

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURI” DEPARTAMENTO DE
BACTERIOLOGIA- MICOLOGIA



Susceptibilidad antimicrobiana de Klebsiella pneumoniae productora de betalactamasas procedentes de hospitales cubanos

Trabajo de tesis para optar por el título de Máster en Ciencias en Bacteriología-
Micología

Autora: Dra. Yenisel Carmona Cartaya

La Habana, 2016

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURI” DEPARTAMENTO DE
BACTERIOLOGIA- MICOLOGIA



Susceptibilidad antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas procedentes de hospitales cubanos.

**Trabajo de tesis para optar por el título de Máster en Ciencias en
Bacteriología-Micología**

Autora: Dra. Yenisel Carmona Cartaya

Tutora: Dra. Dianelys Quiñones, Dr. C

La Habana, 2016

DEDICATORIA

*A la luz que acompaña todo el tiempo para darme esfuerzo cuando
estoy cansada y fuerzas cuando ya no tengo ninguna, mi Dios y
Padre eterno*

*A los que me dieron la oportunidad de nacer y se convirtieron en
protagonistas de mi paso por la vida, mis padres*

*Al hombre que decidió tomarme de la mano para caminar juntos en
este largo y tortuoso camino hacia la vejez, mi eterno enamorado*

*Y a los que hoy se preguntan por qué mamá no está temprano en
casa y espero que algún día lo puedan comprender, mis pequeños
hijos*

AGRADECIMIENTOS

Mientras más grande es un desafío más compañeros de batalla se necesitan, por eso hoy quiero darte las gracias a ti mi Dios por bendecirme con esa RETAGUARDIA VANGUARDIA que son y siempre serán mis padres, mis abuelos, los que están y los que ya partieron, mi hermana, mis tíos a los por tu gracia también puedo llamar padres porque siempre se comportan como tal y mis primos que también son hermanos, por esa hermosa familia que no escogí pero si me acogieron a mí desde que nací (mi Pipa, mi Uco y mis compadres) y especialmente por el gran hombre que tengo por esposo y del cual estoy tan orgullosa.

También quiero darte las gracias por la INFANTERÍA, mis profesores, los que me han ensañado lo duro y difícil que es estar en la primera línea de combate y también lo importante que es luchar por la victoria, especialmente por mi tutora, una guerrera incansable.

No creas que me olvidé Señor, te agradezco infinitamente por mis COMPAÑERAS DE TRINCHERAS, las que me habías dado desde hace tiempo y que no me dejan flaquear pues siempre están ahí para pelear conmigo (Yoima, Silvi, Ody y Ro) y a la que gané ahora y me regala su apoyo incondicional todo el tiempo, Niurka.

En fin Señor, no sé si yo merezca esta bendición de tenerlos pero si quiero que los bendigas a todos y que nunca les falten tu paz y tu amor.

ABREVIATURAS

BLEEs: Betalactamasas de espectro extendido

CIM: Concentración inhibitoria mínima

CLSI, siglas en inglés: Comité Internacional de Estandarización de Laboratorio Clínico

IAAS: Infecciones asociadas a la atención sanitaria

KPC: *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa

LN-IAAS/IPK: Laboratorio Nacional de Infecciones asociadas a la atención sanitaria / Instituto “Pedro Kourí”

CITMA: Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente

MINSAP: Ministerio de Salud Pública.

MBLs: metalo-β-lactamasas

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa

NDM: Nueva Delhi Metalo- β-lactamasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

UCI: Unidades de Cuidados Intensivos

RESUMEN

Klebsiella pneumoniae productora de betalactamasas es una de las principales causas de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria para la cual las opciones de tratamiento son limitadas. Con el objetivo de conocer el comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana entre los aislados de *K. pneumoniae* productor de betalactamasas causante de infecciones en hospitales cubanos, en los meses de enero a septiembre del 2016, se desarrolló un estudio retrospectivo de tipo descriptivo en el Laboratorio Nacional de Infecciones Asociadas a la Asistencia Sanitaria del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, que incluyó 147 aislados 134 productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), tres de serincarbapenemasas KPC y 30 sospechosas de producir betalactamasas de tipo AmpC, procedentes de 17 hospitales de 8 provincias del país. Para ello se determinó la producción de betalactamasas de tipo AmpC y se analizó la susceptibilidad a los antimicrobianos en los aislados productores de esta y las demás betalactamasas. El 70% y 90% de los aislados productores de AmpC y BLEE, respectivamente, fue susceptible a los carbapenémicos; mientras que 19% de los productores de BLEE y 20% de AmpC fue susceptible a ciprofloxacina. Solo un aislado KPC positivo fue sensible a esta droga. Para los aminoglucósidos los valores de sensibilidad oscilaron entre 13-42% en BLEE y 6-26% en AmpC ninguno de los aislados KPC fue sensible. La colistina fue la droga más activa con 100% de sensibilidad en aislados AmpC y KPC positivos y en los de BLEE 93%. La escasa sensibilidad antimicrobiana en los aislados de *K. pneumoniae* productor de betalactamasas en los hospitales cubanos evidencia la necesidad de un monitoreo continuo de este patógeno para el cual la colistina representa una de las pocas opciones terapéuticas y en ocasiones la única.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. MARCO TEÓRICO	4
III.1 Historia, taxonomía y clasificación del género <i>Klebsiella</i>	5
III.2 Características generales del género <i>Klebsiella</i>	5
III.3 Factores de virulencia	5
III.4 Impacto clínico	6
III.5 Resistencia a los antimicrobianos	8
III.6 Resistencia antimicrobiana en el género <i>Klebsiella</i>	10
III.6.1 Resistencia a Betalactámicos	10
III.6.1.2 Betalactamasas	10
III.6.2 Resistencia a otras familias de antimicrobianos	16
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	17
IV.1 Diseño metodológico	19
IV.2 Operacionalización de las variables	19
IV.3 Procedimiento de laboratorio:	21
IV.4 Detección de betalactamasas de tipo AmpC	22
IV.5 Análisis estadístico	23
IV.6 Aspectos éticos	23
IV.7 Factibilidad	24
IV.8 Recursos humanos y materiales	24
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26

ÍNDICE

VI. CONCLUSIONES	39
VII. RECOMENDACIONES	40
VIII. BIBLIOGRAFÍA	41
IX. ANEXOS	48

I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce el problema creciente de la resistencia antimicrobiana como una de las mayores amenazas para la salud humana y considera que su contención es una necesidad pública mundial que requiere de acciones globales y urgentes (1, 2).

En el notable incremento de la resistencia antibiótica de los últimos años el papel que juegan las betalactamasas, enzimas con actividad hidrolítica sobre los betalactámicos, es significativo (3). La producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) constituye el principal mecanismo de resistencia en enterobacterias a betalactámicos. No obstante, otras betalactamasas como las de tipo AmpC y más recientemente las carbapenemas de tipo KPC cobran cada vez mayor importancia (4-6).

Las BLEE se definen como enzimas capaces de hidrolizar a las cefalosporinas de amplio espectro y a los monobactámicos, pero no las cefamicinas ni a los carbapenemes; mientras que las betalactamasas de tipo AmpC hidrolizan además a las cefamicinas. La acción hidrolítica de las KPC inactiva casi a la totalidad de los betalactámicos, incluidos aquellos resistentes a la acción de las betalactamasas anteriores, como los carbapenémicos (6, 7).

El tratamiento de las infecciones que causan los microorganismos productores de betalactamasas es un reto, ya que con frecuencia estos son resistentes también a quinolonas, aminoglucósidos y trimetoprim/sulfametoxtaxol, lo que limita las opciones terapéuticas (8).

El ambiente hospitalario y en particular las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) son el principal reservorio de los microorganismos multirresistentes. Sin embargo, resulta alarmante el incremento de la resistencia a los antimicrobianos que tiene lugar en la comunidad en las últimas décadas (9).

Klebsiella pneumoniae es un importante patógeno oportunista que causa infecciones como septicemias, neumonía, infecciones del tracto urinario y de los tejidos blandos. La mayoría de las infecciones causadas por esta bacteria se

I. INTRODUCCIÓN

presentan en hospitalizados, inmunodeprimidos o pacientes con alguna enfermedad de base (10).

El 60% de los aislamientos de *K. pneumoniae* en América Latina son productores de BLEE, así mismo es la enterobacteria productora de AmpC y KPC más frecuente (4, 7, 11). La notificación de los primeros aislamientos de *K. pneumoniae* productores de BLEE motivó el ingreso de esta especie al grupo de los microorganismos multirresistentes y la aparición de aislados resistentes a carbapenémicos confirmó su entrada al panel de las “superbacterias” (10).

La vertiginosa diseminación mundial de *K. pneumoniae* productora de betalactamasas, se asocia a su capacidad para adaptarse al ambiente hospitalario y sobrevivir en las manos del personal de salud por largos períodos de tiempo. Esto último favorece su transmisión entre personas e incluso la transmisión entre diferentes sitios de un mismo hospital, entre ciudades y países (12).

La distribución geográfica de las betalactamasas de tipo AmpC varía considerablemente de una zona a otra y de la especie estudiada, en América se reporta entre 0,5% y 7,5% de los aislamientos de *K. pneumoniae*; mientras que en Europa se notifica hasta en 55% de los aislamientos resistentes al cefoxitin (7).

Con la aparición de las BLEE, los carbapenémicos se convierten en el tratamiento de elección frente a las infecciones graves causadas por enterobacterias multirresistentes y frecuentemente son la única opción terapéutica disponible (13). En 1996, en Estados Unidos (EE.UU), se produce el primer reporte de carbapenemasas en *K. pneumoniae* y desde entonces se disemina de manera rápida a nivel mundial (14). Los aislamientos de KPC son frecuentes en EE.UU, Colombia, Israel y China (15).

Si bien el consumo de betalactámicos incluidos los carbapenémicos es universal, la prevalencia de cepas de *K. pneumoniae* con fenotipo sugestivo de BLEE, AmpC y KPC no es uniforme entre los diferentes continentes. El conocimiento de la

I. INTRODUCCIÓN

prevalencia de los mecanismos de resistencias en cada país resulta crucial para que se establezcan políticas de antibióticos adecuadas.

Una investigación previamente realizada por la autora en el Laboratorio Nacional de Infecciones Asociadas a la Asistencia Sanitaria del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (LN-IAAS/IPK) reporta a *K. pneumoniae* como la especie más frecuente del género (95 %), más de un 80 % de aislados productores de BLEE así como la emergencia de KPC (16). Sin embargo, la información sobre la producción o no de AmpC entre los aislamientos de *K. pneumoniae* y el comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana frente a diferentes antibióticos entre los aislamientos productores de betalactamasas, es escasa.

La presente investigación pretende dar continuidad al estudio anterior con el fin de enfatizar en la susceptibilidad antimicrobiana frente a los antibióticos en cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE y KPC, así como detectar la producción de betalactamasas de tipo AmpC en aquellos aislamientos que resultaron sugestivos de producir dicha enzima.

