncFIA, IncFIB, IncFII, IncX3, los cuales se han asociado a la expresión de genes de BLEE y carbapenemasas (Toledano-Tableros et al., 2021b).

Una de las carbapenemasas que se reporta con mayor frecuencia, identificada en *K. pneumoniae* es la NDM, la cual se disemina principalmente en el ambiente hospitalario. La enzima NDM, identificada por primera vez en 2007, ha alcanzado una diseminación mundial con abundantes reportes de Asia y Europa y ha sido poco común entre las enterobacterias en América; sin embargo, en México, la primera detección de NDM en *Klebsiella* fue descrita en 2014 (Garza-González et al., 2021). Desde su primer reporte en el país, esta carbapenemasa se ha propagado, siendo el gen *bla*<sub>NDM-1</sub> el detectado con mayor frecuencia actualmente. La propagación de aislamientos productores de NDM es un tema de preocupación global, debido a su amplia y rápida distribución. La prevalencia de la carbapenemasa NDM-1 es ahora más común que la KPC (Toledano-Tableros et al., 2021b). Acorde al estudio de Bocanegra y colaboradores en el año 2017, el gen *bla*<sub>NDM</sub> se detectó en 48 de 52 aislamientos clínicos (92.3 %)

pertenecientes a *K. pneumoniae*, mientras que el gen *bla*<sub>KPC</sub> en un solo aislamiento clínico, dentro de un hospital de tercer nivel en México (Bocanegra-Ibarias et al., 2017).

## 5. ANTECEDENTES

*K. pneumoniae* es uno de los patógenos de mayor importancia a nivel hospitalario debido a su frecuencia como agente causal de IAAS. Esto se destaca en un estudio del Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC), realizado en Polonia, donde *K. pneumoniae* fue el agente causal predominante de IAAS, con una frecuencia del 16.3 %. Los aislamientos se obtuvieron de pacientes con infecciones en el torrente sanguíneo, vías urinarias, tracto respiratorio inferior e infecciones intraabdominales (Rafa et al., 2021). De manera similar, en un estudio dentro de un hospital de tercer nivel en México realizado por Cruz López y colaboradores en 2017 (Cruz-López et al., 2020), *K. pneumoniae* fue reportada como el segundo agente causal de IAAS, con una prevalencia del 29 %. Los aislamientos se recuperaron de muestras de sangre, secreciones de heridas quirúrgicas y lavados bronquioalveolares. Además, se recuperaron 2868 aislamientos a partir de superficies de contacto cercanas a los pacientes, como barandales de cama, mesas; de dispositivos médicos insertados en pacientes, así como de superficies corporales de pacientes, enfermeros y familiares de pacientes. De los cuales el 3.1 % se identificaron como *K. pneumoniae*, resaltando su capacidad de colonización en diversas áreas del entorno hospitalario, mediante técnicas de identificación.

Además de ser uno de los patógenos con mayor incidencia en IAAS, *K. pneumoniae* muestra altos niveles de resistencia a varios antibióticos de uso hospitalario. Un estudio en el Hospital Civil de Guadalajara reportó 80 aislamientos de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes con bacteriemia. En estos casos, se observó una elevada resistencia a aztreonam (59 %), cefepime (56 %), ceftriaxona (60 %), colistina (54 %), y carbapenémicos (12.5 %).

La capacidad de *K. pneumoniae* para desarrollar resistencia a múltiples antibióticos ha aumentado considerablemente, en gran medida por la producción de enzimas capaces de hidrolizar antibióticos, como las  $\beta$ -lactamasas y carbapenemasas, lo que representa un desafío significativo en los tratamientos.

Esta tendencia es notoria en un estudio de 2021 realizado en el Hospital Universitario de Soba, Sudán (Elbadawi et al., 2021), donde se reportó el aislamiento de 191 bacilos productores de carbapenemasas; de estos, el 76 % (63/82) fueron identificados como *K. pneumoniae*, 42 % (19/45) como *P. aeruginosa*, *A. baumannii* 50 % (18/36), y *E. coli* 42 % (12/28). En este estudio, el gen *bla*<sub>NDM</sub> destacó principalmente en *K. pneumoniae*, presente en el 88.4 % (56/63) de sus aislamientos. Estos resultados subrayan la necesidad de investigar la distribución de los genes de resistencia portadores de enzimas carbapenemasas entre los aislamientos resistentes a carbapenémicos en bacterias gramnegativas, especialmente en *K. pneumoniae*, debido a su alta capacidad de diseminación.

La presencia de genes de resistencia como *bla*<sub>NDM</sub> en *K. pneumoniae* destaca el riesgo de brotes de cepas multirresistentes en entornos hospitalarios. Un brote de *K. pneumoniae* ST307 presentó características de resistencia a múltiples fármacos, alta producción de sideróforos, y portador de plásmidos con genes NDM, CTX-M y OXA-48. Esta cepa fue identificada en cuatro hospitales de Alemania entre junio y octubre del 2019 por medio de una secuenciación del genoma completo (Heiden et al., 2020). Durante este brote se analizaron 56 aislamientos de enterobacterias, de los cuales 52 correspondieron a *K. pneumoniae*, obtenidos de muestras clínicas como hisopados rectales y secreciones traqueales.

La capacidad de transferencia horizontal de genes de resistencia es un mecanismo clave en la diseminación de genes de resistencia en *K. pneumoniae*. En un estudio realizado en el Hospital Civil de Guadalajara, México (Toledano-Tableros et al., 2021) se detectó la presencia del gen *bla*<sub>NDM-1</sub> en 80 aislamientos de origen clínico, recuperados de pacientes con bacteriemia. Los resultados mostraron que el gen *bla*<sub>NDM-1</sub> se encontraba dentro de plásmidos conjugativos. Mediante ensayos de conjugación, se demostró la transferencia del gen *bla*<sub>NDM-1</sub> hacia otras bacterias, destacando la capacidad de diseminación de estas cepas.

*Klebsiella pneumoniae* persiste durante periodos prolongados en superficies del ambiente hospitalario y es un agente causal frecuente de IAAS. Adicionalmente, ha desarrollado resistencia a los carbapenémicos por medio de mecanismos enzimáticos codificados por elementos genéticos transmisibles, por lo que es importante analizar la capacidad de propagación de genes asociados a resistencia entre aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario.

## 6. HIPÓTESIS

Los aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario de *K. pneumoniae* actúan y como reservorios de genes de resistencia a carbapenémicos, y presentan características que favorecen su persistencia en el ambiente hospitalario, como la formación de biopelícula.

## 7. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Determinar el papel de *Klebisella pneumoniae* como reservorio de genes asociados a resistencia a carbapenémicos en aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario.

### 4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Identificar aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario de *K. pneumoniae* a nivel especie.

4.2.2 Evaluar el perfil de susceptibilidad a diferentes agentes antimicrobianos en aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario de *K. pneumoniae*.

4.2.3 Determinar la presencia de genes de resistencia a carbapenémicos en aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario de *K. pneumoniae*.

4.2.4 Determinar la capacidad de los aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario de *K. pneumoniae* para producir biopelícula.

4.2.5 Determinar la capacidad de los aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario de *K. pneumoniae* para transferir genes asociados a resistencia a carbapenémicos.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología ubicado en el Centro de Laboratorios Especializados, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y en el Laboratorio de Microbiología Molecular, en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### 5.1 Obtención de aislamientos

En este trabajo se incluyeron 54 aislamientos recuperados de superficies del ambiente hospitalario y 39 aislamientos de muestras clínicas de pacientes de dos salas de cuidados intermedios del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”, en Guadalajara, México.

Los aislamientos de superficies del ambiente hospitalario se obtuvieron de un trabajo previo (Cruz-López et al., 2021) que analizó superficies corporales (fosas antecubitales fosas nasales, pliegues retroauriculares y superficies palmares) de enfermeras, de pacientes, de familiares de pacientes, de dispositivos médicos insertados en los pacientes (catéter venoso central, tubos de ventilación mecánica y catéter urinario) y de lugares cercanos a la cama de pacientes (mesas y barandales de cama). Dichos aislamientos se recuperaron durante el periodo del 10 de abril al 8 de mayo de 2017 y fueron identificados mediante espectrometría de masas asociado a detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF).

Los aislamientos clínicos (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.) fueron obtenidos de pacientes internados en las salas de cuidados intermedios del mismo hospital en el periodo del 2015 al 2016, previamente identificados como *Klebsiella pneumoniae* por MALDI-TOF.