II. OBJETIVOS

1. Determinar de forma fenotípica, la producción de betalactamasas de tipo AmpC en *K. pneumoniae* resistentes al cefoxitin.
2. Describir la distribución de *K. pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido, betalactamasas de tipo AmpC y KPC según el tipo de muestra y el servicio del cual procede.
3. Describir la susceptibilidad a los antimicrobianos en aislamientos de *K. pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido, betalactamasas de tipo AmpC y KPC.

III. MARCO TEÓRICO

III.1 Historia, taxonomía y clasificación del género *Klebsiella*

La primera mención del género *Klebsiella* fue en el año 1875 cuando el bacteriólogo alemán Edwing Klebs (1834-1913) describe unos microorganismos bacilares aislados en exudados bronquiales de pacientes fallecidos por neumonía. La especie tipo de este género es *K. pneumoniae*, que fue descrita por Schroeter en 1886, y por Trevisan en 1887, quien en honor a Klebs designa al género con el nombre de *Klebsiella* (17).

De 1960 a la fecha se han propuesto cuatro clasificaciones, aunque la mayoría de los países reconocen la clasificación de Ørskov. A pesar de los numerosos esfuerzos que se emplean para la clasificación del género, aún no existe un consenso para la diferenciación a nivel de especie y subespecie (16).

III.2 Características generales del género *Klebsiella*

Los bacilos del género *Klebsiella* son gramnegativos, fermentadores la glucosa, anaerobios facultativos, no esporulados y oxidasa negativos, generalmente producen gas de glucosa e hidrolizan la urea, son inmóviles, y están recubiertos por una enorme cápsula polisacáridica. Las bacterias del género crecen bien en casi todos los medios de cultivos, la temperatura óptima de crecimiento es entre 30 y 37°C. En medios sólidos se pueden observar colonias grandes, brillantes; las cepas que producen cápsula son mucoides y de consistencia viscosa. En Agar Mac Conkey las colonias son de color rosa oscuro con pigmento rojo fácilmente difusible en el agar circundante, por la fermentación de la lactosa y producción de ácido (17-19).

III.3 Factores de virulencia

Las cepas de *K. pneumoniae*, están generalmente cubiertas por una cápsula de naturaleza polisacáridica que permite su clasificación en 77 tipos serológicos; sus propiedades antigénicas, le facilitan la adherencia a las superficies y determinan la

III. MARCO TEÓRICO

capacidad de resistir a la fagocitosis y al efecto bactericida del suero, las cepas mutantes sin cápsula son altamente sensibles a la fagocitosis (16).

Mediante los *pilis*, la célula bacteriana se pueden adherir a las superficies de la célula hospedera y mantener el contacto con la misma. En *Klebsiella* spp., existen dos tipos predominantes: el tipo 1 (se asocia fundamentalmente a la patogénesis de las infecciones del tracto urinario pues se adhieren a las células del túbulo proximal) y el tipo 3 (interviene en la adherencia a las células endoteliales y al epitelio del tracto respiratorio y urinario) (17, 20).

La presencia de aerobactina, elemento de bajo peso molecular capaz de competir con las proteínas transportadoras de hierro del huésped (sideróforo o agente quelante del hierro), también se considera un factor esencial en la patogenicidad del género (21).

Otro factor que protege a la bacteria de la agresión por parte del huésped y favorece su posterior desarrollo y multiplicación, es la capacidad de resistir a los factores séricos. En *Klebsiella* spp. el mecanismo exacto se desconoce, pero hay dos hipótesis: la primera, es en el enmascaramiento capsular del lipopolisacárido y esta nueva estructura superficial es incapaz de activar el sistema del complemento; la otra, plantea que las cadenas laterales del polisacárido O pueden atravesar la cápsula y ser reconocidas por la molécula C3b del complemento, esto impide que se forme el complejo lítico y por tanto, no ocurre lisis de la membrana celular y la bacteria no es destruida (20).

III.4 Impacto clínico

Klebsiella spp. es ubicuo en la naturaleza y puede colonizar las mucosas de la nasofaringe y las del tracto digestivo del hombre (17, 22). Posee una cápsula hidrófila que favorece la sobrevivencia del microorganismo en la piel y la protege de la desecación, por lo que puede sobrevivir en las manos del personal de salud por largos períodos de tiempo y tiene gran capacidad de adaptación al ambiente hospitalario (19).

III. MARCO TEÓRICO

K. pneumoniae es la especie con mayor importancia clínica y es la segunda enterobacteria oportunista más importante como causa de infecciones nosocomiales y comunitarias solamente precedida por *Escherichia coli* (23). Su patogenia está estrechamente relacionada con su nicho ecológico, y se favorece con factores predisponentes como: afectaciones del sistema inmune, la presencia de enfermedades debilitantes (diabetes, alcoholismo, enfermedades hepáticas, cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y fallo renal); terapias inmunosupresoras (uso de glucocorticoides); transplante de órganos sólidos; estadía hospitalaria prolongada y empleo de técnicas invasivas (ventilación pulmonar artificial, cateterismo vesical y venoso (16, 24)

La principal relevancia clínica de *Klebsiella* spp. es la capacidad de cambiar su sensibilidad natural a los antimicrobianos a través de la selección y transmisión de diversos mecanismos de resistencia que involucra simultáneamente varios familias de antibióticos (24). En la actualidad se plantea que entre 20% y 80% de los aislados de *K. pneumoniae* son resistentes a la primera línea de tratamiento lo que incluye cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (22). La producción de BLEE es el mecanismo fundamental de resistencia; la tasa de detección más alta de *K. pneumoniae* productora de BLEE proviene de América Latina con 45% en comparación con las tasa que reportan Europa (19.7%) y América del Norte (10%) (25).

La aparición de cepas productoras de carbapenemasas de tipo (KPC), emergen como un serio problema mundial por el alto nivel de resistencia que confieren a todos los betalactámicos, con distintos niveles de resistencia a los carbapenémicos (26). Los aislamientos de KPC son frecuentes en EE.UU, Colombia, Israael, Zhejiang (China) y Grecia donde están asociados a estadías hospitalarias prolongadas (27). Todas estas razones permitieron que *K. pneumoniae* se incluya en el llamado grupo de las superbacterias con una relevancia global (16).

III. MARCO TEÓRICO

III.5 Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia microbiana es la pérdida de la sensibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano al que inicialmente era susceptible. Este fenómeno se origina con la aparición de un cambio permanente en el material genético del microorganismo que se transmite a sus descendientes, motivo por el cual los mismos también serán resistentes a esa droga (28).

Entre los elementos que inducen a la aparición de la resistencia antimicrobiana en la práctica clínica están: uso indiscriminado de antimicrobianos en pacientes inmunodeprimidos y en UCI, profilaxis antibiótica inapropiada, terapia antimicrobiana con dosis o duración inadecuada, tratamiento antibiótico para enfermedades no bacterianas o bacterianas autolimitadas y desconocimiento de los perfiles de sensibilidad a los antimicrobianos a nivel local de cada institución o comunidad (29).

Recientemente el Centro Europeo de Diagnóstico y Control de las Enfermedades y el Centro para Prevención y Control de Enfermedades (ECDC y CDC) (por sus siglas en inglés respectivamente) clasifican a los microorganismos en base a los perfiles fenotípicos de resistencia (30). (Tabla 1)

III. MARCO TEÓRICO

Tabla 1. Definición de microorganismo multirresistente, extremadamente resistente y panresistente (30).

Concepto	Definición	Comentario
Multirresistente	No sensible al menos a un antibiótico de ≥ 3 familias antibióticas	Resistencia a múltiples antibióticos (≥ 3) [clases o subclases] Definición basada en las determinaciones in vitro con el fin de orientar el tratamiento clínico y para el control epidemiológico
Extremadamenteresistente	No sensible al menos a un antibiótico de todas excepto ≤ 2 de las familias antibióticas	Resistencia a todos o a casi todos los antibióticos aprobados para uso clínico
Panresistente	No sensible a ningún antibiótico de ninguna categoría	Microorganismo resistente a: prácticamente todos los antibióticos disponibles comercialmente, todos los antibióticos estudiados de rutina, todos los antibióticos disponibles para tratamiento empírico

Las bacterias multirresistentes, extremadamenteresistentes y pandrogorresistentes tienen un impacto significativo sobre la mortalidad, la estancia hospitalaria y los costos asociados (30). En conjunto los microorganismos resistentes “altamente problemáticos” son denominados patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *enterobacterias*), por su capacidad para “escapar” de las acciones de las terapias efectivas, lo cual los hace responsables de la crisis de resistencia antibiótica en diferentes partes del mundo (31).

III. MARCO TEÓRICO

III.6 Resistencia antimicrobiana en el género *Klebsiella*

III.6.1 Resistencia a Betalactámicos

Los betalactámicos incluyen varios grupos de antibióticos entre los que se encuentran las penicilinas, las cefalosporinas, los carbapenemes y los monobactámicos e inhiben la síntesis de la pared celular de la bacteria (32).

Aunque la resistencia a los betalactámicos está definida por distintos mecanismos (producción de enzimas, alteraciones de la permeabilidad, alteración de la diana y, presumiblemente, expresión de bombas de expulsión activa), el principal mecanismo de resistencia a betalactámicos en enterobacterias es el enzimático, por producción de betalactamasas, que pueden ser naturales de ciertas especies o adquiridas (17, 33).

III.6.1.2 Betalactamasas

Concepto

Las betalactamasas son un grupo muy heterogéneo de enzimas de resistencia, en la actualidad se describe más de 700 tipos. Estructuralmente, son proteínas compuestas de hojas β plegadas y α hélices que hidrolizan el anillo betalactámico e inactivan al antibiótico (34, 35).

Clasificación

Las Betalactamasas se clasifican según estructura, función, sustrato al que se unen, sustancias que las inhiben, parámetros cinéticos y expresión si están codificadas en plásmidos o en el cromosoma (12).

En la actualidad se mantienen vigentes la clasificación según la estructura molecular y la secuencia aminoacídica de las enzimas de Ambler en 1980 y la clasificación funcional propuesta por Bush-Jacoby-Medeiros en 1995 y actualizada en 2010 (36).

III. MARCO TEÓRICO

- **Clasificación molecular de Ambler:** Agrupa las betalactamasas en cuatro clases o grupos (A, B, C y D)
 1. Serin-β-lactamasas: Las enzimas de los grupos A, C y D, que contienen una serina en su centro activo e hidrolizan penicilinas, oxacilina y cefalosporinas.
 2. Metalo-β-lactamasas: Enzimas del grupo B que tienen como cofactor un ión de Zinc, indispensable para actuar; estas tienen actividad sobre las penicilinas, las cefalosporinas, los carbapenémicos, pero no actúan sobre los monobactámicos (12, 17).
- **Clasificación de Bush, Jacobhy y Medeiros:** Esta clasificación las agrupa según las similitudes de las funciones de las enzimas en cuatro grupos diferentes (del 1- 4) y el grupo 2 queda dividido en 12 subgrupos (17).
 1. Grupo 1: Incluye enzimas de la clase C de Ambler que hidrolizan cefalosporinas y no son inhibidas por el ácido clavulánico o tazobactam.
 2. Grupo 2: Incluye enzimas de las clases A y D de Ambler que se inhiben por el ácido clavulánico.
 3. Grupo 3: Incluye enzimas de la clase B de Ambler. Son metalo-β-lactamasas que requieren para actuar de la unión de Zn^{+2} a su centro activo y que se inhiben por agentes quelantes como el EDTA, pero que no se inhiben por el ácido clavulánico o por tazobactam.
 4. Grupo 4: Incluido en la clasificación inicial, no aparece en la actualización del año 2009. La mayoría de las enzimas incluidas inicialmente en este grupo no están completamente caracterizadas y pueden ser clasificadas en los grupos anteriores.

III. MARCO TEÓRICO

Betalactamasas de Espectro Extendido

Concepto

Las BLEE son enzimas que hidrolizan y causan resistencia o sensibilidad disminuida a penicilinas, cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam); mantienen la sensibilidad a cefamicinas (cefoxitina) y carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem) y se inhiben por el ácido clavulánico (37).

Estas enzimas pertenecen a la clase molecular A de Ambler y se incluyen en el grupo funcional 2be de Bush y Jacoby. Entre ellas se encuentran las de tipo TEM y SHV, la familia CTX-M y otras menos prevalentes como PER, VEB, BES, GES, TLA y SFO. Algunas enzimas de la familia OXA (clase D de Ambler y grupo funcional 2de) se consideran también BLEE y se describen con mayor frecuencia en *P. aeruginosa* (37).

BLEE de mayor importancia clínica:

1. Enzimas tipo TEM: Se derivaron de las Betalactamasas TEM-1 y TEM-2. La primera BLEE de esta familia es la TEM-3 y se reportó en cepas de *K. pneumoniae* en Francia, 1984 (16). Hasta el momento se describen 182 variantes en la que se incluyen las enzimas TEM resistentes a los inhibidores (IRT) y las TEM del Complejo Mutante que combinan los perfiles de BLEE e IRT (17, 38).
2. Enzimas tipo SHV: La primera con fenotipo de BLEE fue la SHV-2 descrita en cepas de *K. ozaenae* en Alemania, 1983 y se derivó de la betalactamasa cromosomal SHV-1. Hasta el momento se describen 134 variantes de SHV y la mayoría de ellas son BLEE, algunas enzimas de esta familia muestran resistencia variable a inhibidores de betalactamasas de clase A (17, 38).

III. MARCO TEÓRICO

3. Enzimas tipo CTX-M: estas betalactamasas de manera genérica se denominaron CTX-M y no guardan relación alguna con las betalactamasas descritas hasta 1989 cuando se detectan en cepas de enterobacterias con elevada resistencia a cefotaxima y menor afectación de la ceftazidima (39). En un inicio estas enzimas se clasificaron en cinco grupos según la secuencia de aminoácidos y recientemente se adicionaron dos grupos más. Las enzimas CTX-M-14 y CTX-M-15 son de todas, las más importantes, pues se aíslan alrededor del mundo entero en cualquier tipo de muestra humana y ambiental (5, 17, 39).

Las enzimas SHV y TEM eran las familias más frecuentes las cuales originaban brotes hospitalarios epidémicos (40). Este panorama cambió desde 2000 por la acelerada evolución y dispersión de las enzimas CTX-M, las cuales no se confinan al ambiente hospitalario sino que también se aíslan de infecciones adquiridas en la comunidad, en particular del tracto urinario (40).

Betalactamasas de tipo AmpC

Las AmpC son serín-betalactamasas pertenecientes al grupo 1 según la clasificación de Bush-Jacoby y Medeiros. Estas enzimas son activas frente a las penicilinas, las cefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima) y pueden hidrolizar a las cefamicinas (cefoxitina) y monobactámicos (aztreonam). Estas enzimas se caracterizan por ser resistentes a las combinaciones de las penicilinas con inhibidores de betalactamasas (7).

Ciertas enterobacterias poseen de manera natural betalactamasas tipo AmpC cromosómica inducible, tal es el caso de *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* y *Hafnia alvei*; mientras que otras como *E. coli* y *Shigella* spp. también poseen betalactamasas AmpC cromosómicas pero constitutivas (33, 41).

III. MARCO TEÓRICO

Clasificación según localización y expresión del gen AmpC (42).

1. AmpC cromosómicas inducibles: Se producen a bajos niveles de manera natural y aumentan su síntesis en presencia de inductores (betalactámicos). Pueden desreprimirse, perdiendo así la característica de inducción.
2. AmpC cromosómicas no inducibles (constitutivas): Su expresión es a niveles muy bajos sin mostrar resistencia. Cuando se encuentran hiperproducidas pueden conferir resistencia a todos los betalactámicos a excepción de cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos.
3. AmpC plasmídicas inducibles y AmpC plasmídicas constitutivas: La evidencia molecular sugiere que los genes que codifican a estas enzimas, derivan de los genes AmpC cromosómicos que naturalmente poseen las enterobacterias arriba mencionadas. Estos genes se integran en elementos genéticos transferibles lo que facilita la diseminación a diferentes microorganismos. Los genes AmpC mediados por plásmidos se describen en bacterias como *Salmonella* spp., *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis* que naturalmente no poseen estos genes, hasta el momento se describen más de 20 familias de AmpC plasmídicas.

Carbapenemasas

El surgimiento de las BLEE y su rápida diseminación, provocó un aumento considerable en el uso de los carbapenémicos que se convirtieron en el tratamiento de elección de las infecciones ocasionadas por las mismas (32). Las carbapenemasas surgen como consecuencia del esfuerzo de los microorganismos por sobrevivir ante la nueva opción terapéutica, las mismas son capaces de hidrolizar a la mayoría de los betalactámicos, incluidos los carbapenémicos (43).

La resistencia a las moléculas de carbapenémicos en enterobacterias está mediada por dos mecanismos principalmente: uno es, la asociación de hiperproducción de BLEE y AmpC que tienen bajo nivel de actividad hidrolítica

III. MARCO TEÓRICO

sobre los mismos con alteraciones o pérdidas de las porinas y el otro, la producción de carbapenemasas (22). El origen y la secuenciación nucleotídica de las carbapenemasas es muy versátil y actualmente se conocen más de 30 familias agrupadas en las clases A, B y D de Ambler, pero nuevas familias se describen continuamente (44).

Clasificación

1. Serín-carbapenemasas: son betalactamasas plasmídicas del grupo A de Ambler, que se inhiben por la acción del ácido clavulánico e hidrolizan de forma efectiva a los carbapenémicos, con mayor actividad frente imipenem (45). Estas pueden ser cromosómicas (NmcA, Sme, IMI-1, SFC-1) y plasmídicas (KPC, IMI-2, GES), KPC es clínicamente la enzima más importante del grupo (14).
2. Metalobetalactamasas (MBL): pertenecen al grupo B de la clasificación de Ambler y son un desafío importante tanto en el tratamiento individual de los pacientes como en la aplicación de las políticas de control de la infección (37). Presentan actividad hidrolítica frente a los betalactámicos excepto aztreonam, no se inactivan por ningún inhibidor de betalactamasas y se inhiben por agentes quelantes de cationes divalentes como el EDTA, compuestos tiólicos como el ácido 2-mercaptopropiónico o el ácido dipicolínico (14). De este grupo las tipo IMP y VIM son las más frecuentes, aunque la *New Delhi Metalobetalactamasas* (NDM) por el perfil de multirresistencia o panresistencia de los aislados que la producen generó una alarma mediática importante (44).
3. Oxacilinasas (OXA): se encuentra en el grupo D de la clasificación de Ambler. Entre ellas se destacan las variantes de los subgrupos OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143 y OXA-48 descrita en enterobacterias en países del mediterráneo. Fenotípicamente son difíciles de identificar ya

III. MARCO TEÓRICO

que su perfil de actividad frente a los carbapenémicos es débil y casi nulo frente a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (37).

III.6.2 Resistencia a otras familias de antimicrobianos

a. Resistencia a quinolonas

Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos sintéticos como el ácido nalidíxico y las quinolonas fluoradas (norfloxacino, ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino), cuyo espectro de actividad se centra en las bacterias gramnegativas (37).

En las bacterias gramnegativas las quinolonas inhiben a las enzimas Topoisomerasa II (ADN girasa) y Topoisomerasa IV, responsables de la replicación del ADN bacteriano. Estas enzimas están formadas por 2 subunidades A y B y se codifican en los genes *gyrA* y *gyrB* (ADN girasa) y *parC* y *E* (Topoisomerasa IV) (46).

Principales mecanismos de resistencia descritos (33):

1. Mutaciones en los genes de la ADN girasa y la Topoisomerasa IV.
2. Mutaciones que afectan las porinas o los lipopolisacáridos impidiendo la penetración del antimicrobiano al interior de la bacteria.
3. La presencia de bombas de expulsión que bombean al antimicrobiano al exterior de la célula.

En 1998 se documenta, por primera vez, en EE.UU la resistencia plasmídica mediada por el plásmido *qnrA* en cepas clínicas de *K. pneumoniae* (47). Posteriormente, en la familia *Enterobacteriaceae*, se describen otros dos plásmidos determinantes de resistencia a quinolonas el *qnrB* y el *qnrS*, los que provocan un incremento de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por la inhibición de la ADN girasa (48).

III. MARCO TEÓRICO

Existen otros determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas como los genes que median las bombas de expulsión activa (QepA y OqxAB) y la variante de la aminoglucósido-acetiltransferasa (AAC(6')-Ib-cr) capaz de acetilar a ciprofloxacino, norfloxacino, amikacina, kanamicina y tobramicina. Aunque la resistencia a quinolonas mediada por genes plasmídicos es de bajo nivel, se observa, que tanto *in vitro* como *in vivo* facilitan la selección de mecanismos adicionales de resistencia (46, 49).

En los últimos años se reporta un incremento de la resistencia a las quinolonas en aislados productores de BLEE que portan los genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB* o, *qnrS*), QepA o AAC(6')-Ib-cr, y confieren resistencia de bajo grado a estos antibióticos. Estos genes se localizan en plásmidos y se describen en distintas especies de enterobacterias (46).

b. Resistencia a los aminoglucósidos

Los antibióticos aminoglucósidos son un grupo de antibacterianos con propiedades para el tratamiento de infecciones bacterianas, particularmente aquellas producidas por bacilos gramnegativos aeróbicos (49).

Mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos (46, 49)

1. Alteración del sitio diana: por mutación de los genes ribosomales o de ARN 16S.
2. Reducida acumulación intracelular de aminoglucósidos: fundamentalmente por impermeabilidad de la membrana externa que determina niveles intermedios de sensibilidad a esta familia de antimicrobianos. También se describe la resistencia mediada por eflujo, sin embargo, la importancia clínica de este tipo de mecanismo de resistencia, parece poco trascendente.
3. Inactivación de los compuestos por enzimas modificantes de aminoglucósidos: es el mecanismo más estudiado y frecuente, estas enzimas se dividen en tres grupos: *Aminoglucósido-acetiltransferasa* (AAC),

III. MARCO TEÓRICO

Aminoglucósido-adeniltranferasas (AAD, actualmente se designan como ANT) y enzimas nucleotidiltransferasas y *Aminoglucósido-fosfotransferasas* (APH).

Del grupo de EMA, vale la pena resaltar a las AAC (6')-Ib y a las 16S rARN metilasas, las cuales confieren resistencia a varios aminoglucósidos y se reportan como mecanismos de resistencia asociados a las proteínas Qnr y la bomba de salida QepA (50). Los genes responsables de la producción de estas metilasas por las bacterias se encuentran en plásmidos que portan otros genes de resistencia, lo cual lleva a patrones de multirresistencia en bacterias gramnegativas (50).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1 Diseño metodológico

Durante los meses de enero a septiembre del 2016 se desarrolló un estudio retrospectivo de tipo descriptivo en el cual se incluyó un total de 147 aislados de *K. pneumoniae* (134 productoras de BLEE, tres de KPC y 30 sospechosas de producir betalactamasa de tipo AmpC), correspondientes a la colección de *Klebsiella* spp. del LN-IAAS recibidas entre Junio 2011 y Julio 2012, procedentes de 17 hospitales de 8 provincias del país.

Para ello se revisó la base de datos creada al efecto de la vigilancia nacional del género *Klebsiella* en este laboratorio y se extrajo la siguiente información: tipo de muestra, tipo de servicio y susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de BLEE y KPC. También se recogió el comportamiento de la susceptibilidad al cefoxitin en los aislamientos de *K. pneumoniae* y se le realizó la prueba de AmpC a aquellos que sospechosos de producir esta enzima.

IV.2 Operacionalización de las variables

1. Servicio médico: Cualitativa nominal

Definición: Servicio que se ofrece para la prevención, el mantenimiento, o la recuperación de la salud.

Escala de clasificación: Unidad Cuidados Intensivos, Medicina, Cirugía, Neonatología, Ginecología, Nefrología, Hematología, Hemodiálisis, Neurocirugía, Oncología, Consulta externa y otros.

Medida de resumen: Frecuencia relativa

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

2. Tipo de muestra: Cualitativa nominal.

Definición: Porción o volumen de cualquier material, incluyendo, entre otros, excreciones, secreciones, sangre y sus componentes, líquidos corporales, tejidos y fluidos tisulares que obtenemos del paciente o portador. Producto patológico. Este término también se conoce como muestra clínica. El tipo de muestra está en dependencia del lugar anatómico donde se recolecta.

Escala de clasificación: Hemocultivo, catéter, líquido cefalorraquídeo, exudado ótico, secreciones de piel, urocultivo, secreción de herida, esputo, secreción bronquial y otras.

Medida de resumen: Frecuencia relativa.

3. Categorías clínicas de pruebas de susceptibilidad: Cualitativa nominal

Definición: Traducción de la respuesta *in vitro* de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, como factor predictivo de eficacia clínica (17).

Escala de clasificación:

- Sensible: Cuando un aislamiento bacteriano es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el éxito terapéutico.
- Intermedio: Cuando un aislamiento bacteriano es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a un efecto terapéutico incierto.
- Resistente: Cuando un aislamiento bacteriano es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad de fracaso terapéutico.

Medida de resumen: Frecuencia relativa.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4. Producción de BLEE: Cualitativa nominal.

Definición: Enzimas que hidrolizan penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima) y monobactámicos (aztreonam), pero no las cefamicinas (cefoxitina) ni los carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem), y son inhibidas por el ácido clavulánico (37).

Medida de resumen: Frecuencia relativa.

5. Producción de AmpC: Cualitativa nominal.

Definición: Betalactamasas de la clase C de la clasificación estructural de Ambler que se caracterizan por ser activas frente penicilinas y cefalosporinas, pudiendo hidrolizar cefamicinas (cefoxitina y cefotetan), oximinocefaloporinas (ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona) y monobactams (aztreonam) con la excepción de cefalosporinas de cuarta generación (cefepima, cefpiroma) y carbapenémicos. Estas enzimas además son resistentes a la combinación de betalactámico con inhibidores de betalactamasas, con la posible excepción de piperacilina-tazobactam (7).

6. Producción de KPC: Cualitativa nominal.

Definición: Betalactamasa plasmídica del grupo A de Ambler, son prácticamente inhibida por la acción del ácido clavulánico, e hidrolizan de forma efectiva a los carbapenémicos aunque su actividad frente a meropenem es menor que frente al imipenem (17).

IV.3 Procedimiento de laboratorio:

Para investigar la producción de AmpC se procesaron 30 aislados de *K. pneumoniae* que por su expresión fenotípica resultaron presuntivamente sospechosos (resistentes a cefalosporinas incluyendo las de tercera generación, al monobactámico aztreonam y al cefoxitin) (7). Los mismos se extrajeron de la

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

colección del LN-IAAS/IPK, se transfirieron a placas de agar Mc Conkey (Biolife, Italia) y se incubaron a 37°C en aerobiosis durante 18 a 24 horas. Una vez que se corroboró la viabilidad y pureza del cultivo, se procedió a realizar las pruebas para detección fenotípica en 24 de los 30 iniciales pues cinco de los mismos no fueron viables.

IV.4 Detección de betalactamasas de tipo AmpC

Preparación del inóculo

A partir de un cultivo puro de 18 a 24h de crecimiento en agar Mc Conkey, se preparó un inóculo de 3 mL en solución salina estéril (Quimefa, Cuba), se ajustó la suspensión bacteriana hasta que alcanzó una densidad óptica correspondiente a la escala de 0,5 de la escala de Mac Farland (10^8 - 10^9 UFC). (Densimat, bioMérieux, Francia)

Antes de transcurrir 15 minutos del ajuste del inóculo, se introdujo un hisopo estéril dentro de la suspensión bacteriana y se rotó varias veces por las paredes del tubo por encima del nivel del líquido con el fin de eliminar el exceso de inóculo y se inoculó la superficie del medio de agar Mueller- Hinton (Oxoid Ltd.) en tres direcciones, rotando la placa en un ángulo de 60° cada vez sin dejar zona libre, con el propósito de obtener un cultivo homogéneo. Luego de cinco minutos se depositaron los discos con la ayuda de una pinza estéril, presionándolos ligeramente sobre la superficie del agar (máximo seis discos por placa). Las placas se incubaron a 37°C en aerobiosis durante 18-24 horas, colocaron en grupos de cuatro y de forma invertida (51).

La confirmación del fenotipo productor se llevó a cabo por el *ESBL + AmpC* Screen Kit de la casa comercial Rosco Diagnóstica, para lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante (52).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Interpretación:

- Cepa productora de betalactamasa de tipo AmpC: Cuando el halo de inhibición sea ≥ 5 mm en el diámetro para cefotaxima/cloxacilina contra su zona de inhibición para cefotaxima (sin el inhibidor).
- Cepa no productora de betalactamasa de tipo AmpC: donde la diferencia de los halos de inhibición no sea ≥ 5 mm.

Cepa control: *E. coli* ATCC 25 922 (Cepa control negativo)

IV.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se procesaron mediante los programas Microsoft Office Excel 2010 y se expresaron en tablas y gráficos para su mejor interpretación. Se utilizaron medidas de estadística descriptiva como la frecuencia y el porcentaje para el análisis y la presentación de los resultados.

IV.6 Aspectos éticos

La investigación se evaluó por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y de la Comisión de Ética de la Investigación Institucional del IPK con el folio 01-17 y se realizó en el LN-IAAS del IPK. Los datos referentes a todas las cepas objeto de estudio se analizaron a partir de la base de datos existente en este laboratorio, para ello se contó siempre con la autorización de su jefa.

El LN-IAAS es idóneo para la realización de la investigación ya que está climatizado, con agua corriente, adecuada iluminación y cuenta con los recursos materiales indispensables para efectuar el estudio.

El manejo de los aislamientos se llevó a cabo por el Médico Especialista de primer Grado en Microbiología a cargo de la investigación y se supervisó por el tutor de la tesis, que es médico especialista en microbiología con más de 15 años

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

de experiencia y Doctor en Ciencias.

Para el trabajo en el laboratorio se tuvieron en cuenta las prácticas, procedimientos y los equipos de seguridad que corresponden al nivel de seguridad biológica II, según establece la Resolución No. 103 del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA), de fecha 8 de octubre de 2002 (53).

K. pneumoniae entre los agentes biológicos que afectan al hombre que pertenece al grupo de riesgo II, según establece la Resolución No. 38 del mismo organismo, del 24 de marzo de 2006, por lo que representa riesgo individual moderado y comunitario limitado (54).

IV.7 Factibilidad

Todos los recursos requeridos para la realización de este trabajo están disponibles en el LN-IAAS/IPK del Departamento de Bacteriología-Micología.

IV.8 Recursos humanos y materiales

Humanos:

- Médicos especialistas en Microbiología
- Técnicos en Microbiología
- Bioestadístico

Materiales:

- Placas Petry, tubos de ensayo y otra cristalería
- Medio de cultivo
- Incubadora

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

- Asas y agujas
- Gabinete de seguridad biológica
- Freezer a -70°C
- Láminas portaobjetos
- Microscopio
- Reactivos bioquímicos
- Aplicadores
- Discos de antibiograma y tiras de *E-test*
- Regla

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La rápida diseminación de los mecanismos emergentes de resistencia es una amenaza grave para la salud pública mundial. La elección de un tratamiento empírico adecuado exige el conocimiento de las variables microbiológicas de cada región; por lo que es indispensable mantener una vigilancia estricta de las bacterias multirresistentes (55).

K. pneumoniae forma parte del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*), que mundialmente se reconoce por su multidrogorresistencia (56). Por tal motivo el monitoreo continuo de la susceptibilidad antimicrobiana de este patógeno y la identificación de los mecanismos de resistencia, principalmente las betalactamasas, es una herramienta eficaz en la lucha para su contención.

Durante el período de estudio, del total de aislados de *K. pneumoniae* (n=30) sospechosos de producir AmpC, solo fueron viables 24 y de ellos 15 (62%) resultaron positivos. En nueve de los aislados productores de AmpC se encontró asociación de este mecanismo con BLEE, en dos con KPC y en ninguno coexistieron los tres mecanismos. La figura 1 muestra la distribución de los aislados de *K. pneumoniae* según la producción del tipo de betalactamasas.