Los protocolos empleados para la recolección de los aislamientos fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación con número de registro 118/17.

### 5.2 Obtención de DNA por lisis térmica

A partir de un cultivo puro incubado a 37° C por 18 h de *K. pneumoniae* en agar sangre, se tomó una colonia y fue suspendida en 50 µL de agua HPLC estéril en

un tubo eppendorf de 1.5 mL, se agitó en vórtex y se calentó a 95°C por 15 min. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue colocado en un tubo eppendorf de 0.6 mL para ser congelado hasta su utilización.

### 5.3 Identificación de los aislamientos

Se realizó una PCR de identificación utilizando los cebadores y las condiciones descritas previamente (Garza-Ramos et al., 2015). La PCR amplificó regiones específicas del gen de la transferasa (RmlA) de *K. pneumoniae*. La reacción de PCR utilizó 3 µL del DNA obtenido por lisis térmica en 25 µL de mezcla de reacción compuesta por: 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato, buffer 1X, 3 µM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µM de cada oligonucleótido (Tabla 4) y 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen™).

Tabla 4. Cebadores para la identificación de *K. pneumoniae*

Cebadores	Secuencia (5'→3')	Producto (pb)
KP888-F	AAGCAAGCCAGAACAGAAAG	888
KP888-R	ACTTCGGTTTTATCCAGGTC	

Para la amplificación se llevó a cabo un paso inicial de desnaturalización (94°C, 4 min); 35 ciclos de: desnaturalización (94°C, 1 min), alineamiento (58°C, 1 min), y extensión (70°C, 70 s); y un paso final de elongación a 72°C por 5 min.

Los productos obtenidos fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % con TBE 0.5 X, previa tinción con Red Gel 1X. Se empleó un marcador de 100-1,000 pb (Invitrogen™). El gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm. Como control se utilizó la cepa ATCC 70063 de *K. pneumoniae*.

### 5.4 Pruebas de susceptibilidad

#### 5.4.1 Dilución en caldo

Se determinó el perfil de susceptibilidad a los aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario por el método de microdilución en caldo siguiendo las indicaciones

del documento M07 y los puntos de corte del documento M100 del Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

#### **5.4.2 Preparación del inóculo**

A partir de un cultivo puro incubado a 37°C por 18 h, se tomaron colonias aisladas y se suspendieron en un tubo con solución salina, hasta alcanzar una absorbancia de 0.8 a 0.13 a 625 nm. A partir del inóculo ajustado, se preparó una dilución 1:150 en caldo Müller-Hinton estéril.

#### **5.4.3 Preparación del panel de antibióticos**

Para cada aislamiento, se determinó la concentración mínima inhibitoria para los antibióticos: amikacina (AMK), aztreonam (ATM), ciprofloxacino (CIP), gentamicina (GEN), imipenem (IMP), levofloxacino (LVX), meropenem (MEM), piperacilina/tazobactam (TZP), trimetoprim/sulfametoxazol (SXT). Se preparó un panel de antibióticos realizando diluciones seriadas 1:2 de los antibióticos en placas estériles de 96 pocillos. Para lo anterior, se añadieron 100 µL de caldo Müller-Hinton en todos los pocillos de la placa, y en la primera columna se añadieron 100 µL del stock de antibiótico a 4X de la concentración más alta requerida. A partir del primer pocillo, se transfirieron 100 µL al pocillo inmediato, y se repitió hasta completar las filas. Se descartaron los 100 µL del último pocillo, dejando un volumen final por pocillo de 100 µL.

En el panel se incluyó un pocillo con caldo sin antibiótico, como control positivo de crecimiento, y un pocillo con caldo sin inóculo, como control negativo. Las concentraciones finales de cada antibiótico se muestran en la Figura 2. Las placas se inocularon 18 h. Posteriormente, se incubaron a 37°C durante 18-20 h. Se determinó la CMI de los aislamientos visualizando si había crecimiento en el pocillo de cada antibiótico.

El control de calidad de las pruebas de susceptibilidad por dilución en caldo se realizó empleando las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Para la interpretación de los resultados se utilizaron los puntos de corte establecidos por el CLSI en el documento M100.

	AMK	ATM	CIP	GEN	IMP	LVX	MEME	TZP	SXT	10	11	Control
<b>A</b>	64	64	4	32	16	8	16	16/304	128/16			<b>ATCC</b>
<b>B</b>	32	32	2	16	8	4	8	8/152	64/8			
<b>C</b>	16	16	1	8	4	2	4	4/76	32/4			
<b>D</b>	8	8	0.5	4	2	1	2	-	16/4			
<b>E</b>	4	4	0.25	2	1	0.5	1	2/38	8/4			
<b>F</b>	2	2	0.125	1	0.5	0.25	0.5	1/19	4/2			
<b>G</b>	1	1	0.06	0.5	0.25	0.125	0.25	0.5/9.5	2/1			
<b>H</b>	0.5	0.5	0.03	0.25	0.125	0.06	0.125	0.25/4.75	1/0.5			

Figura 3. Panel de antibióticos para aislamientos de *K. pneumoniae*.

Concentración en µg/mL. AMK: Amikacina, ATM: Aztreonam, CIP: Ciprofloxacino, GEN: Gentamicina, IMP: Imipenem, LVX: Levofloxacino, MEM: Meropenem, TZP: Piperacilina/Tazobactam, SXT: Sulfametoxazol/Trimetoprim.

## **5.5 Determinación de producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)**

Se realizó la determinación de BLEE a los aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario por medio del método de difusión en disco siguiendo las indicaciones del CLSI en el documento M02. A partir de un cultivo puro incubado a 37°C por 18 h, se tomaron colonias aisladas y se suspendieron en un tubo de solución salina hasta alcanzar una absorbancia de 0.8 a 0.13 a 625 nm.

A partir de este inóculo, se dispensó sobre una placa de agar Müller Hinton con un hisopo estéril y se colocaron los sensidiscos de cefotaxima (CXT), cefotaxima-ácido clavulánico (CXT/CLA), ceftazidima (CAZ) y ceftazidima-ácido clavulánico, a una distancia de 24 mm entre discos. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 18 h.

Se midieron los halos de inhibición y los aislamientos con un incremento de 5 mm o más en el diámetro del halo de inhibición en presencia del antibiótico con ácido clavulánico fueron considerados como productores de BLEE. La cepa ATCC *K. pneumoniae* 700603 se utilizó como control positivo.

## **5.6 Determinación de la producción de carbapenemasas**

### **5.6.1 Prueba Carba NP**

Se evaluó la producción de carbapenemasas en los aislamientos resistentes a meropenem, mediante la técnica de CarbaNP (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing., 2023). A partir de un cultivo puro incubado a 37°C por 18 h de cada aislamiento, se tomó una colonia para suspenderla en un tubo con 200 µL de solución de lisis, se homogenizó en vórtex y 100 µL se pasaron a otro tubo. Al un tubo se le añadieron 100 µL de solución de trabajo (tubo A), y a otro tubo se le añadieron 100 µL de solución de trabajo con imipenem a una concentración de 6 mg/mL (tubo B). Se homogenizó en vórtex y se incubó a 37°C durante dos h, realizando una lectura cada 30 min. Se consideró un resultado positivo si la solución de trabajo con imipenem viró de rojo a amarillo mientras que si se mantuvo en color rojo se consideró un resultado negativo.

Se utilizó como control de calidad una cepa productora de carbapenemasa NDM (control positivo), y una cepa no productora de carbapenemasa (control negativo), previamente corroboradas por PCR.

### **5.6.2 Prueba de inactivación de carbapenémicos**

Siguiendo las indicaciones del CLSI en el documento M100, se evaluó la producción de carbapenemasas en los aislamientos resistentes a meropenem, mediante la técnica de inactivación de carbapenémicos. Se utilizó una cepa susceptible a meropenem (*E. coli* ATCC 25922). Primero se procedió a preparar un inóculo con cada uno de los aislamientos resistentes a carbapenémicos en un tubo con caldo soya tripticasa, posteriormente se sumergió un disco de meropenem (30 µg) dentro del caldo y se incubó a 35°C por 4 h. Después, se inoculó una placa de agar Müller-Hinton con la cepa *E. coli* ATCC 25922, en la cual se colocó el disco de meropenem previamente utilizado y se incubó por 18-24 h a 37°C.