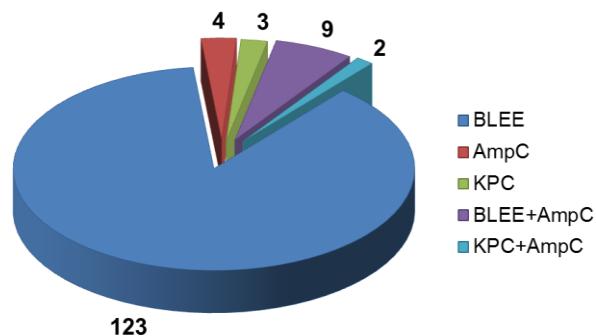


Figura 1. Distribución de los aislados de *K. pneumoniae* según tipo de betalactamasas. IPK, 2016

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de que existen varias técnicas para la detección de AmpC, el CLSI no cuenta con criterios estandarizados para la identificación fenotípica de estas enzimas y la prevalencia real se desconoce (51, 57). Este es el primer estudio sobre la detección fenotípica de este mecanismo que se realiza en aislados de *K. pneumoniae* varios hospitales de cubanos. Los resultados del presente estudio mostraron porciones de AmpC superiores a los que se reportan en Turquía (19%), en Irán (28%) y en la India (22-27.5%) (58-60).

Las betalactamasas de tipo AmpC y las BLEE pueden coexistir pero la identificación se dificulta porque una enmascara a la otra ya que ambas causan el incremento de la CIM a las cefalosporinas y no siempre se afecta el cefoxitin (58). Aunque la notificación de las AmpC plasmídicas es global estas enzimas son menos frecuentes que las BLEE (61). Sin embargo, el impacto terapéutico de las primeras es mayor porque estas confieren resistencia a casi la totalidad de los betalactámicos y quedan solamente disponibles los carbapenémicos (41).

El número de aislados donde se encontró la combinación de AmpC y BLEE en esta investigación es similar al que reportan Meyer y Ulrich en Brasil (2011) y Jikun y colaboradores en China (2014) (62, 63). Sin embargo Manoharan y colaboradores en la India notifican la coproducción de BLEE y AmpC en 92% de los aislados estudiados (64).

La asociación de betalactamasas (BLEE y/o AmpC cefalosporinas) con baja actividad sobre los carbapenémicos y pérdida de la permeabilidad de las membranas puede reducir la susceptibilidad a los mismos. Sin embargo, es la producción de carbapenemasas con o sin pérdida de la permeabilidad el principal mecanismo de resistencia estos en *K. pneumoniae* (22).

Las infecciones por microorganismos en los que se determine que el mecanismo responsable de resistencia a los carbapenémicos sea la combinación de betalactamasas con pérdida de la permeabilidad de las membranas, se pueden tratar con los mismos según su patrón de susceptibilidad. En contraste, en los que

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

el mecanismo identificado sea la producción de carbapenemasas la utilidad terapéutica de los carbapenémicos se pierde, de ahí la importancia de dilucidar entre un mecanismo y otro (65).

En el presente estudio se encontró la combinación de KPC y AmpC en dos aislados. Este es un hallazgo de importancia extrema ya que las primeras inactivan a los carbapenémicos los cuales son el tratamiento de elección en las infecciones por enterobacterias multirresistentes (productoras de BLEE y AmpC) (24). Por tanto, la asociación de carbapenemasas con cualquier otro tipo de betalactamasas reduce sustancialmente las opciones de tratamiento, lo que se traduce en un incremento de la mortalidad, de la estadía y los costos hospitalarios.

Las KPC son betalactamasas de la clase A de Ambler con un amplio espectro de inactivación antimicrobiana (22). Cheng y colaboradores en China (2016), en un estudio de prevalencia de mecanismos de resistencia en aislados de *K. pneumoniae* productora de KPC, demuestran que la combinación más frecuente es de KPC y BLEE; sin embargo, reportan la producción de AmpC plasmídica en dos aislados productores de KPC (66).

La figura 2 muestra la distribución de betalactamasas según el tipo de muestras y el servicio. En esta se aprecia las infecciones del torrente sanguíneo, del tracto respiratorio, del tracto urinario y de la herida quirúrgica como las más frecuentes, lo cual evidencia la invasividad de *K. pneumoniae* productora de betalactamasas.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

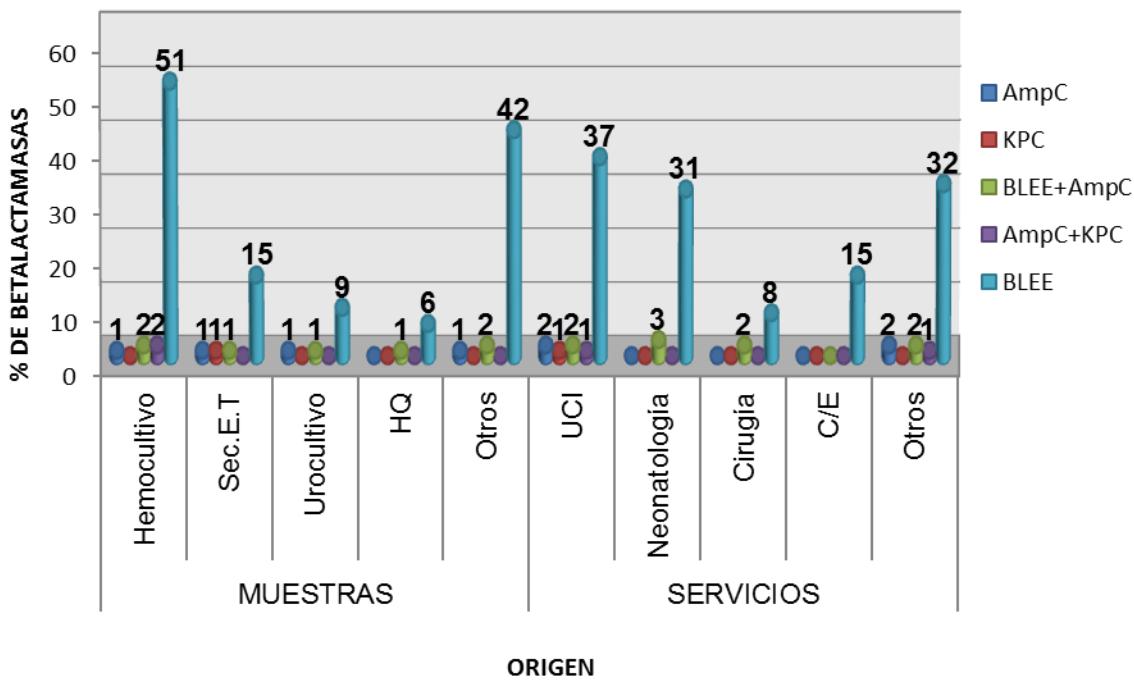


Figura 2. Distribución de betalactamasas según muestras y servicios. IPK, 2016

La producción de betalactamasas es el mecanismo más frecuente de resistencia en la familia *Enterobacteriaceae* y *K. pneumoniae* está entre las tres primeras causas de IAAS por gramnegativos, especialmente, septicemia, neumonía, infección del sitio quirúrgico e infección urinaria (22, 24).

En Singapur, Yen y colaboradores (2009) plantean que las muestras de sangre y orina aportan el mayor número de *K. pneumoniae* productora de AmpC (67). También Karadiya y colaboradores en la India en un estudio de prevalencia de betalactamasas en *K. pneumoniae* reportan que las muestras más frecuentes de donde obtienen las betalactamasas de tipo AmpC son la secreción endotraqueal (4), la orina (2) y la sangre (2), (57).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El hecho de que el mayor número de aislados productores de AmpC tanto individual como en combinación con BLEE o KPC se recuperó de infecciones invasivas, es alarmante si se tiene en cuenta la actividad hidrolítica de estas enzimas. Pues se trata de pacientes inmunológicamente comprometidos para los cuales las opciones terapéuticas se reducirán considerablemente, lo que a su vez incrementará las tasas de morbilidad y mortalidad como consecuencia de infecciones por *K. pneumoniae* productora de betalactamasas.

Desde 1990 la expresión de BLEE en la familia *Enterobacteriaceae* se convirtió en una epidemia en los hospitales de Latinoamérica, donde en *Klebsiella* spp. la prevalencia de este mecanismo en aislados de sangre es 43% y en orina 45% (25). En Cuba, los resultados de la vigilancia nacional notifican que la secreción de herida quirúrgica, la sangre, las secreciones respiratorias y la orina son las principales fuentes de *K. pneumoniae* productoras de BLEE (68).

En cuanto al tipo de servicio en la figura 2 se observa que los servicios de atención al grave (UCI y neonatología) fueron los más afectados por aislados productores de estos mecanismos de resistencia.

Klebsiella spp. es un patógeno oportunista que puede permanecer en las superficies inanimadas hospitalarias y las manos del personal de salud por largos períodos de tiempo y son estas últimas el vehículo fundamental de transmisión y de la ocurrencia frecuente de brotes (17, 69, 70). Esto justifica que el ambiente hospitalario sea la fuente principal de betalactamasas en esta investigación.

En el presente estudio la UCI fue el servicio que más se afectó por la producción de betalactamasas. Lo que se puede explicar porque es precisamente este servicio donde la suma del uso de antibiótico y del número de pacientes inmuno-deprimidos, crea un medio susceptible para la propagación de patógenos oportunistas y el desarrollo por estos, de mecanismos de resistencia (55). Además los pacientes con un mayor riesgo de desarrollar una infección o colonización por *K. pneumoniae* productoras de betalactamasas son aquellos con estancia

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

prolongada en una UCI, los transplantados, uso de ventilación mecánica, de catéteres endovenosos y uso previo de antibióticos de amplio espectro (71).

El 60 % de los recién nacidos internados en neonatología reciben terapia antimicrobiana (23). Por tanto el hecho de que el servicio de neonatología fuera uno de los más afectados por las betalactamasas representa una exigencia de respuesta inmediata por el personal de salud para lograr asistir el problema creciente de la resistencia a los antimicrobianos hasta lograr su contención.

Quiñones y colaboradores en el primer estudio como parte de la vigilancia nacional de *Klebsiella* spp. en el período 2010-2011, reportan que la UCI (24.4%), cirugía (9%) y neonatología (6%) fueron los servicios más afectados por *K. pneumoniae* productora de BLEE (68). La presente investigación ratifica esta situación epidemiológica.

Las bacterias productoras de carbapenemasas KPC tiene la capacidad de causar brotes con altas tasas de falla terapéutica y una mortalidad de hasta 50%, principalmente en pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados por largos períodos en UCI (43). Lo que reafirma la necesidad de aunar esfuerzos para evitar el incremento de este mecanismo en nuestro medio.

A nivel mundial el mayor número de brotes por KPC ocurre en las UCI, como lo notifican el primer reporte de caso de KPC en Perú (72), Bustos y colaboradores, en Colombia (71) y Cheng y colaboradores, en China (66).

Afortunadamente, ninguno de los aislados productores de KPC perteneció al servicio de neonatología. No obstante, hay países como Venezuela, en los que se reporta hasta 64% de aislados positivos en este servicio (26). Por tanto es importante mantener la vigilancia de este mecanismo, por su capacidad de diseminación y la elevada mortalidad asociada (43).

Durante el período de estudio ninguno de los aislados de *K. pneumoniae* productores de AmpC y KPC fue de origen comunitario. Sin embargo en 15 (12%) de los aislados productores de BLEE no se constató síntomas en las 48 horas

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

previas al ingreso y no existió contacto con los hospitales en los últimos seis meses, por tanto fueron considerados de origen comunitario.

El porcentaje de BLEE que se obtuvo en pacientes ambulatorios, no es nada despreciable, si se tiene en cuenta que hasta hace unos años este mecanismo se consideraba como un problema netamente hospitalario (73). En la actualidad, la epidemiología de las BLEE se caracteriza por un aumento importante de su prevalencia en la comunidad, especialmente, por enzimas de la familia CTX-M. Este clon se asocia frecuentemente con infecciones del tracto urinario y pueden originar desde infecciones no complicadas hasta bacteriemia de origen urinario (30).

La transmisión plasmídica de este mecanismo y la capacidad de *K. pneumoniae* de sobrevivir por largos períodos de tiempo en superficies inanimadas y en las manos del personal de salud, facilita no solo que se propague entre una bacteria y otra sino también entre varios sitios de un mismo hospital e incluso entre ciudades y países (69).

Estos aislados productores de BLEE fueron mayoritariamente de muestras de orina y respiratoria. Cada vez son más frecuentes las infecciones urinarias y neumonías en la comunidad por microorganismos productores de BLEE, lo que probablemente se deba a que los mismos parten colonizar la microbiota normal del tracto gastrointestinal y la nasofaringe del hombre (73).

En Cuba, Quiñones y colaboradores en 2013 reportan que 26% de los aislados de *K. pneumoniae* productor de BLEE son de origen comunitario (68). Boix y colaboradores en España en un estudio de infecciones del tracto urinario por *K. pneumoniae* en la comunidad, notifican un incremento de las BLEE del 2.4% al 10.3% en un período de cuatro años (74). Tejeda y colaboradores en un estudio de infecciones por enterobacterias productoras de BLEE de aislados comunitarios, en Perú, reportan a *K. pneumoniae* como la más frecuente (28.7%) (75).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La detección de BLEE en aislados comunitarios ratifica la necesidad de intensificar medidas que garanticen su contención tanto en la comunidad como en el hospital, ya que la presencia de las mismas induce al uso de antibióticos más costosos y muchas veces más tóxicos.

El conocimiento y la sistematización de los aspectos clínicos, epidemiológicos y microbiológicos de las infecciones favorecerán la elaboración de protocolos terapéuticos que sustenten las bases fundamentales del uso racional de antibióticos. Por lo cual las investigaciones que aporten datos sobre el comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana y los principales mecanismos de resistencia que circulan en un país son una herramienta de gran valor para la contención de la resistencia a los antimicrobianos.

El problema de la multirresistencia entre los bacilos gramnegativos es especialmente preocupante ya que son resistentes a casi la totalidad de los antibióticos, lo cual limita las opciones terapéuticas de estas infecciones (30).

En la figura 3 se reflejan los porcentajes de susceptibilidad de *K. pneumoniae* productor de BLEE, AmpC y KPC a los diferentes antimicrobianos. Como se puede apreciar, los carbapenémicos y la colistina son los antimicrobianos con mayor actividad sobre las cepas productoras de BLEE y AmpC con más de un 70% de sensibilidad. En cambio, para los tres aislados productores de KPC solo fue efectiva la colistina.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

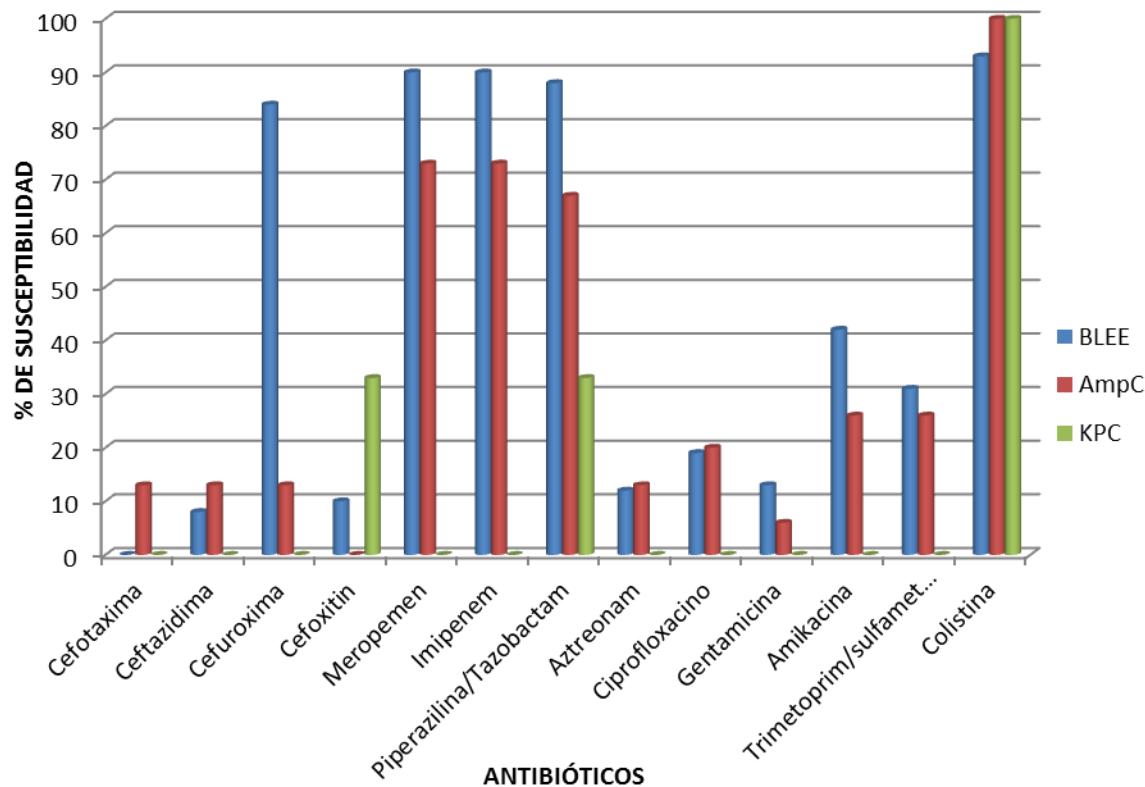


Figura 3. Susceptibilidad antimicrobiana en los aislados de *K. pneumoniae* productores de BLEE, AmpC y KPC. IPK, 2016

La baja sensibilidad encontrada para las cefalosporinas y el aztreonam entre los aislados productores de BLEE, AmpC y KPC, se corresponde con la actividad hidrolítica de estas enzimas y demuestra la ineficacia de estas drogas en el tratamiento de infecciones por microorganismos productores de estos tipos betalactamasas.

Entre las familias que muestran el fenotipo BLEE, CTX-M es la enzima más común (55). Las mismas se suelen inhibir más fácilmente con tazobactam que con ácido clavulánico y es por esto que en este grupo las tasas de susceptibilidad a piperazilina/tazobactam suelen ser menores (68). El hecho de que más del 80% de los aislados productores de BLEE en presente investigación sean sensible a

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

este antibiótico se pudiera deber a que el tipo CTX-M sea circula en nuestro país (68).

A pesar de la buena actividad *in vitro* que se encontró a la piperazilina/tazobactam, la experiencia clínica con las combinaciones de antibiótico betalactámico/inhibidor de betalactamasas en el tratamiento de las infecciones graves por microorganismos productores de BLEE es limitada y los resultados son diversos. Además, algunos estudios en animales demuestran que la eficacia clínica en el tratamiento de estas infecciones es menor que la de los carbapenémicos, por lo cual solo se recomiendan en el tratamiento de las infecciones no complicadas del tracto urinario (76).

Es importante destacar que se encontró bajos porcentajes de sensibilidad para las ciprofloxacina, gentamicina, amikacina y trimetoprim/sulfametoaxazol orientan a no usarlos de forma empírica en el tratamiento de las infecciones graves por *K. pneumoniae* productora de BLEE. Además, estos resultados se pueden deber a que las mismas son enzimas de transmisión plasmídica en cuyos plásmidos se transportan genes de resistencia a otras familias de antibióticos como quinolonas, aminoglucósidos y trimetoprim/sulfametoaxazol (30).

En *K. pneumoniae* la resistencia a quinolonas se asocia al uso previo de las mismas. Además, cada vez es más frecuente la corresistencia entre fluoroquinolonas y trimetoprin/sulfametoaxazol probablemente por la diseminación de integrones que albergan genes de resistencia a estos dos grupos de antibióticos (19). En la literatura internacional varios autores de Cuba, Perú y la India notifican una sensibilidad menor de 50% a estas familias de antibióticos en los aislados de *K. pneumoniae* productores de BLEE (41, 68, 75).

La mejor actividad antimicrobiana *in vitro* se encontró para los carbapenémicos y la colistina con más de 90% de sensibilidad lo cual ratifica su eficacia en el tratamiento de las infecciones graves por *K. pneumoniae* productora de BLEE.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde la aparición de estas enzimas en la década de los ochenta, los carbapenémicos se convierten en el tratamiento de elección de las infecciones por los microorganismos que las producen. Sin embargo con la emergencia de las carbapenemasas se compromete cada vez más la efectividad terapéutica de esta familia de antimicrobianos (55).

En este estudio se encontró que la sensibilidad a los carbapenémicos en los aislados productores de BLEE fue de (90%) estos porcentajes son inferiores a los que reporta el primer estudio de vigilancia nacional en hospitales cubanos, que informa un solo aislado resistente en el que no se constata la producción de KPC (68). En el presente estudio en ninguno de los aislados productores de BLEE coexistió la producción de KPC, sin embargo otros mecanismos no se investigaron los cuales pudieran ser responsables de que el 10% de los aislados fueran resistentes a los carbapenémicos.

En cuanto a la colistina, recientemente, la OMS lanzó una alerta por la emergencia de resistencia transferible a este antibiótico por el gen *mcr-1*, lo cual es preocupante, ya que en la práctica clínica se considera uno de los últimos (y a veces únicos) agentes efectivos para el tratamiento de bacterias multirresistentes, como las productores de carbapenemasas (77). A pesar de que 93% de los aislados productores de BLEE resultó sensible a colistina el hallazgo de cepas resistentes resalta la necesidad de iniciar la vigilancia de este mecanismo en Cuba.