Para la interpretación se midieron los halos de inhibición, considerando positiva a producción de carbapenemasas si el halo de inhibición medía de 6 a 15 mm, y negativa a producción de carbapenemasas si el halo de inhibición era mayor a 19 mm.

### **5.6.3 Identificación de genes de carbapenemasas**

Para identificar genes de resistencia a carbapenémicos en los aislamientos, realizó una PCR multiplex para los genes *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, y una PCR punto final para los genes *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, y *bla*<sub>OXA-48</sub> de manera independiente, utilizando los cebadores y las condiciones descritas por Poirel y colaboradores (Poirel et al., 2011).

La reacción de PCR utilizó 1.5 µL del DNA obtenido por lisis térmica en 25 µL de mezcla de reacción compuesta por: 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato, buffer 1X, 3 µM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µM de cada oligonucleótido (Tabla 5) y 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen™).

Tabla 5. Cebadores para la identificación de genes de resistencia a carbapenémicos

Cebadores	Secuencia (5→3')	Producto (pb)	Especificidad
<b>IMP-F</b>	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>
<b>IMP-R</b>	GGTTTAAAYAAAACAACCACC		
<b>VIM-F</b>	GATGGTGTTTGGTTCGCATA	390	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>
<b>VIM-R</b>	CGAATGCGCAGCACCAG		
<b>OXA-F</b>	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
<b>OXA-R</b>	CATCAAGTTCAACCCAACCG		
<b>NDM-F</b>	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>
<b>NDM-R</b>	CGGAATGGCTCATCACGATC		
<b>KPC-F</b>	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>
<b>KPC-R</b>	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG		

Para la amplificación se llevó a cabo un paso inicial de desnaturalización (94°C, 10 min); 36 ciclos de: desnaturalización (94°C, 30 s), alineamiento (54°C, 40 s), y extensión (72°C, 1 min); y un paso final de elongación a 72°C por 5 min.

Los productos obtenidos fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % con TBE 0.5X, previa tinción con Red Gel 1X. Se empleó un marcador de 100-1,000 pb (Invitrogen™). El gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm. Como controles se utilizaron cepas portadoras de estos genes previamente identificadas.

## 5.7 Determinación de la producción de biopelícula

### 5.7.1 Preparación del inóculo

A partir de un cultivo puro incubado a 37°C por 18 h en agar sangre, se tomaron colonias aisladas y se suspendieron en un tubo de solución salina, hasta alcanzar una absorbancia de 0.257 a 625 nm.

### **5.7.2 Microplaca**

La evaluación de la producción de biopelícula en los aislamientos se determinó mediante tinción con cristal violeta. Se preparó un inóculo con cada uno de los aislamientos en un tubo con medio líquido infusión cerebro corazón (BHI), después se suplementó con glucosa al 1 %. Posteriormente en una placa de micro titulación se inocularon 3 pocillos con 200  $\mu$ L cada uno por aislamiento; además, se inocularon 3 pocillos con caldo BHI estéril como blanco.

Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C. Después de la incubación se decantó el caldo de los pocillos y se realizaron tres lavados con 200  $\mu$ L de buffer de fosfatos (PBS) estéril. La placa se dejó secar y se procedió a teñir con 200  $\mu$ L de cristal violeta al 0.01 % durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados con 200  $\mu$ L de PBS estéril. Posteriormente, el cristal violeta fue disuelto con ácido acético al 33 % durante 60 min. Finalmente, se determinó la densidad óptica a 595 nm en un lector de microplacas Cytation 5 (BIOTek Instruments, Inc).

Para clasificar a los aislamientos según su capacidad de formar biopelículas, se realizó un análisis estadístico de la densidad óptica (OD). Se calculó un valor crítico de OD (ODc) sumando el promedio de las OD del blanco más tres veces su desviación estándar. Con base en este resultado, los aislamientos se clasificaron en cuatro grupos: aquellos con un OD menor que ODc se consideraron no productores de biopelícula; los que presentaron un OD entre ODc y 2ODc se clasificaron como productores débiles; los que tuvieron un OD entre 2ODc y 4ODc se catalogaron como productores moderados; y aquellos con un OD mayor a 4ODc se consideraron productores fuertes de biopelícula.

### **5.8 Extracción de plásmidos**

Se realizó siguiendo las indicaciones del Monarch Plasmid Miniprep Kit Protocol (NEW ENGLAND, BioLabs, Inc): Se activaron los aislamientos a evaluar en agar sangre a 37°C durante 18 h. Después se preparó un inóculo en tubos de caldo Luria Bertani (LB) y se incubaron a 37°C durante 12 – 16 h. Después se obtuvo

un pellet con 1.5 mL del caldo mediante centrifugación durante 30 s. Para resuspender el pellet se añadieron 200 µL del Buffer 1 y posteriormente se añadieron 200 µL del Buffer 2 para lisar las células y se dejó incubar durante 1 min. Para neutralizar el lisado y detener la reacción, se añadieron 400 µL del Buffer 3 y se dejó incubar durante 2 min. Se centrifugó por 4 min a 16,000 xg. El sobrenadante se transfirió a la columna y se centrifugó durante 1 min. Se agregaron 200 µL de Buffer de lavado uno y se centrifugó durante 1 min. Después se lavó con 400 µL del Buffer de lavado 2 y se centrifugó durante 1 min. La columna se colocó en un tubo estéril de 1.5 mL, y se agregaron 35 µL del Buffer de elución al centro de la columna. Se incubó 1 min, para posteriormente centrifugar durante 1 min y eluir el DNA. El tubo de 1.5 mL con el eluido se conservó a -20°C.

### **5.9 Detección de genes de carbapenemasa en plásmidos**

Con el DNA plasmídico se realizó una PCR punto final con las mismas condiciones establecidas anteriormente por (Poirel et al., 2011) para buscar los genes asociados a resistencia a carbapenémicos encontrados en los aislamientos.

### **5.10 Transferencia de genes de resistencia**

Se clasificaron las cepas en dos grupos: Cepas donadoras, resistentes a carbapenémicas, portadoras del gen *bla<sub>NDM</sub>* en plásmido y susceptibles a algún otro antibiótico. Cepas receptoras, susceptibles a carbapenémicos y resistentes a otro antibiótico. Se activaron las cepas de ambos grupos por separado en agar sangre sin antibióticos a 37°C. Posteriormente, los aislamientos se inocularon en tubos con 2 mL de caldo LB y se dejaron incubando 18 h a 37°C. Después de la incubación, los tubos se ajustaron a la escala del tubo 5 de McFarland, y en un tubo de 1.5 mL se inocularon 500 µL de donante y 500 µL de receptora; se centrifugó el tubo a 500 g durante 10 min, descartando 800 µL del sobrenadante y se incubó por 18 h a 37°C.

Posteriormente, se agregaron 800 µL de solución salina para suspender la mezcla, y se prepararon diluciones seriadas 1:10 a partir de la solución madre.

Se prepararon previamente placas con meropenem a una concentración de 8 µg/ml, placas con levofloxacino a una concentración de 1 µg/ml y placas con ambos antibióticos en las mismas concentraciones. Para inocular las placas, se tomaron 100 µL de cada dilución y se estriaron en toda la superficie de la placa con estría cerrada, girándola 60° tres veces. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 h. Al día siguiente, se revisó el crecimiento de las cepas en las cajas.

#### **5.11 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de susceptibilidad y de producción de biopelícula fueron analizados con el programa estadístico GraphPad Prism versión 10. Se aplicó el método de chi-cuadrada para comparar la distribución de los aislamientos resistentes y productores de biopelícula con los aislamientos susceptibles y no productores de biopelícula. Para determinar si las diferencias observadas en los grupos eran estadísticamente significativas, se utilizó un valor de significancia de 0,05.

#### **5.12 Disposición de residuos**

La disposición de residuos se realizó con base a lo establecido por: Facultad de Ciencias Químicas UANL; Facultad de Medicina UANL. También siguiendo lo establecido en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental – Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo.

## 9. RESULTADOS

### 6.1 Identificación de los aislamientos a nivel especie

El 82 % de los aislamientos fueron corroborados como *Klebsiella pneumoniae* mediante PCR (77/93). De los cuales, 42 fueron aislamientos del ambiente hospitalario (78 %, 42/54), y 35 aislamientos clínicos (90 %, 35/39).

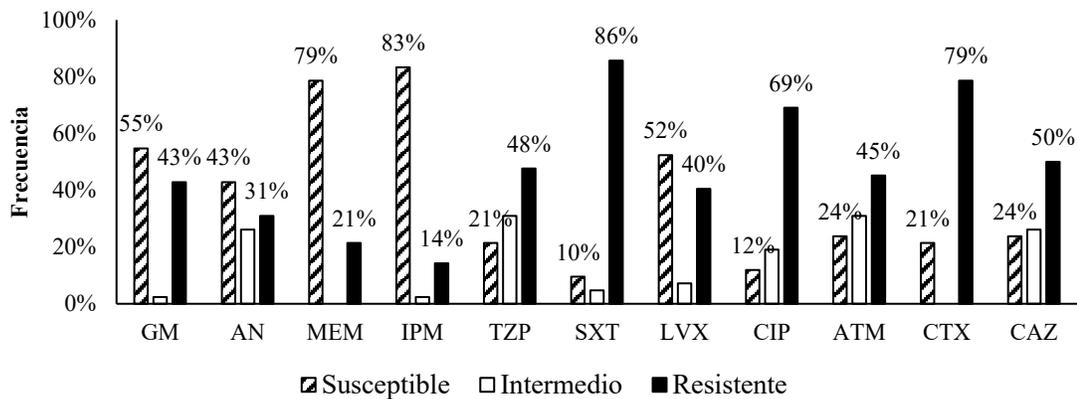
### 6.2 Determinación del perfil de susceptibilidad

Más del 50 % de los aislamientos del ambiente hospitalario fueron resistentes a antibióticos tales como SXT, CTX, CIP y CAZ (Figura 4, inciso a). El 21 % (9/42) de los aislamientos fueron resistentes a MEM y el 60 % (26/42) fueron productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Figura 5). Además, el 17 % (7/42) de los aislamientos fueron productores de carbapenemasas, según el método de inactivación de carbapenémicos y la técnica de CarbaNP (Figura 6).

Por otro lado, en los aislamientos clínicos se observó resistencia superior al 50 % a CTX, CIP, gentamicina (GEN), y aztreonam (ATM) y una resistencia a MEM del 14 % (5/35) (Figura 4, inciso b). El 74 % (26/35) de los aislamientos fueron productores de BLEE y el 11 % (4/35) fueron productores de carbapenemasas de acuerdo con el método de inactivación de carbapenémicos y la técnica de Carba NP (Figura 6).

a)

### Perfil de susceptibilidad



b)

### Perfil de susceptibilidad

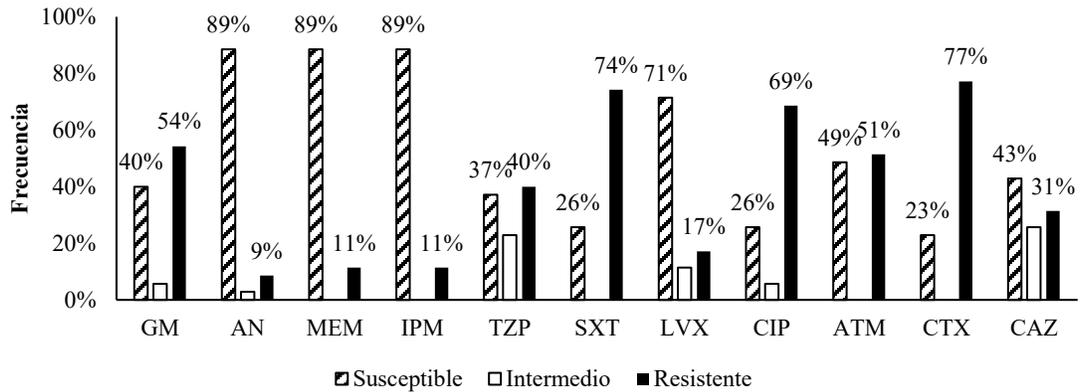
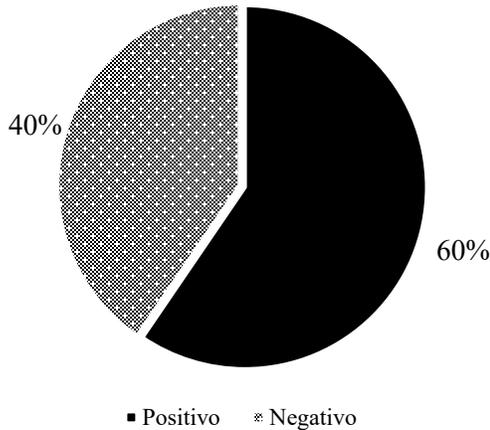


Figura 4. Perfil de susceptibilidad de aislamientos.

a) Aislamientos del ambiente hospitalario; b) Aislamientos clínicos.

Amikacina (AMK), aztreonam (ATM), ciprofloxacino (CIP), gentamicina (GEN), imipenem (IMP), levofloxacino (LVX), meropenem (MEM), piperacilina/tazobactam (TZP), trimetoprim/sulfametoxazol (SXT).

### a) Producción de $\beta$ LEE



### b) Producción de $\beta$ LEE

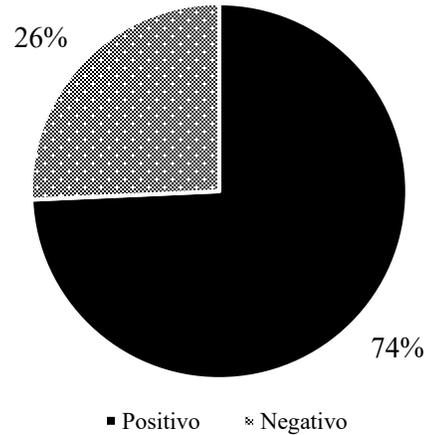


Figura 5. Producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en aislamientos.

a) Aislamientos del ambiente hospitalario; b) Aislamientos clínicos.

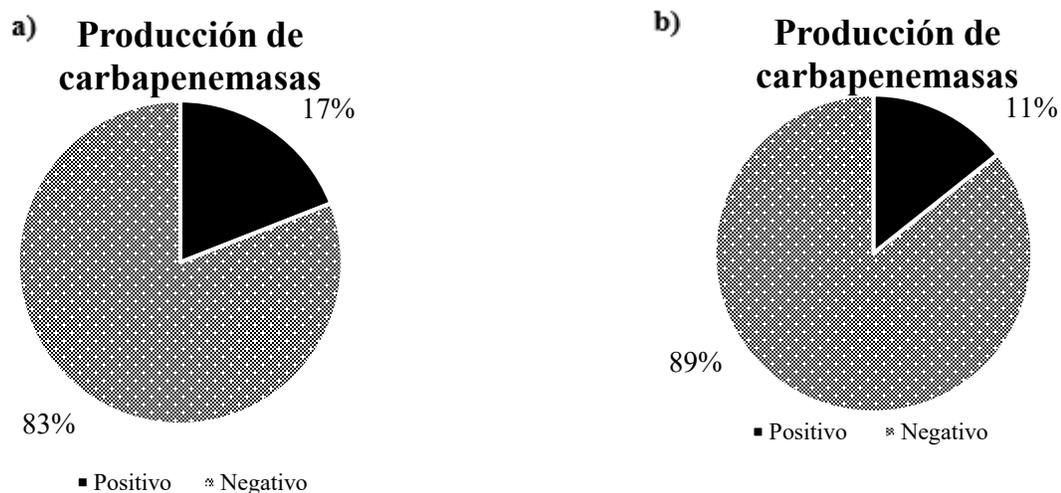


Figura 6. Producción de carbapenemasas en aislamientos.

a) Aislamientos del ambiente hospitalario; b) Aislamientos clínicos

### 6.3 Detección de los genes *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>OXA48</sub>*

En relación con los genes que codifican carbapenemasas, se encontró que todos los aislamientos productores de carbapenemasas portaban el gen *bla<sub>NDM</sub>*. No se detectaron otros genes de carbapenemasas en los aislamientos analizados (Tabla 7).

### 6.4 Producción de biopelícula

Veintiséis de los aislamientos del ambiente hospitalario de *Klebsiella pneumoniae* (62 %) fueron clasificados como productores débiles de biopelícula, mientras que veintitrés aislamientos clínicos (66 %) fueron clasificados como productores moderados de biopelícula (Tabla 6).

Tabla 6. Producción de biopelícula en aislamientos

	a)	b)
<b>No productores</b>	(n = 2), 5 %	(n = 0), 0 %
<b>Productores débiles</b>	(n = 26), 62 %	(n = 10), 29 %
<b>Productores moderados</b>	(n = 13), 31 %	(n = 23), 66 %
<b>Productores fuertes</b>	(n = 1), 2 %	(n = 2), 6 %

a) Aislamientos del ambiente hospitalario; b) Aislamientos clínicos

Tabla 7. Perfil de resistencia aislamientos portadores de NDM

#	Antibióticos											Biopelícula
	GEN	AMK	MEM	IMP	TZP	SXT	LVX	CIP	ATM	CXT	CAZ	a
*916	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PD
*986	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	PM
*985	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	PM
*968	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PM
*940	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PD
*962	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	PD
*981	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	PD
**1907	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PM
**1908	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PM
**1955	R	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	PM
**2260	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	PD

\*Aislamientos del ambiente hospitalario, \*\*Aislamientos clínicos, Amikacina (AMK), Aztreonam (ATM), Ceftazidima (CAZ), Ciprofloxacino (CIP), Cefotaxima (CXT), Gentamicina (GEN), Imipenem (IMP), Levofloxacino (LVX), Meropenem (MEM), Piperacilina/Tazobactam (TZP), Trimetoprim/Sulfametoxazol (SXT), Resistente (R), Susceptible (S), Productor débil (PD), Productor moderado (PM).

## 6.5 Transferencia de genes de resistencia

Se analizaron las placas de la conjugación inoculadas con antibióticos, donde en las placas de mayor concentración no hubo crecimiento, a diferencia de las placas con menor concentración de antibióticos donde crecieron colonias aisladas. Se realizaron de nuevo ensayos de susceptibilidad para identificar las cepas recuperadas, sin embargo, no se obtuvo evidencia de una conjugación exitosa, ya que su perfil de susceptibilidad no cambió.

## 6.6 Análisis estadístico

Se buscó la asociación entre la producción de biopelícula y la resistencia a los antimicrobianos en los aislamientos mediante la prueba de chi cuadrada sin encontrar datos significativos (Tabla 8).

<b>Gentamicina</b>					<b>Tazobactam</b>				
	R	S	Total	P value		R	S	Total	P value
<b>PF</b>	6	8	14	>0.99	<b>PF</b>	12	2	14	>0.99
<b>NP</b>	12	16	28		<b>NP</b>	24	4	28	
<b>Total</b>	18	24	42		<b>Total</b>	38	6	42	
<b>Meropenem</b>					<b>Sulfametoxazol/Trimetroprim</b>				
	R	S	Total	P value		R	S	Total	P value
<b>PF</b>	3	11	14	>0.99	<b>PF</b>	12	2	14	>0.99
<b>NP</b>	6	22	28		<b>NP</b>	24	4	28	
<b>Total</b>	9	33	42		<b>Total</b>	36	6	42	
<b>Imipenem</b>					<b>Levofloxacino</b>				
	R	S	Total	P value		R	S	Total	P value
<b>PF</b>	3	11	14	>0.99	<b>PF</b>	4	10	14	0.3308
<b>NP</b>	6	22	28		<b>NP</b>	13	15	28	
<b>Total</b>	9	33	42		<b>Total</b>	17	25	42	
<b>Ciprofloxacino</b>					<b>Cefotaxima</b>				
	R	S	Total	P value		R	S	Total	P value
<b>PF</b>	9	5	14	0.6369	<b>PF</b>	9	5	14	0.1326
<b>NP</b>	20	8	28		<b>NP</b>	24	4	28	

Total	29	13	42		Total	33	9	42	
Aztreonam					Ceftazidima				
	R	S	Total	P value		R	S	Total	P value
<b>PF</b>	4	10	14	0.1905	<b>PF</b>	5	9	14	>0.99
<b>NP</b>	15	13	28		<b>NP</b>	16	12	28	
<b>Total</b>	19	23	42		<b>Total</b>	21	21	42	

Tabla 8. Prueba chi-cuadrada.

Amikacina (AMK), Aztreonam (ATM), Ceftazidima (CAZ), Ciprofloxacino (CIP), Cefotaxima (CXT), Gentamicina (GEN), Imipenem (IMP), Levofloxacino (LVX), Meropenem (MEM), Piperacilina/Tazobactam (TZP), Trimetroprim/Sulfametoxazol (SXT), Resistente (R), Susceptible (S), Productor fuerte (PF), No Productor (NP).

## 10. DISCUSIÓN

*Klebsiella pneumoniae* se ha destacado como uno de los principales patógenos a nivel hospitalario, debido a un aumento en las tasas de resistencia atribuido a su capacidad para portar genes de resistencia (Wyres & Holt, 2018). Además, la correcta identificación de *K. pneumoniae* es esencial para un diagnóstico preciso y una terapia adecuada, ya que esta bacteria pertenece a un complejo de especies (Lam et al., 2021a). La diferenciación entre especies del complejo de *K. pneumoniae* (KpSC) puede ser complicada debido a la similitud genética entre ellas, sin embargo, es crucial la distinción para comprender mejor su epidemiología y virulencia. Este complejo incluye especies como *K. quasipneumoniae*, *K. variicola* y *K. africana* las cuales comparten genes de virulencia y resistencia a antibióticos (Lam et al., 2021).

En este estudio, se utilizó la técnica de PCR para confirmar la identificación de *K pneumoniae*, con una concordancia del 82 % entre los métodos utilizados, similar a lo reportado por Barrios y colaboradores (Humberto et al., 2022), quienes reportaron un 87 % de concordancia. Esto destaca la importancia de una correcta identificación en el diagnóstico clínico y hospitalario, ya que permite un control de infecciones y una mejor toma de decisiones en cuanto a tratamientos (Ohama et al., 2022).

Por otro lado, en este estudio, se observó un incremento en la frecuencia de cepas resistentes a cefalosporinas en comparación con estudios previos (Alcántar-Curiel et al., 2018). Estos hallazgos coinciden con reportes recientes en México, lo que resalta la necesidad de mantener una vigilancia constante sobre la resistencia a los antibióticos en el país. Esta característica dificulta los tratamientos, especialmente en pacientes hospitalizados, por lo cual es fundamental implementar estrategias dentro de los hospitales para controlar el aumento de las de resistencia.

Estudios como el de Odoyo y colaboradores (Odoyo et al., 2023) identificaron altos niveles de resistencia en aislamientos del ambiente hospitalario, con porcentajes similares a los de este trabajo en resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol (95 %), cefalosporinas de tercera generación (100 %) y meropenem (22 %). En México, Cureño y colaboradores (Cureño-Díaz et al., 2021), informaron una menor resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol (40 %), aunque sus aislamientos provinieron exclusivamente de ventiladores mecánicos, lo que contrasta con la variedad de sitios del ambiente hospitalario recuperados en el presente trabajo. Esto sugiere que la exposición a diferentes entornos puede influir en los niveles de resistencia observados.

Los resultados obtenidos también muestran un aumento en la resistencia a ciprofloxacino, gentamicina y carbapenémicos en comparación con lo reportado por Alcantar y colaboradores (Alcántar-Curiel et al., 2018). Este incremento podría explicarse por la evolución de la resistencia bacteriana, dado que su estudio abarcó aislamientos entre 1999 y 2002. Sin embargo, la resistencia a cefotaxima se ha mantenido estable, lo cual es esperado, ya que los aislamientos de este estudio son posteriores al primer reporte de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en 1983 (Knothe et al., 1983). Por otra parte, los resultados obtenidos por Garza-Ramos y colaboradores (Garza-Ramos et al., 2018) reportaron niveles más bajos de resistencia en aislamientos comunitarios, lo que sugiere una menor exposición a antibióticos en comparación con los aislamientos asociados a la atención de la salud.

Adicionalmente, los aislamientos clínicos de este estudio mostraron una producción de BLEE del 74 %, concordante con el 80 % reportado por Garza-González y colaboradores (Garza-González et al., 2021), ambos estudios realizados en centros hospitalarios dentro de México. Sin embargo, los aislamientos del ambiente hospitalario en este estudio presentaron una proporción superior (60 %) en comparación con el estudio de Xercavins y colaboradores (Xercavins et al., 2020), que reportaron solo un 12.5 % de

producción de BLEE. Esta diferencia podría deberse a que los aislamientos del presente estudio tenían una mayor cercanía al área de contacto del paciente, mientras que en el estudio de Xercavins y colaboradores se recuperaron aislamientos de áreas más lejanos al paciente.

En relación con la producción de carbapenemasas, se detectó entre el 11 % y el 17 % de los aislamientos, coincidiendo con los resultados de Kumar y colaboradores (Kumar et al., 2018). No obstante, otros estudios, como el de Li y colaboradores (Li et al., 2017) informaron hasta un 73 % de producción en aislamientos clínicos, lo que sugiere diferencias entre los criterios de selección de aislamientos. A diferencia de otros estudios, en el presente trabajo se evaluaron tanto a cepas susceptibles como resistentes a carbapenémicos.

Con relación a la formación de biopelícula, los resultados de este estudio mostraron un 23 % de producción moderada, superando ligeramente el 18 % reportado por Bautista y colaboradores (Bautista-Cerón et al., 2022). Ambas investigaciones coinciden en la baja incidencia de una fuerte producción de biopelícula, lo que sugiere que este factor no es predominante en la virulencia de las cepas estudiadas, sin embargo, puede contribuir a una mayor resistencia a los antimicrobianos y a la persistencia en dispositivos médicos (Shadkam et al., 2021). Las biopelículas no solo dificultan el tratamiento antimicrobiano, sino que también permiten intercambio de material genético, incluyendo genes de resistencia. Lo cual remarca la necesidad de estrategias para prevenir la formación de biopelícula en el entorno hospitalario.

La detección del gen *bla*<sub>NDM</sub> en el 14 % de los aislamientos coincide con los informes de la red Invifar, que destacan la presencia de este gen en enterobacterias dentro del ambiente hospitalario en México (Garza-González et al., 2021), otorgando la capacidad de una diseminación horizontal a otras cepas, aumentando el riesgo de brotes hospitalarios de cepas resistentes a carbapenémicos. Sin embargo, bajo las condiciones estudiadas, no hubo

evidencia de transferencia de genes de resistencia mediante los ensayos de conjugación. Uno de los aspectos críticos fue el uso de concentraciones no subinhibitorias. Según estudios previos (Shun-Mei et al., 2018), las concentraciones de antibióticos como las fluoroquinolonas pueden afectar de manera significativa la transferencia de genes, estas concentraciones subinhibitorias no inhiben el crecimiento bacteriano, sino favorecen la transferencia horizontal de plásmidos de resistencia. Adicionalmente, no se incluyó rifampicina en las condiciones experimentales. Este antibiótico juega un papel esencial, ya que tiene un impacto directo tanto en la replicación como en la transferencia del ADN de los plásmidos durante la conjugación (Fenwick & Curtiss III, 1973).

Este estudio presenta algunas limitaciones, como el tamaño de la muestra y la ausencia de secuenciación genómica, lo que restringe la caracterización completa de los plásmidos y genes de resistencia presentes. Sin embargo, los resultados obtenidos de elevadas tasas de resistencia, la combinación de una alta producción de BLEE, la capacidad de formación de biopelículas y la detección de genes de resistencia, aportan información valiosa sobre la prevalencia de cepas multirresistentes en la variedad de aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario, un aspecto poco explorado en estudios dentro de México. Esto subraya la necesidad de implementar métodos de vigilancia epidemiológica en la diseminación de genes de resistencia dentro del ambiente hospitalario.

## 11. CONCLUSIONES

- *K. pneumoniae* presenta elevadas tasas de resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacino y cefalosporinas de tercera generación tanto en aislamientos ambientales como hospitalarios.
- El 60 % de los aislamientos de *K. pneumoniae* son productores de BLEE lo cual limita el tratamiento en infecciones causadas por estas cepas.
- La detección del gen *bla<sub>NDM</sub>* destaca la importancia de la vigilancia genómica y epidemiológica para prevenir brotes de cepas resistentes a carbapenémicos.
- Aunque no se observó transferencia horizontal *in vitro*, la ubicación de este gen en plásmidos representa un riesgo de diseminación en ambientes hospitalarios.

## **12. PERSPECTIVAS**

- Determinar la clonalidad entre las cepas del ambiente hospitalario y las cepas clínicas para establecer la relación genética entre estos aislamientos y su diseminación dentro del hospital, lo que nos permitiría evaluar la transmisión horizontal de genes de resistencia en el entorno hospitalario.
- Realizar la secuenciación completa de los genomas de los aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario para buscar genes de resistencia adicionales a los encontrados, incluyendo los relacionados con la producción de BLEE.
- Determinar la composición de la matriz de las biopelículas de los aislamientos clínicos y del ambiente hospitalario para poder identificar posibles blancos terapéuticos en la erradicación de biopelículas.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Actis, L. A., Tolmasky, M. E., & Crosa, J. H. (1999). BACTERIAL PLASMIDS: REPLICATION OF EXTRACHROMOSOMAL GENETIC ELEMENTS ENCODING RESISTANCE TO ANTIMICROBIAL COMPOUNDS. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 3).
- Al Naiemi, N., Duim, B., Savelkoul, P. H. M., Spanjaard, L., De Jonge, E., Bart, A., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & De Jong, M. D. (2005). Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: Implications for hospital epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4862–4864. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4862-4864.2005>
- Alcántar-Curiel, M. D., Ledezma-Escalante, C. A., Jarillo-Quijada, M. D., Gayosso-Vázquez, C., Morfín-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Cedillo-Ramírez, M. L., Santos-Preciado, J. I., & Girón, J. A. (2018). Association of Antibiotic Resistance, Cell Adherence, and Biofilm Production with the Endemicity of Nosocomial *Klebsiella pneumoniae*. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7012958>
- Barati, A., Ghaderpour, A., Chew, L. L., Bong, C. W., Thong, K. L., Chong, V. C., & Chai, L. C. (2016). Isolation and characterization of aquatic-borne *Klebsiella pneumoniae* from tropical estuaries in Malaysia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph13040426>
- Bautista-Cerón, A., Monroy-Pérez, E., García-Cortés, L. R., Rojas-Jiménez, E. A., Vaca-Paniagua, F., & Paniagua-Contreras, G. L. (2022). Hypervirulence and Multiresistance to Antibiotics in *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Patients with Hospital- and Community-Acquired Infections in a Mexican Medical Center. *Microorganisms*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102043>
- Bhalla, A., Pultz, N. J., Gries, D. M., Ray, A. J., Eckstein, E. C., Aron, D. C., & Donskey, C. J. (2004). Acquisition of Nosocomial Pathogens on Hands After

Contact With Environmental Surfaces Near Hospitalized Patients. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 25(2), 164–167. <https://doi.org/10.1086/502369>

Blot, S., Ruppé, E., Harbarth, S., Asehnoune, K., Poulakou, G., Luyt, C. E., Rello, J., Klompas, M., Depuydt, P., Eckmann, C., Martin-Loeches, I., Povoia, P., Bouadma, L., Timsit, J. F., & Zahar, J. R. (2022). Healthcare-associated infections in adult intensive care unit patients: Changes in epidemiology, diagnosis, prevention and contributions of new technologies. *Intensive and Critical Care Nursing*, 70. <https://doi.org/10.1016/j.iccn.2022.103227>

Bocanegra-Ibarias, P., Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Barrios, H., Villarreal-Treviño, L., Rodríguez-Noriega, E., Garza-Ramos, U., Petersen-Morfin, S., & Silva-Sanchez, J. (2017). Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying Enterobacteriaceae in Mexico. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179651>

Bush, K., & Bradford, P. A. (2016).  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>

Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: An update on their characteristics, epidemiology and detection. In *JAC-Antimicrobial Resistance* (Vol. 3, Issue 3). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>

Chaïbi, K., Jaureguy, F., Do Rego, H., Ruiz, P., Mory, C., El Helali, N., Mrabet, S., Mizrahi, A., Zahar, J. R., & Pilmis, B. (2023). What to Do with the New Antibiotics? In *Antibiotics* (Vol. 12, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040654>

Chen, L., Mathema, B., Chavda, K. D., DeLeo, F. R., Bonomo, R. A., & Kreiswirth, B. N. (2014). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Molecular and genetic decoding. In *Trends in Microbiology* (Vol. 22, Issue 12, pp. 686–696). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.003>

- Clegg, S., & Murphy, C. N. (2016). Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0005-2012>
- Codjoe, F. S., & Donkor, E. S. (2017). Carbapenem Resistance: A Review. In *Medical sciences (Basel, Switzerland)* (Vol. 6, Issue 1). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/medsci6010001>
- Cruz-López, F., Villarreal-Treviño, L., Morfin-Otero, R., Martínez-Meléndez, A., Camacho-Ortiz, A., Rodríguez-Noriega, E., & Garza-González, E. (2020). Dynamics of colonization in patients with health care-associated infections at step-down care units from a tertiary care hospital in Mexico. *American Journal of Infection Control*, 48(11), 1329–1335. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.04.016>
- Cruz-López, F., Villarreal-Treviño, L., Morfin-Otero, R., Martínez-Meléndez, A., Camacho-Ortiz, A., Rodríguez-Noriega, E., & Garza-González, E. (2021). Microbial diversity and colonization patterns of two step-down care units from a tertiary care hospital. *Journal of Research in Medical Sciences*, 26(1), 126. [https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS\\_1074\\_20](https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS_1074_20)
- Cureño-Díaz, M. A., Durán-Manuel, E. M., Cruz-Cruz, C., Ibáñez-Cervantes, G., Rojo-Gutiérrez, M. I., Moncayo-Coello, C. V., Loyola-Cruz, M. Á., Castro-Escarpulli, G., Hernández, D. M. R. B., & Bello-López, J. M. (2021). Impact of the modification of a cleaning and disinfection method of mechanical ventilators of COVID-19 patients and ventilator-associated pneumonia: One year of experience. *American Journal of Infection Control*, 49(12), 1474–1480. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2021.09.012>
- Elbadawi, H. S., Elhag, K. M., Mahgoub, E., Altayb, H. N., Ntoumi, F., Elton, L., McHugh, T. D., Tembo, J., Ippolito, G., Osman, A. Y., Zumla, A., & Hamid, M. M. A. (2021). Detection and characterization of carbapenem resistant Gram-negative bacilli isolates recovered from hospitalized patients at Soba

University Hospital, Sudan. *BMC Microbiology*, 21(1).  
<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02133-1>

Facciola A, Pellicanò GF, Visalli G, Paolucci IA, Venanzi Rullo E, Ceccarelli M, D'Aleo F, Di Pietro A, Squeri R, Nunnari G, & La Fauci V. (2019). *The role of the hospital environment in the HAIs*.  
[https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201902\\_17020](https://doi.org/10.26355/eurrev_201902_17020)

Fenwick, R. G., & Curtiss Iii, R. (1973). Conjugal Deoxyribonucleic Acid Replication by Escherichia coli K-12: Effect of Chloramphenicol and Rifampin. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*.  
<https://journals.asm.org/journal/jb>

Foroohimanjili, F., Mirzaie, A., Hamdi, S. M. M., Noorbazargan, H., Hedayati Ch, M., Dolatabadi, A., Rezaie, H., & Bishak, F. M. (2020). Antibacterial, antibiofilm, and antiquorum sensing activities of phytosynthesized silver nanoparticles fabricated from Mespilus germanica extract against multidrug resistance of Klebsiella pneumoniae clinical strains. *Journal of Basic Microbiology*, 60(3), 216–230. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900511>

Fresnadillo Martínez, M. J., García García, M. I., García Sánchez, E., & García Sánchez, J. E. (2010a). Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(SUPPL. 2), 53–64. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70031-8](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70031-8)

Fresnadillo Martínez, M. J., García García, M. I., García Sánchez, E., & García Sánchez, J. E. (2010b). Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(SUPPL. 2), 53–64. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70031-8](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70031-8)

Garza-González, E., Bocanegra-Ibarias, P., Bobadilla-Del-Valle, M., Alfredo Ponce-De-León-Garduño, L., Esteban-Kenel, V., Silva-Sánchez, J., Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., López-Jácome, L. E., Colin-Castro, C. A., Franco-Cendejas, R., Flores-Treviño, S., Morfín-Otero, R., Rojas-Larios, F., Mena-Ramírez, J. P., Fong-Camargo, M. G., Morales-De-la-Peña, C. T.,

- García-Mendoza, L., Choy-Chang, E. V., ... Camacho-Ortiz, A. (2021). Drug resistance phenotypes and genotypes in Mexico in representative gram-negative species: Results from the infivar network. *PLoS ONE*, *16*(3 March). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248614>
- Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., Moreno-Domínguez, S., Toribio-Jiménez, J., Jardón-Pineda, D., Cuevas-Peña, J., Sánchez-Pérez, A., Duran-Bedolla, J., Olguín-Rodríguez, J., & Román-Román, A. (2018). Phenotypic and molecular characterization of *Klebsiella* spp. isolates causing community-acquired infections. *New Microbes and New Infections*, *23*, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.02.002>
- Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., Martínez-Romero, E., Tinoco, P., Pina-Gonzales, M., Barrios, H., Martínez-Barnetche, J., Gómez-Barreto, R. E., & Tellez-Sosa, J. (2015). Development of a Multiplex-PCR probe system for the proper identification of *Klebsiella variicola* Microbial genetics, genomics and proteomics. *BMC Microbiology*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0396-6>
- Gerald, D. R., & Gerald, M. L. (1988). *Beta-Lactam Antibiotics*.
- Guerra, M. E. S., Destro, G., Vieira, B., Lima, A. S., Ferraz, L. F. C., Hakansson, A. P., Darrieux, M., & Converso, T. R. (2022). *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.877995>
- Halat, D. H., & Moubareck, C. A. (2022). The Intriguing Carbapenemases of *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Genetic Profile, and Global Epidemiology. In *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE* (Vol. 95).
- Heiden, S. E., Hübner, N. O., Bohnert, J. A., Heidecke, C. D., Kramer, A., Balau, V., Gierer, W., Schaefer, S., Eckmanns, T., Gatermann, S., Eger, E., Guenther, S., Becker, K., & Schaufler, K. (2020). A *Klebsiella pneumoniae* ST307 outbreak clone from Germany demonstrates features of extensive

drug resistance, hypermucoviscosity, and enhanced iron acquisition. *Genome Medicine*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00814-6>

Huerta-Gutiérrez, R., Braga, L., Camacho-Ortiz, A., Díaz-Ponce, H., García-Mollinedo, L., Guzmán-Blanco, M., Valderrama-Beltrán, S., Landaeta-Nezer, E., Moreno-Espinosa, S., Morfín-Otero, R., Rodríguez-Zulueta, P., Rosado-Buzzo, A., Rosso-Suárez, F., Trindade-Clemente, W., & Wiltgen, D. (2019). One-day point prevalence of healthcare-associated infections and antimicrobial use in four countries in Latin America. *International Journal of Infectious Diseases*, 86, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.06.016>

Humberto, B. C., Jesús, S. S., Elena, C. A., Luis, L. A., Josefina, D. B., Alejandro, A. V., Elvira, G. G., Paola, B. I., Rayo, M. O., Rigoberto, H. C., & Ulises, G. R. (2022). PCR system for the correct differentiation of the main bacterial species of the *Klebsiella pneumoniae* complex. *Archives of Microbiology*, 204(1). <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02668-x>

Jia, H., Li, L., Li, W., Hou, T., Ma, H., Yang, Y., Wu, A., Liu, Y., Wen, J., Yang, H., Luo, X., Xing, Y., Zhang, W., Wu, Y., Ding, L., Liu, W., Lin, L., Li, Y., & Chen, M. (2019). Impact of Healthcare-Associated Infections on Length of Stay: A Study in 68 Hospitals in China. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2590563>

Kim, D., Kim, S., Kwon, Y., Kim, Y., Park, H., Kwak, K., Lee, H., Lee, J. H., Jang, K. M., Kim, D., Lee, S. H., & Kang, L. W. (2023). Structural Insights for  $\beta$ -Lactam Antibiotics. In *Biomolecules and Therapeutics* (Vol. 31, Issue 2, pp. 141–147). Korean Society of Applied Pharmacology. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2023.008>

Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., & Mitsuhashi, S. (1983). *Transferable Resistance to Cefotaxime, Cefoxitin, Cefamandole and Cefuroxime in Clinical Isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens*.

Kumar, N., Singh, V. A., Beniwal, V., & Pottathil, S. (2018). Modified Carba NP Test: Simple and rapid method to differentiate KPC- and MBL-producing

Klebsiella species. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(7).  
<https://doi.org/10.1002/jcla.22448>

Lam, M. M. C., Wick, R. R., Watts, S. C., Cerdeira, L. T., Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2021a). A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24448-3>

Lam, M. M. C., Wick, R. R., Watts, S. C., Cerdeira, L. T., Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2021b). A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24448-3>

Larcher, R., Laffont-Lozes, P., Roger, C., Doncesco, R., Groul-Viaud, C., Martin, A., Loubet, P., Lavigne, J. P., Pantel, A., & Sotto, A. (2022). Last resort beta-lactam antibiotics for treatment of New-Delhi Metallo-Beta-Lactamase producing Enterobacterales and other Difficult-to-Treat Resistance in Gram-negative bacteria: A real-life study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1048633>

Li, P., Wang, M., Li, X., Hu, F., Yang, M., Xie, Y., Cao, W., Xia, X., Zheng, R., Tian, J., Zhang, K., Chen, F., & Tang, A. (2017). ST37 *Klebsiella pneumoniae*: Development of carbapenem resistance in vivo during antimicrobial therapy in neonates. *Future Microbiology*, 12(10), 891–904. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0165>

Lima, L. M., Silva, B. N. M. da, Barbosa, G., & Barreiro, E. J. (2020).  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 208). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>

Llaca-Díaz, J. M., Mendoza-Olazarán, S., Camacho-Ortiz, A., Flores, S., & Garza-González, E. (2013). One-year surveillance of escape pathogens in an intensive care unit of monterrey, Mexico. *Chemotherapy*, 58(6), 475–481. <https://doi.org/10.1159/000346352>

- Logan, L. K., & Weinstein, R. A. (2017). The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. *Journal of Infectious Diseases*, 215, S28–S36. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw282>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 8, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
- Masoudifar, M., Gouya, M. M., Pezeshki, Z., Eshrati, B., Afhami, S., Farzami, M. R., & Seifi, A. (2021). Health care-associated infections, including device-associated infections, and antimicrobial resistance in Iran: The national update for 2018. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 62(4), E943–E949. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2021.62.4.1801>
- Mazzeffi, M., Galvagno, S., & Rock, C. (2021). Prevention of Healthcare-associated Infections in Intensive Care Unit Patients. In *Anesthesiology* (Vol. 135, Issue 6, pp. 1122–1131). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000004017>
- Murphy, C. N., & Clegg, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: Nosocomial infection, regulation and biofilm formation. In *Future Microbiology* (Vol. 7, Issue 8, pp. 991–1002). <https://doi.org/10.2217/fmb.12.74>
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance.

In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 41, Issue 3, pp. 252–275). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>

Odoyo, E., Matano, D., Tiria, F., Georges, M., Kyanya, C., Wahome, S., Mutai, W., & Musila, L. (2023). Environmental contamination across multiple hospital departments with multidrug-resistant bacteria pose an elevated risk of healthcare-associated infections in Kenyan hospitals. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01227-x>

Ohama, Y., Nomura, Y., Mizoguchi, M., Higurashi, Y., Okamoto, K., & Harada, S. (2022). Accurate Identification of *Klebsiella variicola* by MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology Laboratories. *Microbiology Spectrum*, 10(5). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02844-22>

Pecora, N. D., Li, N., Allard, M., Li, C., Albano, E., Delaney, M., Dubois, A., Onderdonk, A. B., & Bry, L. (2015). Genomically informed surveillance for carbapenem-resistant enterobacteriaceae in a health care system. *MBio*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01030-15>

Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. (Ed.). (2023). *CLSI*.

Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>

Potter, R. F., D'Souza, A. W., & Dantas, G. (2016). The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. In *Drug Resistance Updates* (Vol. 29, pp. 30–46). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.09.002>

Rafa, E., Wałaszek, M. Z., Wałaszek, M. J., Domański, A., & Róžańska, A. (2021). The incidence of healthcare-associated infections, their clinical forms, and microbiological agents in intensive care units in southern Poland in a

multicentre study from 2016 to 2019. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(5), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052238>

Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>

Sánchez-B Esp, P., Muñoz-M Esp, R., & Gutiérrez-M Esp, N. P. (2012). *Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia 1 Bacterial Resistance to Antibiotics: Mechanisms of Transfer*.

Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. In *BioMed Research International* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>

Shadkam, S., Goli, H. R., Mirzaei, B., Gholami, M., & Ahanjan, M. (2021). Correlation between antimicrobial resistance and biofilm formation capability among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Iran. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00418-x>

Shun-Mei, E., Zeng, J. M., Yuan, H., Lu, Y., Cai, R. X., & Chen, C. (2018). Sub-inhibitory concentrations of fluoroquinolones increase conjugation frequency. *Microbial Pathogenesis*, 114, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.036>

Sievert, D. M., Ricks, P., Edwards, J. R., Schneider, A., Patel, J., Srinivasan, A., Kallen, A., Limbago, B., & Fridkin, S. (2013). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 34(1), 1–14. <https://doi.org/10.1086/668770>

- Singh, A. K., Yadav, S., Chauhan, B. S., Nandy, N., Singh, R., Neogi, K., Roy, J. K., Srikrishna, S., Singh, R. K., & Prakash, P. (2019). Classification of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* based on their in vitro biofilm forming capabilities and elucidation of the biofilm matrix chemistry with special reference to the protein content. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00669>
- Stojowska-swędrzyńska, K., Łupkowska, A., Kuczyńska-wiśnik, D., & Laskowska, E. (2022). Antibiotic heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23010449>
- Toledano-Tableros, J. E., Gayosso-Vázquez, C., Jarillo-Quijada, M. D., Fernández-Vázquez, J. L., Morfin-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Gionocerezo, S., Gutkind, G., Di Conza, J., Santos-Preciado, J. I., & Alcántar-Curiel, M. D. (2021a). Dissemination of bla<sub>NDM-1</sub> Gene Among Several *Klebsiella pneumoniae* Sequence Types in Mexico Associated With Horizontal Transfer Mediated by IncF-Like Plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.611274>
- Toledano-Tableros, J. E., Gayosso-Vázquez, C., Jarillo-Quijada, M. D., Fernández-Vázquez, J. L., Morfin-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Gionocerezo, S., Gutkind, G., Di Conza, J., Santos-Preciado, J. I., & Alcántar-Curiel, M. D. (2021b). Dissemination of bla<sub>NDM-1</sub> Gene Among Several *Klebsiella pneumoniae* Sequence Types in Mexico Associated With Horizontal Transfer Mediated by IncF-Like Plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.611274>
- Vachvanichsanong, P., McNeil, E. B., & Dissaneewate, P. (2020). Extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infections. *Epidemiology and Infection*. <https://doi.org/10.1017/S0950268820003015>

- Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M. P., Libori, M. F., Tiracchia, V., Salvia, A., & Varaldo, P. E. (2017). Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*, *123*(4), 1003–1018. <https://doi.org/10.1111/jam.13533>
- Wyres, K. L., Lam, M. M. C., & Holt, K. E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 18, Issue 6, pp. 344–359). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>
- Xercavins, M., Jiménez, E., Padilla, E., Riera, M., Freixas, N., Boix-Palop, L., Pérez, J., & Calbo, E. (2020). High clonal diversity of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples in a non-outbreak situation. A cohort study. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0661-9>
- Yang, D., & Zhang, Z. (2008). Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Journal of Hospital Infection*, *68*(4), 369–371. <https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2008.02.001>
- Yang, X., Dong, N., Chan, E. W. C., Zhang, R., & Chen, S. (2021). Carbapenem Resistance-Encoding and Virulence-Encoding Conjugative Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Trends in Microbiology*, *29*(1), 65–83. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2020.04.012>

## 14. APÉNDICE A

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Agar Müeller-Hinton: Preparar agar MH según las instrucciones del fabricante.

Caldo Müeller-Hinton: Preparar caldo MH según las instrucciones del fabricante.

Caldo Soya Trypticasa: Preparar caldo ST según las instrucciones del fabricante.

Caldo Soya Trypticasa con glicerol al 15 %: Preparar caldo ST según las instrucciones del fabricante, con una solución de glicerol al 15 %.

Caldo BHI con glucosa al 5 %: Preparar caldo BHI según las instrucciones del fabricante, con una solución de glucosa al 5 %.

Gel de agarosa al 2 %: Disolver 2 g de agarosa en 100 mL de TBE 1X

Gel de agarosa al 1 %: Disolver 1 g de agarosa en 50 mL de TBE 1X

Solución salina al 0.085 %: Disolver 0.9 g de NaCl en 100 mL de agua destilada.

TBE 0.5X: Disolver 50 mL de TBE 10X en 950 mL de agua destilada.

TBE 10X: Disolver 54 g de Tris-base, 27.5 g de ácido bórico, 37.5 mL de agua destilada, 20 mL de EDTA 500 mM pH 8, y aforar a 500 mL.