En relación a los aislados productores de AmpC la sensibilidad para quinolonas, aminoglucósidos y trimetoprim/sulfametoaxazol fue inferior al 30%. Existen varios estudios que reportan poca eficacia *in vitro* de estas familias de antimicrobianos en aislados productores de AmpC: Garout y colaboradores, en Algeria notifican que solo 29% de los aislados fue sensible a la gentamicina y 43% al trimetoprim/sulfametoaxazol Jikun y colaboradores en China obtienen 64% de sensibilidad para la amikacina y 21% para las fluoroquinolonas. Azimi y

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

colaboradores en Theran informan 21% y 9% de sensibilidad para amikacina y trimetoprim/sulfametoazol, respectivamente (63, 78, 79).

La coexistencia en un mismo aislado de betalactamasas y de enzimas responsables de la resistencia a los aminoglucósidos (acetil-transferasas AAC (6')-lb y las 16 S rARN metilasas) y que también pueden generar resistencia a las fluoroquinolonas, es frecuente (80). Por tanto, la baja susceptibilidad que se encontró entre los aislados productores de AmpC tanto a las quinolonas como a los aminoglucósidos esta combinación pudiera ser responsable de la resistencia a los mismos.

En este estudio más de 70% de los aislados productores de AmpC fue sensible a los carbapenémicos lo cual los reafirma como drogas eficaces para el tratamiento de este tipo de infecciones. No obstante, es importante resaltar que aunque las AmpC tienen baja actividad hidrolítica sobre los carbapenémicos una de las principales causas de resistencia a los mismos es la hiperproducción de esta enzima en combinación con pérdida de la permeabilidad de las membranas (22). Lo anterior pudiera explicar la resistencia que se encontró en 23% de los aislados, lo que representa una alerta ante la posibilidad de fracasos terapéuticos en el curso del tratamiento de estas infecciones.

Afortunadamente, la colistina fue activa en 100% de los aislados productores de AmpC. Sin embargo, es importante reservar su uso para aquellas infecciones graves por enterobacterias multirresistentes, en la que la eficacia de los carbapenémicos no esté demostrada (55).

En los tres aislados productores de KPC objetos de estudio se identificó en dos de los cuales la coexistencia de AmpC lo cual podría ser la causa de la resistencia al cefoxitin encontrada en los mismos (57).

En relación a los antibióticos no betalactámicos solamente un aislado fue sensible a ciprofloxacina el cual resultó resistente a la colistina, mientras que los otros dos fueron sensibles a esta última.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aislamiento de bacterias productoras de KPC se considera un importante problema de salud pública por la capacidad de diseminación y elevada mortalidad asociada que presentan (35). En los aislados estudiados, la resistencia no se limitó a carbapenémicos y otros betalactámicos, sino también a otras familias de antibióticos como quinolonas y aminoglucósidos, situación que se puede deber a que estas cepas portan con frecuencia, múltiples genes de resistencia plasmídicos de manera simultánea (43).

De manera general se puede plantear que *K. pneumoniae* productora de betalactamasas es un importante patógeno en algunos hospitales del país, especialmente en UCI y neonatología, que afecta además a la comunidad. Los bajos porcentajes de sensibilidad antimicrobiana, así como la invasividad de las infecciones son factores a tener en cuenta en la repercusión clínica de este patógeno cuyas tasas de infección se pueden incrementar con el tiempo asociado a mayores fallos terapéuticos.

Es importante destacar que en nuestro país la colistina es la única alternativa terapéutica disponible para el tratamiento de las enterobacterias productoras de carbapenemas, ya que en Cuba otras drogas como la tigeciclina y las combinaciones de ceftazidima-avibactam y ceftolozano-tazobactam no están disponibles (81).

VI. CONCLUSIONES

1. Se evidencia la circulación en Cuba de aislados de *K. pneumoniae* productores de betalacatamasas de tipo AmpC y la coexistencia con BLEE y KPC lo cual aumenta su impacto terapéutico al disminuir las alternativas de tratamiento.
2. *K. pneumoniae* productora de betalacatamasas fue causa frecuente de infecciones del torrente sanguíneo e infecciones respiratorias lo que demuestra su invasividad.
3. La UCI y neonatología se ratifican como reservorios importantes de *K. pneumoniae* productora de betalacatamasas, la cual ha logrado expandirse al ambiente extrahospitalario. Esto resalta la importancia de una vigilancia microbiológica ambiental en la Atención Primaria de Salud.
4. Se demostró una baja susceptibilidad antimicrobiana entre los aislados productores de BLEE y AmpC a excepción de los carbapenémicos, lo que evidencia la eficacia de los mismos en el tratamiento de las infecciones relacionadas con estos mecanismos.
5. En los aislados productores de KPC la colistina es el antimicrobiano con mejor susceptibilidad *in vitro*, lo que la ratifica con la droga de elección en el tratamiento de los mismos.

VII. RECOMENDACIONES

- Continuar el monitoreo de la susceptibilidad antimicrobiana en aislados de *K. pneumoniae* productora de betalactamasas para consolidar el conocimiento científico sobre posibles alternativas terapéuticas en las infecciones por este patógeno.
- Realizar la caracterización molecular para conocer los tipos genéticos de AmpC circulantes en Cuba en aislados de *K. pneumoniae*.
- Realizar estudio molecular a los aislados resistentes a colistina para descartar la posible circulación del gen *mcr-1* relacionado con la resistencia trasferible a esta droga.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Robledo CG, Maldonado NA, López JA, Sierra P, Correa LT, Robledo JA. Resistencia a antibióticos en el Valle de Aburrá: resultados del programa de vigilancia en el 2008. *Rev Sal Pùb de Medellín.* 2009;4(1):33-48.
2. Medina D, Machado M, Machado A. Resistencia a antibióticos, una crisis global. *Rev Med Risalda.* 2015;21(1):74.
3. Cervero M, Quevedo S. Estrategia frente a los gérmenes grampositivos y gramnegativos multirresistentes. *JANO.* 2009(1.724):19-21.
4. Jimenez A, Alvarado A, Gómez F, Carrero G, Fajardo C. Factores de riesgo asociados al aislamiento de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de Espectro Extendido en un hospital de cuarto nivel en Colombia. *Biomédica.* 2014;34:16-22.
5. Cantón R, Valverde A, Novais Á, Baquero F, Coque T. Evolución y panorama actual de las BLEE *Rev de Enferm Infect y Microbiol Clin.* 2007;25(2):2-10.
6. Eftekhar F, Rastegar M, Golalipoor M, MansourSamaei N. Detection of Extended Spectrum B-Lactamases in Urinary Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Relation to BlaSHV, BlaTEM and BlaCTX-M Gene Carriage. *Iranian J Publ Health.* 2012;41(3):127-32.
7. Seral C, Gude MJ, Castillo FJ. Emergencia de Betalactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Rev Esp Quimioter.* 2012;25(2):89-99.
8. Diestra K. Caracterización del entorno genético de los genes *bla_{BLEE}* y plásmidos asociados en cepas circulantes de *Escherichi coli* y *Klebsiella pnuemoniae* en España. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2010.
9. Molina JF, Díaz CA, Barrera L, De la Rosa G, Dennis R, Dueñas C, et al. Perfil microbiológico de la Infecciones en Unidades de Cuidados Intensivos de Colombia (EPISEPSIS Colombia). *Med Intensiva.* 2011;35(2):75-83.
10. Echevarri L, Cataño J. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario. *IATREIA.* 2010;23(3):240-9.
11. Cuervo S, Sánchez R, Gómez-Rincón J, Almenares C, Osorio J, Vargas M. Comportamiento de casos de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemas en pacientes con cáncer de un hospital de tercer nivel de Bogotá, D.C. *Biomédica.* 2014;34(1):170-80.
12. Echevarri LM, Atehortúa SL, Robledo J. *Klebsiella pneumoniae* y betalactamasas. Un problema creciente. *Medicina UPB.* 2009;28(2):135-41.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

13. De la Lastra V, Ulloa MT, Pinto ME, Vidal M, Silva F. Serinocarbapenemasas de clase A en enterobacterias. *Rev Hosp Clín Univ Chile* 2010;21:232 - 7.
14. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*. 2011;17(10):1791-9.
15. Morris D, Boyle F, Morris C, Condon I, Delannoy-Vieillard A-S, Power L, et al. Inter-Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 carbapenemase in Ireland. *J Antimicrob Chemother*. 2012 junio;67:2367-72.
16. Carmona Y. Caracterización microbiológica de aislamientos de *Klebsiella* spp. causantes de infecciones en Cuba. IPK, 2011-2012. La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2012.
17. Zallas Illas A. Caracterización microbiológica de *Klebsiella* aisladas en hospitales cubanos [Tesis para optar por el grado de Máster en Bacteriorología-Micología]. La Habana, Cuba: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2012.
18. Hansen D, Aucken H, Abiola T, Poudschun R. Recommended test panel for differnciation of *Klebsiella* species on of basis of trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical test. *J of Clin Microbil*. 2004;42(8):3665-9.
19. Cubero M. Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización de los mecanismos de resistencia de *Klebsiella pneumoniae* [Tesis doctoral]: Univesitat de Barcelona; 2015.
20. Podschun R. UU. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typic methods and pathogenity factors. *Clin Microb Rev*. 1998 Octubre;11(4):589-603.
21. Kristopher SL, Yeh K-M, Lin J-C, Chung C-P, Chang F-Y. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *Lancet Infec Dis*. 2012;12:881-87.
22. Pitout J, Nordmann P, Poriel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):5873–84.
23. Méndez F, Niola F. Microorganismos frecuentes y resistencia antimicrobiana en muestras biológicas en el área de neonatología del hospital "Vicente Corral Moscoso" [Tesis de licenciatura en laboratorio clínico]. Cuenca-Ecuador: Universidad de Cuenca; 2017.
24. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Reviews*. 2017;13(41):252-75.
25. Guzmán M, Labarca J, Villegas M, Gotuzzo E. Extended spectrum B-lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *Braz J Infec Dis*. 2014;18(4):421-33.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

26. Perozo A, Castellanos M, Ling E, Gómez L, Ginestre M, G. R. Presencia de carbapenemasas tipo KCP en aislados clínicos de *K. pneumoniae* de pacientes de unidades de cuidados intensivos. *Kasmera*. 2016;44(1):44-52.
27. Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Johnson JK, Morgan DJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing Bacteria. *South Med J*. 2011 enero;104(1):40-5.
28. Pensamiento L. Determinación de los mecanismos de resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp realizados en el Laboratorio Nacional de Salud durante el período 2002-mayo 2004. Tesis. Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala2006.
29. Cabrera Alaix C, Mejía Otero C. Los mecanismos de resistencia a los antibióticos: ¿Podremos lograr un equilibrio entre el uso y abuso de los anitibióticos y así lograr la disminución de la resistencia bacteriana a estos medicamentos? *Revista Colombiana de Salud Libre*. 2008 junio-enero;3(8):83-104.
30. Ruiz P, Cantón R. Epidemiología de los bacilos gramnegativos multirresistentes. *Rev Esp Quimioter*. 2016;29(1):21-5.
31. Lam S, O'Brien-Simpson N, Pantarat N, Sulisio A, Wong E, Chen Y, et al. Combating multidrug-resistant Gram-negative bacteria with structurally nanoengineered antimicrobial peptide polymers. *Nat Microbiol*. 2016;1:1-11.
32. Gómez J, García-Vázquez E, Hernández-Torres A. Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter*. 2015;28(1):1-9.
33. Navarro F, Miró E, Mirelis B. Lectura interpretada del antibiograma en enterobacterias. *Rev Enferm Infect y Microbiol Clin*. 2010;28(9):638-45.
34. García SB, Rojas M, Rojas M, Calderón B, Quiñones D, Abreu ME. Aislamiento de *Klebsiellas pneumoniae* en pacientes con infecciones intra y extrahospitalarias. *Correo Científico Médico*. 2012;1(1).
35. Martínez L. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. *Rev Méd Valdecilla*. 2016;1(1):17-26.
36. Pantoja K, Segura J, Bettin L, Coriat J, Díez H. Frecuencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Escherichia coli* aisladas de pacientes hospitalizados en una clínica de tercer nivel en Bogotá. *Revista CienciActual*. 2015:1-9.
37. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2011;29(7):524-34.
38. Metwaly Younes A. Molecular diversity and genetic organization of antibiotic resistance in *Klebsiella* species [Tesis para optar por el grado de Doctor en Filosofía]. Edinburgh, Escocia: Universidad de Edinburg; 2010.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

39. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front in Microbiol.* 2012;3(110):1-19.
40. Elgorriaga E, Guggiana P, Domínguez M, González G, Mella S, Labarca J, et al. Prevalencia del determinante de resistencia plasmídica a quinolonas aac(6')-Ib-cr en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas en diez hospitales de Chile. *Rev Enferm Infect y Microbiol Clin.* 2012;30(8):466-8.
41. Naveen C, Sahni B, Bhattacharya C. Therapeutic challenges or ESBLS and AmpC betalactamase producers in a tertiary care center. *Med J Armed Forces India.* 2013;69:4-10.
42. Del Valle D. Betalactamasas de tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Rev Soc Venezol Microbiol.* 2009;29:78-83.
43. Martínez D, Arque Y, Roduifo H, Caña L, García J, González D, et al. Relación clonal y detección del gen blaKPC en cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, en un hospital de Venezuela. *Rev Chil de Infect.* 2016;33(5).
44. Galán J-C, González-Candelas F, Rolain J-M, Cantón R. Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from there is to metagenetic plasticity in the β-lactamases world. *Antimicrob Resist Chemother* 2013;4(9):1-17.
45. Dahmen S, Mansour Wn, Charfi K, Boujaafar N, Arlet G, Boualle`gue O. Imipenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Is Associated to the Combination of Plasmid-Mediated CMY-4 AmpC b-Lactamase and Loss of an Outer Membrane Protein. *Microb Drug Resist.* 2012;18(5):479-81.
46. González A, Nieves B. Resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en dos unidades de cuidados intensivos del Hospital Universitario de Los Andes Mérida, Venezuela, entre 2007 y 2009. *MÉDUS.* 2016;29(2):21-30.
47. Martínez-Martínez L, Calvo J. El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos. *Rev Enferm Infect y Microbiol Clin* 2010;28(2):25-31.
48. Soon H, Kwon I, Hwan J, Jung H, Hyun S, Young J, et al. Prevalence of Plasmid-mediated Quinolone Resistance and its association with Extended-spectrum Beta-lactamase and AmpC Beta-lactamase in *Enterobacteriaceae*. *Korean J Lab Med* 2011;31(4):257-4.
49. Guzmán M, Guzmán F, Salazar E, Albarado L, Rodulfo H, de Donato M. Identificación de genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- en cepas intrahospitalarias de *Klebsiella pneumoniae*. *Rev de la Soc Venezol de Microbiol.* 2016;36(1):10-5.
50. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research Internat.* 2016;2016:1-8.
51. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 26 ed: CLSI supplement M100S.; 2016.
52. Dahiya S, Singla P, Chaudhary U, Sinhg B. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), Metallo Beta Lactamases and AmpC betalactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella* Species. *In J Curr Microbiol App Sci.* 2015;4(9):170-6.
53. Ministerio de Ciencia TyMA. Lista Oficial de los Agentes Biológicos que afectan al hombre, los animales y las plantas. Gaceta Oficial República de Cuba. Resolución Nº 38.; 2006. p. 999-1001.
54. Reglamento para el establecimiento de los requisitos y procedimientos de seguridad biológica en las instalaciones en las que se hace uso de agentes biológicos y sus productos, organismos y fragmentos de estos con información genética., Resolución No. 103 (2002).
55. Salgado P, Gilsanz F, Maseda E. Aproximación terapéutica empírica a la infección por gramnegativos resistentes. Valor de los factores de riesgo. *Rev Esp Quimioter.* 2016;29(Suppl.1):26-30.
56. Behroozian S, Svensson S, Davies J. Kisameet Clay Exhibits Potent Antibacterial Activity against the ESKAPE Pathogens. *mBio.* 2016;7(1):01842-45.
57. Karadiya R, Hooja S, Pal N, Sharma R, Maheshwari R, Mishra R. Prevalence and antimicrobial susceptibility of ESBL and AmpC β -lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from various clinical samples: an emerging threat. . *J Evolution Med Dent Sci.* 2016;5(32):1729-34.
58. Mansouri S, Neyestanaki D, Mostafa S, Halimi S, Beigverdi R, Rezagholerezadeh F, et al. Characterization of AmpC, CTX-M and MBLs Types of β -lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Producing Extended Spectrum β -lactamases in Kerman, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2014;7(2).
59. Japoni A, Ghaznavi E, Belkum A. Characterization of plasmid-mediated AmpC and Carbapenemases among Iranian Nosocomial Isolates of *Klebsiella pneumoniae* using phenotyping an genotyping methods. *Osong Public Health Res Perspect.* 2014;5(6):333-8.
60. Prasad R, Urhekar A. Phenotypic Methods for Detection of AmpC β -lactamase in *Klebsiella* Species. *Med Scien.* 2015;5(5):500-2.
61. Jacoby G. AmpC Beta-Lactamases. *Clin Microbiol Reviews.* 2009;22(1):161-2.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

62. Meyer G, Ulrich P. Fenótipos de betalactamases en *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. *J Bras Patol Med Lab* 2011;47(1):25-31.
63. Jikun D, Peipei L, Helu L, Dongyue L, Hong L, Yuhong D. Phenotypic and Molecular Characterization of Multidrug Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from a University Teaching Hospital, China. *Plos ONE*. 2014;9(4):e95181.
64. Manoharan A, Sugumar M, Kumar A, Jose H, Mathai kD. Phenotypic and molecular characterization of AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. & *Enterobacter* spp. from five Indian Medical Centers. *Indian J Med Res*. 2012;135:359-64.
65. Paciel D, Seija V, Prieto J, Vignoli R, Medina J, Savio E. Enterobacterias productoras de carbapenemas de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa). *Rev Tendencias*. 2011.
66. Cheng L, Cao X, Zhang Z, Ning M, Xu X, Zhou W, et al. Clonal dissemination of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone with high prevalence of oqxAB and rmtB in a tertiary hospital in China: results from a 3-year period. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15(1):20-8.
67. Yen T, Yong L, He J, Hsien T, Yang L. Evaluation of Screening Methods To Detect Plasmid-Mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(1):146-9.
68. Quiñones D, Valverde A, Rodríguez-Baños M, Kobayashi N, Zayaz A, Abreu M, et al. High Clonal Diversity in a Non-Outbreak Situation of Clinical ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the First National Surveillance Program in Cuba. *Microbial Drug Resistance*. 2014;20(1):1-7.
69. Rivera MA. Betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp. aisladas de reservorios inanimados en un hospital del norte del Perú. *Rev Esp Quimioter* 2012;25(2):161-3.
70. Hoenigl M, Valentín T, Zarfel G, Wuerstl B, Leitner E, Salzer HJF, et al. Nosocomial Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Klebsiella oxytoca* in Austria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Abril, 2012;56(4):2158–61.
71. Bustos G, Josa D, Perea J, Gualtero S, Ortiz J, Novoa A, et al. Factores relacionados con el control exitoso de un brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC-2 en una unidad de cuidado intensivo en Bogotá, Colombia. *Infectio*. 2016;20(20):1.
72. Velázquez J, Hernández R, Pamo O, Candiotti M, Pinedo Y, Sacsaquispe R, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. *Rev Soc Peru Med Interna*. 2013;26(4).

VIII. BIBLIOGRAFÍA

73. Pereira A, Fariña N, Vega M, González P, Rodríguez F, Figueredo L. Extended-spectrum-Betalactamases producing enterobacteriaceae isolated from outpatient and hospitalized patients in a private laboratory in Asunción. *Mem Inst Investig Cienc Salud.* 2016;14(1):17-24.
74. Boix L, Pérez J, Badía C, Xercavins M, Obradors M, Rodríguez M, et al. *Klebsiella pneumoniae* productora de CTX-M-15 en infecciones del tracto urinario de origen comunitario: una epidemiología en evolución. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2015;33((Espec Cong 1)):15-426.
75. Tejeda P, Huaracaya J, Melgarejo G, González L, Cahuana J, Pari R, et al. Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional. *An Fac med.* 2015;76(2):161-6.
76. Paterson DL. Tratamiento de las infecciones por microorganismos productores de BLEE. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2007;25(2):60-3.
77. OPS/OMS. Alerta epidemiológica: emergencia de resistencia plasmídica (transferible) a colistina/polimixin B mcer-1 en Argentina. 2016.
78. Gharout A, Touati A, Guillard T, Brasme L, De Champs C. Molecular characterization and epidemiology of cefoxitin resistance among *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal ampC genes from hospitalized and non-hospitalized patients in Algeria: description of new sequence type in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Braz J Infec Dis.* 2015;19(2):187-95.
79. Azimi L, Erajiany G, Talebi M, Owlia P, Bina M, Shojaei A, et al. Phenotypic and Molecular Characterization of Plasmid Mediated AmpC among Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Different Hospitals in Tehran. *J Clinand Diag Research.* 2015;9(4):1-3.
80. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infect* 2008;12(3).
81. Pintado V. Fármacos antiguos y nuevos en el tratamiento de la infección por bacterias multirresistentes. *Rev Esp Quimioter.* 2016;29(1):35-8.

IX. ANEXOS

Anexo I. Modelo de Recolección de datos

Número de entrada: _____ Fecha: _____

No. HC: _____ Edad: _____

Nombre y Apellidos: _____

Tipo de Hospital: _____

Servicio de ingreso: _____

Días de estadía hospitalaria: _____

Ingreso hospitalario previo (especificar tiempo) : _____

Tipo de muestra: _____

Diagnóstico clínico del paciente: _____

Resultados microbiológicos:

Identificación de especie:

Susceptibilidad antimicrobiana:

Otros datos de interés:
