



**Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**

---

**PRESENCIA DE ENTEROBACTERIAS RESISTENTES A CEFALOSPORINAS  
DE ESPECTRO EXTENDIDO Y A CARBAPENÉMICOS EN MUESTRAS  
FECALES DE PACIENTES DE UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL**

**TESIS**

Que para obtener el título de:

**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

Presenta:

**IRAIS ESTEFANNY GUTIÉRREZ PÉREZ**

Asesores: Q.F.B Fernando Tuz Dzib

M. en C. Andrea Angela Becerril Osnaya

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Presencia de Enterobacterias resistentes a cefalosporinas de espectro extendido y a carbapenémicos en muestras fecales de pacientes de un hospital de tercer nivel.**

Que presenta la pasante: Irais Estefanny Gutiérrez Pérez

Con número de cuenta: 307105617 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 12 de Agosto de 2015.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M. en C. Andrea Angela Becerril Osnaya	
<b>VOCAL</b>	Q.F.B. Dulce María Ruvalcaba Sil	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Guadalupe Hernández Torres	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## *Dedicatorias*

### **A mamá:**

Eres una gran mujer, una gran inspiración, la mejor mamá del universo y la mejor amiga, gracias por todo tu apoyo y orientación siempre, por alentarme y siempre tener las palabras exactas, por tus consejos, por escuchar siempre todo lo personal y académico, por siempre confiar en mí y demostrarme que soy capaz de muchas cosas. Sin ti nunca hubiera llegado hasta aquí, nunca me cansaré de agradecértelo. Si me dieran a elegir infinidad de veces a quien elegiría de mamá en cada una de ellas serías tú. ¡Te amo!

### **A papá:**

Te fuiste muy pronto y me encantaría estuvieras aquí, pero sé que desde donde te encuentras estás muy orgulloso de mí, y sé también que estarías contándole a todos sobre este logro: al fin tu niña pequeña se va a titular. Gracias por todo. Te extraño

### **A mi hermano:**

Gerardo a pesar de que siempre te regaño y te grito, siempre cuentas conmigo, gracias por ser mi compañero de juegos, escucharme en todo y por oír siempre mis exposiciones y cosas escolares. Eres un hermano único que no cambiaría por nada.

### **A Guido García:**

Eres un hombre increíble, gracias por estar siempre conmigo en los buenos y malos momentos, por tu apoyo incondicional, por estar en mi vida, por el tiempo compartido que ha sido único y tan especial, por ser tú, por todo tu amor, dedicación y confianza...Por todo lo bueno que aportas en mi vida...Eres mi mejor amigo, un excelente novio, compañero y colega. Humanos como tú aquí no hay ¡I love you!

## *Agradecimientos*

A Dios por permitirme llegar hasta aquí, por acompañarme, por todo su amor durante todos estos años y por darme a la gran familia y poner en mi vida a los amigos que tengo.

Al Q.F.B. **Fernando Tuz Dzib** por aceptarme en el laboratorio, y poder realizar este proyecto dándome todas las facilidades e instrumentos, por sus correcciones y explicaciones.

A la Q.F.B. **Leticia Reyes** por todo el tiempo que te tomaste a pesar de tanto trabajo para explicarme y ayudarme durante el proyecto con cada una de mis cepas tanto en identificar como en la resistencia, siempre resolviendo mis dudas aunque te preguntara mil veces lo mismo, por tu disposición de compartir tu experiencia con todas las bacterias que fuiste encontrando durante la estancia, ya que pude ver como es la vida real en el diagnóstico. ¡Gracias por todo Lety!

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", en especial al departamento de Infectología. A la **Dra. Luz Elena Cervantes** por estar al pendiente sobre este proyecto y tratarme como parte del equipo en el laboratorio, a la **Q.F.B. Pilar Ramos**, **Q.F.B. Julia Martínez** y **M. en B. Violeta Ibarra** por su tiempo y disposición sobre la parte de PCR, siempre ayudándome con mis dudas, **Luis y Fernando** (Harry) por su ayuda, explicaciones y disposición durante la extracción de DNA. Muchas gracias.

A la **M. en C. Andrea Angela Becerril**, muchas gracias por su asesoría, sus consejos, su apoyo y toda la disposición de revisar este trabajo para su mejora, usted es un gran ejemplo a seguir.

A todos los miembros del jurado: **Q.F.B. Dulce Ruvalcaba**, **M. en C. Guadalupe Avilés**, **Q.F.B. Guadalupe Hernández** y **Q.F.B. Alejandro Gutiérrez** por tomarse el tiempo de revisar, corregir y darme sus sugerencias y consejos para que este trabajo mejorara.

A la **UNAM** por aceptarme desde la preparatoria en esta máxima casa de estudios y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por aceptarme y brindarme los conocimientos en esta carrera tan bonita. Muchas gracias a todos mis profesores.

A mis tíos **Maru y Pepe** por estar siempre apoyándonos, por haberme adoptado en su casa, llevarme a la escuela, alimentarme, cargar con la sobrina latosa y por todo lo que hacen por mí (y nosotros), los quiero mucho.

A **Fernanda Larios**, te agradezco infinitamente por todo lo que me ayudaste, me cuidaste y sembraste a esas muchachas resistentes con mis múltiples enfermedades (recuerda nosotras

siempre enfermas), por salvarme en este proyecto, por explicarme cómo funcionaba todo y hasta de tus lactobacilos, por todos esos buenos momentos compartidos de ir tras de ti como pingüinos, por dejarte molestar, por todas esas risas, me dio mucho gusto conocerte ahí porque sin ti creo que hubiera enloquecido, en ti encontré a una amiga ¡Muchas gracias Fer te vas a ir al cielo!

A mis amigos: **Karina Albarrán, Heidi Cleofas, Ali Posada y Denise López**, niñas gracias por todos esos momentos vividos tanto buenos como malos, ustedes son unas grandes amigas, excelentes compañeras y colegas bioquímicas, gracias por todo ese apoyo tanto de amistad como escolar que fue tan valioso. A pesar de la distancia y dificultad para reunirnos nunca olviden que las quiero mucho. **Adriana Vargas**, tú debes estar ahí con ellas porque también te aplica, pero te ganaste otro agradecimiento especial, en verdad muchas gracias por ayudarme en este proyecto a revisar, sembrar, irte tarde por mi culpa, por sufrir lo mismo conmigo, por compartir nuestras aventuras durante el largo viaje, que aunque sé que a veces chocábamos, todo era parte de esta experiencia y créeme que no cambiaría nada, gracias por irte hasta allá conmigo. ¡Te quiero mucho Adri!

**Carlos Jhovani Pérez**, amiguísimo muchísimas gracias por adoptarme, brindarme tu amistad y demostrarme que los amigos son verdaderos y más cuando las cosas estuvieron muy complicadas, me has ayudado mucho en lo académico...te voy a copiar hasta el nombre, gracias también por todos esos momentos que compartimos. **Aislinn Villamil y Marco Morales**, amigos muchas gracias por todo, por siempre estar ahí. Nunca voy a olvidar nuestras aventuras incluido el laboratorio de farmacología que fue el más divertido de todos, ustedes son amigos verdaderos y muy valiosos con los que comparto tanto lo académico como en la amistad. **Angélica Alvarado**, amiga tu sabes lo mucho que valoro tu amistad, porque desde que nos encontramos siempre has estado ahí en las buenas y en las malas, muchas gracias por todo. Los quiero mucho

**Al Instituto Nacional de Salud Pública** por la donación de las cepas control ya que sin ellas no hubiera sido posible terminar este trabajo.

***Este proyecto fue realizado en el  
departamento de Infectología del  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y  
Nutrición “Salvador Zubirán”***



**INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

## ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	IV
1. RESUMEN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. MICROBIOTA.....	2
2.2. FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.....	3
2.2.1. Características generales.....	3
2.2.2. Genética bacteriana.....	3
2.2.3. Virulencia y factores antigénicos.....	4
2.2.4. Importancia clínica.....	6
2.2.5. Diagnóstico.....	7
2.2.6. Tratamiento.....	8
2.3. FAMILIA PSEUDOMONADACEAE.....	8
2.3.1. Características generales.....	8
2.3.2. Genética bacteriana.....	10
2.3.3. Virulencia y factores antigénicos.....	10
2.3.4. Importancia clínica.....	11
2.3.5. Diagnóstico.....	12
2.3.6. Tratamiento.....	12
2.4. RESISTENCIA BACTERIANA.....	13
2.4.1. Definición.....	13
2.4.2. Mecanismos de resistencia.....	13
2.4.2.1. Mecanismos intrínsecos.....	13
2.4.2.1.1. Impermeabilidad.....	13
2.4.2.1.2. Biopelículas.....	14
2.4.2.1.3. Eflujo.....	15
2.4.2.1.4. Inactivación enzimática.....	16
2.4.2.2. Mecanismos extrínsecos.....	16
2.4.2.2.1. Eflujo.....	16
2.4.2.2.2. Modificación del sitio blanco.....	17
2.4.2.2.3. Adquisición de nuevos blancos.....	17
2.4.2.2.4. Inactivación enzimática.....	18
2.4.3. Intercambio de información genética entre bacterias.....	18
2.4.3.1. Mecanismos horizontales de transferencia genética.....	18
2.4.3.1.1. Transformación.....	18
2.4.3.1.1.1. Factores que afectan la transformación.....	19
2.4.3.1.1.2. Pasos de la transformación.....	19



2.4.3.1.2. Transducción.....	20
2.4.3.1.2.1. Tipos de transducción.....	21
2.4.3.1.3. Conjugación.....	22
2.4.3.1.3.1. Tipos de células acopladas en las bacterias.....	23
2.4.3.1.4. Plásmidos.....	24
2.4.3.1.5. Elementos genéticos transponibles.....	27
2.4.3.1.5.1. Transposones.....	27
2.4.3.1.5.2. Integrones.....	27
2.4.3.1.5.2.1 Cassettes genéticos y elementos de 59 pb.....	28
2.4.3.1.5.3. Secuencias de inserción.....	29
2.4.4. Microbiota y resistencia.....	30
2.4.5. Resistencia global.....	31
2.4.6. Resistencia en México.....	32
2.5. ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS.....	33
2.6. β-LACTAMASAS.....	35
2.7. INFECCIONES NOSOCOMIALES O INTRAHOSPITALARIAS.....	37
2.8. DETECCIÓN FENOTÍPICA.....	37
2.8.1. Prueba de combinación de discos.....	38
2.8.2. Prueba de sinergia de doble disco (DDST).....	38
2.8.3. Epsilon-test® (E-test).....	38
2.8.4. Microdilución en caldo.....	39
2.9. DETECCIÓN GENOTÍPICA.....	39
2.9.1. PCR tiempo real.....	39
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	42
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	42
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
5.1. DIAGRAMA DE FLUJO.....	43
5.2. CEPAS BACTERIANAS.....	44
5.3. IDENTIFICACIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA.....	44
5.3.1. Método de CMI por sistema Vitek®.....	44
5.3.2. Método de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en disco.....	45
5.4. PRUEBAS FENOTÍPICAS.....	45
5.4.1. Ensayo de sinergismo.....	45
5.4.2. Sinergismo por E-test.....	46
5.5. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA POR PCR EN TIEMPO REAL de KPC, VIM y OXA-48.....	46
5.5.1. Extracción de DNA por método automatizado NucliSENS® EasyMAG®.....	47
5.5.2. PCR tiempo real.....	48

<b>6.RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
6.1. BACTERIAS AISLADAS E IDENTIFICADAS EN LOS MEDIOS DE MC CON CAZ Y CON MEM.....	50
6.2. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	52
6.3. FENOTIPIFICACIÓN.....	54
6.3.1. Detección de AmpC en Enterobacterias aisladas.....	54
6.3.2. Detección de BLEE mediante prueba de confirmación E-test®.....	56
6.4. GENOTIPIFICACIÓN MEDIANTE PCR TIEMPO REAL.....	57
6.4.1. Detección de $\beta$ -lactamasas: KPC, VIM y OXA-48.....	57
<b>7.DISCUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
<b>8.CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>9.REFERENCIAS.....</b>	<b>70</b>

## ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
AFB	Ácido 3-aminofenilborónico
AMP	Ampicilina
ATM	Aztreonam
<i>attC</i>	Sitio de recombinación del cassette genético del integrón
<i>attI</i>	Sitio de recombinación del integrón
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido (amplio espectro)
CAZ	Ceftazidima
CAZ-CLA	Ceftazidima-Ácido Clavulánico
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CPD	Cepodoxima
CRO	Ceftriaxona
CT/CTL	Cefotaxima/Cefotaxima-Ácido Clavulánico
CTX	Cefotaxima
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
UDG	Uracil ADN-Glicosidasa
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético

DNA	Ácido desoxirribonucleico
E-test	Epsilon test
ETP	Ertapenem
FEP	Cefepima
FOX	Cefoxitina
GI	Gastrointestinal
h	Horas
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
<i>Intl</i>	Gen que codifica la integrasa
IPM	Imipenem
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasa
L	Litro
LGT	Transferencia lateral de genes
LPS	Lipopolisacárido
MC	Agar MacConkey
MEM	Meropenem
MF	Estándar de McFarland
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NA	Ácido Nalidíxico
OMS	Organización mundial de la salud
OXA	Carbapenemasa tipo oxacilinas
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Taq polimerasa	Polimerasa <i>Thermophilus aquaticus</i>
Tns	Transposones
TZ/TZL	Ceftazidima/Ceftazidima-Ácido Clavulánico
VIM	Verona Integron-encoded beta-lactamase

## 1. RESUMEN

La resistencia a los antibióticos es un problema creciente a nivel mundial. En América Latina las bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* comienzan a incrementar su resistencia de manera alarmante, éstas se asocian a infecciones importantes como diarrea, septicemia y neumonía. Los microorganismos han evolucionado, sobrevivido y multiplicado en cepas más difíciles de tratar, lo que puede causar enfermedades graves e incluso la muerte; por lo que es de gran importancia realizar estudios sobre dicho tema. En este trabajo se realizó la identificación de 288 Enterobacterias de diferente género y especie con alta resistencia, aisladas de un medio adicionado con Ceftazidima y Meropenem de un total de 174 muestras fecales de pacientes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición con padecimiento gastrointestinal.

Se determinó la susceptibilidad a diferentes antimicrobianos, mostrándose una elevada tasa de resistencia, posteriormente se hizo la búsqueda fenotípica por prueba de sinergismo de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de clase C: AmpC, encontrándose en el 43% de cepas de *E. coli*, *Enterobacter cloacae complex*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Aeromonas spp.*, junto con esta prueba se utilizó E-test como indicativo de la presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, obteniéndose 13 bacterias con dichas enzimas, finalmente se realizó la búsqueda de 3 carbapenemasas en 50 muestras al azar mediante el uso de PCR en tiempo real, en el caso de KPC no se detectó en dichas bacterias, VIM se aisló en *P. aeruginosa* y finalmente OXA-48 se encontró en *S. maltophilia*, por lo que se concluyó que los pacientes poseen en el tracto gastrointestinal, bacterias que pueden diseminarse tanto a otros pacientes como a personas externas, además de la baja prevalencia de KPC, VIM y OXA-48, lo que demuestra que no son el principal mecanismo de resistencia y dichas bacterias usan diferentes elementos tanto intrínsecos como extrínsecos, pero su presencia y la alta resistencia muestra que se debe llevar a cabo una vigilancia epidemiológica continua de los aislamientos resistentes a Carbapenémicos y Cefalosporinas en los hospitales de México.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Microbiota

El intestino humano es el hábitat natural de una población numerosa, diversa y dinámica de microorganismos, en el que predominan bacterias. El término “microbiota” hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos reunidos en un nicho ecológico determinado (Guarner & Malagelada, 2003). El ecosistema microbiano del intestino incluye especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal, las cuales se adquieren posterior al nacimiento y durante el primer año de vida, y una serie variable de microorganismos vivos que transitan temporalmente por el tubo digestivo que se ingieren continuamente a través alimentos, bebidas, etc. La población microbiana del intestino humano incluye unos 100 billones de bacterias de unas 500 a 1,000 especies distintas (Eckburg *et al.*, 2006).

Se cree que los primeros colonizadores del intestino al nacer son bacterias anaerobias facultativas, incluyendo *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Su propósito es consumir oxígeno y crear un ambiente para los microorganismos anaerobios estrictos que posteriormente poblarán el tracto gastrointestinal (GI) durante la infancia, principalmente Actinobacteria y Firmicutes (Jost, Lacroix, Braegger, & Chassard, 2012; Turróni *et al.*, 2012)

En los adultos, la microbiota intestinal está compuesta principalmente de alrededor de seis o siete *phylum* de bacterias diferentes, en los que dominan Bacteroidetes y Firmicutes; y en menor abundancia se compone de Proteobacteria, Verrucomicrobiota, Actinobacteria y *Euryarchaeota*. (Eckburg *et al.*, 2006)

Entre los diversos grupos bacterianos que colonizan el tracto GI se encuentra la familia *Enterobacteriaceae*. Los miembros de esta familia son los patógenos humanos más comunes, ya que se propagan fácilmente entre humanos siendo la fuente más frecuente de infecciones

comunitarias e intrahospitalarias, las cuales se han aislado en el 83% de los hospitales. (Lescano *et al.*, 2010; Nordmann *et al.*, 2011).

## **2.2 Familia *Enterobacteriaceae***

Incluye muchos géneros y especies. La última edición publicada en el año 2007 del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey* (volumen 2) describe 176 especies entre 44 diferentes géneros. Estas bacterias se encuentran en el medio ambiente y también se considera que son comensales del tracto GI de muchos animales, y de humanos. Algunas son patógenas, mientras que otras son oportunistas. (Delost, 2014; Janda *et al.*, 2009)

### **2.2.1 Características generales**

Son bacilos y cocobacilos Gram negativos, su tamaño va de 0,3 a 1,0  $\mu\text{m}$  de ancho por 0,6 a 6,0  $\mu\text{m}$  de largo, con la mayor colección heterogénea de importancia médica. No forman esporas, anaerobios facultativos y crecen bien en presencia y ausencia de oxígeno. No producen citocromo oxidasa excepto *Plesiomonas*; fermentan glucosa, reducen nitrato a nitrito excepto *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*, y son móviles a temperatura ambiente por flagelos peritricos excepto *Klebsiella*, *Shigella* y *Yersinia*. No son exigentes desde el punto de vista nutritivo, crecen bien en los medios de cultivo convencionales y selectivos como el de MacConkey (MC), que facilitan su aislamiento. A las 18-24 horas de incubación pueden observarse colonias bien desarrolladas, se identifican por sus características metabólicas. (Engelkirk *et al.*, 2008; López Aldegue *et al.*, 2005; Surinder, 2012)

### **2.2.2 Genética bacteriana**

El material genético está formado por un cromosoma que es una larga molécula de DNA bicatenario. Pueden existir fragmentos de DNA de origen exógeno, como bacteriófagos lisogénicos, integrados en el cromosoma, o plásmidos extracromosómicos que pueden vehicular genes relacionados con la patogenicidad o resistencia a antimicrobianos. La

relación entre los miembros de las Enterobacterias se ha basado en la comparación de DNA. (López Aldeguer, J., Prats Pastor, 2005)

El DNA de las especies dentro de la mayoría de los géneros está relacionado entre ellos y con *Escherichia coli* (*E. coli*) en al menos el 20%. Hay excepciones en las especies de *Plesiomonas*, *Yersinia*, *Proteus*, *Providencia*, *Hafnia* y *Edwardsiella* cuyo DNA está relacionado en el 5-20% con las especies de otros géneros. (Brenner & Farmer, 2007)

### 2.2.3 Virulencia y factores antigénicos

La virulencia del género está afectada por muchos factores como es la adherencia, colonización, producción de toxinas e invasión de tejido. Un incremento en el número de cepas clínicas de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) y *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) producen  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), incluyendo carbapenemasas, cefalosporinasas, o metalo- $\beta$ -lactamasas, que pueden inactivar cefalosporinas incluso de tercera y cuarta generación, penicilinas y aztreonam. (Walker *et al.*, 2014)

Factores de virulencia:

- Endotoxinas: Como el lípido A, que son macromoléculas complejas que contienen fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS). Son constituyentes de la pared bacteriana y sólo se liberan cuando la célula muere y se lisa. Su toxicidad reside en la fracción del lípido A del LPS y su especificidad antigénica se localiza en la porción polisacárida. En las Enterobacterias, siempre es el mismo y el polisacárido es variable, y da lugar a los centenares de antígenos O que aparecen en las distintas cepas.
- Cápsula: Especialmente útil para la bacteria como fase protectora que hace más difícil la fagocitosis y con ello da una mayor vida a la bacteria.
- Variación antigénica: Varían sus antígenos y con ello presentan una diferente respuesta inmune para la identificación y respuesta del huésped.
- Exotoxinas: Casi todas son productos que funcionan como enterotoxinas y pueden ser termolábiles o termoestables.



- Factores de adherencia: Entre otros, las fimbrias colaboran de manera importante en la adherencia de la bacteria a la superficie mucosa del huésped. Otro factor importante es la adhesina.
- Localización intracelular: Protege a la bacteria de antibióticos y del sistema inmune al estar localizada en el interior de la célula del huésped. Esta ubicación no es común en Enterobacterias, ya que son extracelulares, pero algunas pueden habitar por algún tiempo en el interior de las células, por ejemplo, las bacterias enteroinvasivas.
- Bacteriocinas: Sustancias contra cepas de la misma especie, pero no contra sí mismas; las principales son colicina y marcelina.
- Flagelos: Su principal función es proporcionar movimiento, por causa de esa motilidad, se les facilita la penetración a tejidos y en ciertos casos desplazarse contra corriente al existir un proceso infeccioso. De esta forma se convierte en un factor de virulencia.

Además de estos factores muchos miembros poseen antígenos que pueden usarse en la identificación de diferentes grupos serológicos:

- Antígeno O, o antígeno somático, es un antígeno termoestable localizado en la pared celular, son en su mayoría polisacáridos o bien, proteínas.
- Antígeno H, o antígeno flagelar, es un antígeno termolábil encontrado en la superficie flagelar, estructura responsable de la motilidad, son de naturaleza proteica y en algunas ocasiones se pueden distinguir antígenos en fase uno y en fase dos.
- Antígeno K, o antígeno capsular, es un polisacárido termolábil encontrado solo en ciertas especies capsuladas, generalmente formados por polisacáridos.

Sin embargo, algunos determinantes antigénicos se encuentran presentes en dos o más especies del mismo género, e incluso en diferentes familias. (Murray, Patrick R. *et al.*, 2009; Romero Cabello, 2007)

## 2.2.4 Importancia clínica

Las Enterobacterias tienen un nicho en común, residen en el tracto GI, excepto *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*. Los seres humanos pueden desarrollar infecciones entéricas de una variedad de situaciones. Pueden estar asociadas con fallas en la higiene personal a través de la vía fecal-oral, saneamiento en países subdesarrollados, o la colonización de la piel y las vías respiratorias de los pacientes hospitalizados. Los seres humanos pueden adquirir estas bacterias a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados, infecciones nosocomiales a través del contacto con los pacientes o el personal de atención de salud o instrumentos médicos contaminados, y de forma endógena a través de su propia biota normal. (Delost, 2014)

Basados en las infecciones que producen pueden estar divididas en dos categorías:

- ◆ Patógenos oportunistas que son a menudo parte la microbiota intestinal, cuando se encuentran fuera de su sitio normal, pueden producir infecciones extraintestinales serias.
- ◆ Patógenos primarios, que incluyen *Salmonella enterica*, *Shigella* spp. y *Yersinia* spp., que son los organismos que producen infecciones por agua y alimentos contaminados. (Walker *et al.*, 2014).

**Tabla 1.** Especies bacterianas e infecciones que comúnmente se producen en el humano (Tomado y modificado de Walker *et al.*, 2014)

Espece bacteriana	Enfermedades
<i>E. coli</i>	Bacteriuria, septicemia, sepsis neonatal, meningitis, síndrome diarreico
<i>Shigella</i> spp.	Diarrea, disentería.
<i>Edwardsiella</i> spp.	Diarrea, infecciones en heridas, septicemia, meningitis, fiebre entérica.
<i>Salmonella</i> spp	Septicemia, fiebre entérica, diarrea.
<i>Citrobacter</i> spp.	Oportunista e infecciones hospitalarias adquiridas (urinarias y heridas)
<i>Klebsiella</i> spp.	Bacteriuria, neumonía, septicemia.
<i>Enterobacter</i> spp.	Oportunista, infecciones hospitalarias adquiridas, infección de heridas, septicemia, bacteriuria
<i>Serratia</i> spp.	Oportunista, infecciones hospitalarias adquiridas, infección de heridas, septicemia, bacteriuria.
<i>Proteus</i> spp.	Bacteriuria, infección de heridas, septicemia
<i>Providencia</i> spp.	Oportunista, infecciones hospitalarias adquiridas, infección de heridas, septicemia, bacteriuria.
<i>Morganella</i> spp.	Oportunista, infecciones hospitalarias adquiridas.
<i>Yersinia</i> <i>Y. pestis</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i> <i>Y. enterocolitica</i>	Plaga Adenitis mesentérica, diarrea Adenitis mesentérica, diarrea
<i>Erwinia</i> spp.	Heridas contaminadas con suelo o vegetación
<i>Pectobacterium</i> spp.	Heridas contaminadas con suelo o vegetación

### 2.2.5 Diagnóstico

Para garantizar el aislamiento de oportunistas y patógenos fastidiosos, es recomendable usar medios de transporte adecuados para la muestra, como Cary-Blair, Amies o medio de Stuart. Posteriormente se cultiva en medios simples, diferenciales (agar eosina y azul de metileno, agar MC y medio de agar desoxicolato), selectivos (agar salmonella-shigella, agar desoxicolato-citrato y agar xilosa-lisina-desoxicolato) o enriquecidos (agar tetrionato de

Müller, agar verde brillante y caldo selenito). La identificación se lleva a cabo por la detección de metabolitos que se manifiestan utilizando: pruebas bioquímicas primarias y secundarias.

También puede realizarse por medio de serología, sistemas comerciales: API 20E (bioMérieux, Francia), BBL Crystal Enteric/NonFermenter ID, Enterotube II (ambos de Becton, Dickinson, MD, E.U), RapID onE y Micro-ID (ambos de Thermo Fisher Scientific, E.U) y sistemas semiautomáticos y automáticos: MicroScan Walkaway (Beckman Coulter, E.U), Vitek (bioMérieux, Francia), Sensititre (Thermo Fisher Scientific, E.U), Phoenix (Becton, Dickinson, MD, E.U) y OmniLog ID con MICROPLACA biolog GN2 (Biolog, Hayward, CA)(Koneman *et al.*, 2008; Romero Cabello, 2007)

## 2.2.6 Tratamiento

El tratamiento depende del sitio de infección, bacteria presente, cuadro clínico y situación del paciente, se le da una terapia sintomática y de ser necesario agua y suero para recuperar los electrolitos perdidos, si éste se encuentra inmunocomprometido o su vida está en riesgo se le suministra una terapia antimicrobiana.(Kayser, 2005)

## 2.3 Familia *Pseudomonadaceae*

### 2.3.1 Características generales

Pertenecientes a la rama  $\gamma$  de las Proteobacterias, misma a la que pertenecen las Enterobacterias. Este género, de la familia *Pseudomonadaceae*, está conformado por una gran variedad de especies que habitan en el suelo y en las aguas estancadas, y forman parte de la biota del intestino de varias especies animales.

El patógeno de mayor importancia médica es *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), ocasionando infecciones nosocomiales y en pacientes inmunodeficientes, y presenta una elevada mortalidad. Los miembros de este género son bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos. La mayoría son móviles por un flagelo polar o por un mechón

formado por dos o tres flagelos. Casi todas las especies poseen fimbrias y pilis. Algunas especies forman una delgada microcápsula compuesta por polisacáridos, no forman esporas y como característica relevante, no fermentan los azúcares. Su metabolismo es oxidativo de tipo respiratorio y son aerobios estrictos. Algunas cepas producen pigmentos. Casi todas crecen en agar MC con colonias lactosa negativa y algunas especies pueden desarrollarse a 4°C, pero la mayoría son mesofílicas. (Romero, 2007)

Algunas especies pueden utilizar los nitritos o la arginina como último aceptor de electrones, lo que les permite crecer en condiciones anaerobias. La mayoría de las especies poseen oxidasa y catalasa, oxidan la glucosa y tienen una gran capacidad para utilizar fuentes de carbono muy diversas. (Martínez, Gómez, & Garau, 2005)

Como es un grupo muy extenso de microorganismos, se han clasificado sobre la base de su homología de DNA y RNA, además de sus características comunes de cultivo, en grupos del I al V.

Grupo I se subdivide en: Grupo fluorescente. Estas especies producen pigmentos amarillo-verdosos e incluye el género *Pseudomonas*, siendo la importante *Pseudomonas aeruginosa*, junto con *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*.

Grupo no fluorescente. Constituido por *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas alcaligenes* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes*.

Grupo II se encuentra el género *Burkholderia*, con las especies *pseudomallei*, *mallei* y *cepacia*.

Grupo III incluye dos géneros: *Comamonas*, y *Acidovorax*

Grupo IV contiene *Pseudomonas diminuta* y *vesicularis*

Grupo V está el género *Stenotrophomonas* (antes llamado *Xanthomonas*) y la especie prototipo es *maltophilia*. Esta especie se ha encontrado frecuentemente en infecciones hospitalarias. (Romero, 2007)

### 2.3.2 Genética bacteriana

Un factor importante es su resistencia intrínseca a los antibióticos y desinfectantes. Es el mayor genoma bacteriano secuenciado con 6.3 millones de pares de bases. En proporción con su tamaño mayor del genoma y la adaptabilidad medioambiental, *P. aeruginosa* contiene la mayor proporción de genes reguladores observados para un genoma bacteriano y un gran número de genes implicados en el catabolismo, el transporte y flujo de salida de compuestos orgánicos, así como cuatro sistemas de quimiotaxis potenciales. El tamaño y la complejidad del genoma de refleja una adaptación evolutiva que permite prosperar en entornos diversos y resistir los efectos de una variedad de sustancias antimicrobianas.(Stover *et al.*, 2000)

### 2.3.3 Virulencia y factores antigénicos

Contienen pilis o fimbrias que se extienden desde la superficie de la célula. En el lipopolisacárido se encuentran las diferencias para la clasificación, se expresan más de un tipo antigénico O al mismo tiempo y su expresión en la membrana externa se relaciona de manera inversa con la producción de alginato: si producen alginato, no expresan el antígeno.

Factores de virulencia que presentan:

- a. Factores de colonización, incluyen a las fimbrias, que se encuentran en todas las cepas y una capa mucosa que se localiza en la superficie de la pared que contribuye al anclaje de la bacteria en las células de los tejidos.
- b. Endotoxina de pared, que como en otros bacilos gramnegativos, es un lipopolisacárido que causa necrosis focal en el sitio de colonización.
- c. Sustancias extracelulares, dos hemolisinas, una es un glucolípido y la otra es una fosfolipasa; ambas llevan a la destrucción total de los eritrocitos de varias especies. Además, dos proteasas, a una de ellas se llama exotoxina "A", y es un polipéptido que está formado por una fracción "A" y otra fracción "B". Ésta última se fija a las células receptoras y la fracción "A" como proenzima, se activa e inhibe la síntesis de las

proteínas por inactivación del factor de elongación. El principal órgano blanco es el hígado. La exotoxina A produce necrosis tisular, se ha identificado también la exotoxina "S" pero el mecanismo aún no está bien aclarado.

En algunas cepas de *P. aeruginosa* se ha encontrado una enterotoxina, que podría explicar la diarrea que se encuentra en pacientes en quienes se aísla esta cepa, predominantemente en las evacuaciones líquidas. Durante la multiplicación, se produce la glucoproteína slime que sirve para la adherencia y colonización; contiene tres proteasas extracelulares:

- 1) Elastasa: Destruye fibras elásticas de las paredes vasculares, degrada complemento, inactiva IgG e IgA, rompe proteínas séricas, inhibe la función neutrófila, inactiva CD4 e interleucina 2 (IL-2), inhibe leucocitos NK y degrada transferrina.
- 2) Proteasa alcalina: Destruye múltiples proteínas como IL-2 y moléculas de adhesión leucocitaria.
- 3) Proteasa IV: Favorece la queratitis.

La lecitina PA-I inhibe el crecimiento de células epiteliales respiratorias. La fosfolipasa C es de dos tipos: una hemolítica (PLC-H) y otra no hemolítica (PLC-N). Ambas degradan fosforilcolina, constituyente de la sustancia tensoactiva pulmonar, intervienen en infecciones respiratorias. La pioverdina actúa como sideróforo para obtener hierro de la transferrina. La piocianina colabora con la competición por hierro, al reducirlo y hacerlo más soluble. Además produce glucolípidos derivados de la ramnosa que estimulan la secreción de mucina, inhiben la fagocitosis por macrófagos y los destruyen. (Martínez *et al.*, 2005; Romero, 2007)

### 2.3.4 Importancia clínica

*P. aeruginosa* puede instalarse en cualquier órgano o tejido (desde una simple herida o quemadura), invadir el oído externo y colonizar las vías urinarias, pulmones, endocardio, córnea y los huesos. De una infección localizada en alguno de esos tejidos, puede diseminarse por el torrente circulatorio, producir septicemias de alta gravedad e instalarse en otros tejidos, dando lugar a procesos supurativos. Estas formas clínicas diseminadas

generalmente son de una elevada tasa de mortalidad, debido a su alta resistencia. Es comensal del intestino en el 10% de individuos sanos, 12% de pacientes externos, 38% de enfermos hospitalizados y hasta 78% entre pacientes hospitalizados con colostomía. (Romero, 2007)

### 2.3.5 Diagnóstico

Se puede hacer la siembra en casi cualquier medio de cultivo, es adaptable a diferentes nutrientes y tolera con facilidad los medios alcalinos. En agar sangre produce una amplia zona de hemólisis  $\beta$ , se observan colonias color gris con brillo metálico, una vez que está la cepa pura, se realizan pruebas bioquímicas que se manifiestan solamente por la utilización de citrato de sodio como única fuente de carbono, además son glucosa y oxidasa positivas, excepto *Stenotrophomonas.*, la mayoría de las demás pruebas son negativas. En todos los medios se puede percibir un aroma que asemeja al de uvas fermentadas o nixtamal, por la producción de trimetilaminas, pigmentación: piocianina, de color azul, pioverdina o fluoresceína, que va de amarillo verdoso a amarillo café. La combinación de pioverdinas amarillas y piocianinas azules dan como resultado el color verde asociado con la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* sobre agares sin colorante. Existen cepas apiocianogénicas que no producen pigmentos. Otras cepas menos frecuentes pueden sintetizar un pigmento rojo soluble en agua llamado piorrubina o pigmento café-negro denominado piomelanina. (Merino, 2007; Romero, 2007)

### 2.3.6 Tratamiento

La gran mayoría de las cepas aisladas son susceptibles a: Amikacina, Gentamicina, Tobramicina, Colistina, Carbenicilina y Ticarcilina. Otros antimicrobianos que pueden utilizarse son: Cefotaxima, Cefoperazona, Ciprofloxacino, Aztreonam e Imipenem. Las cepas adquiridas en la comunidad son más susceptibles que las provenientes del ambiente hospitalario. (Kayser, 2005; Romero, 2007)



## 2.4 Resistencia bacteriana

### 2.4.1 Definición

Es la capacidad que tienen los microorganismos de soportar los efectos de los antimicrobianos a los que originalmente eran sensibles. Los organismos resistentes (bacterias, hongos, virus y algunos parásitos) pueden resistir ataques de medicamentos tales como antibióticos, fungicidas, antivirales y antipalúdicos, de tal forma que los tratamientos convencionales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten, lo que incrementa el riesgo de propagación. La evolución de las cepas resistentes es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se ven expuestos a fármacos utilizados para eliminarlos o controlarlos, y es posible un intercambio de características de resistencia entre ciertos tipos de bacterias. Es una consecuencia del uso de los antimicrobianos, y en particular de su abuso, y surge por mutación o adquisición de genes de resistencia (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2012; Ravi *et al.*, 2014).

### 2.4.2 Mecanismos de resistencia

#### 2.4.2.1 Mecanismos intrínsecos

La resistencia intrínseca es la capacidad innata de una especie bacteriana de resistir la actividad de un agente antimicrobiano en particular a través de características estructurales o funcionales inherentes, lo que permite la tolerancia de un fármaco o una clase de medicamentos. Se transmiten a la progenie verticalmente, se considera una característica natural y heredada consistentemente a partir de plásmidos o genoma de un grupo particular, género o especie. (Vila & Marco, 2007)

##### 2.4.2.1.1 Impermeabilidad

Los antibióticos que afectan a los procesos celulares internos, deben penetrar en la pared celular de las bacterias para alcanzar su objetivo. La afluencia de los antibióticos a través de

la pared celular depende de la naturaleza química del antibiótico y de las características estructurales de la pared celular.

En las bacterias Gram negativas, hay dos estructuras fundamentales de la pared celular que conduce a la resistencia causada por la impermeabilidad: composición de LPS; y la estructura y expresión de proteínas de membrana externa (OMP), llamadas porinas. El análisis molecular revela que la fuerte carga negativa en la región del core de LPS, actúa como una barrera de permeabilidad selectiva para los antibióticos cargados negativamente, lo que resulta en una disminución de susceptibilidad a estos compuestos. Las mutaciones en las cadenas laterales del antígeno O de los LPS pueden cambiar la forma y la carga global de la pared celular, lo que lleva a la disminución de la eficiencia de unión de algunos antibióticos catiónicos. Por lo tanto, la pared celular explica en parte la resistencia intrínseca de las bacterias a los antibióticos.

Las porinas sirven naturalmente como canales de la membrana externa que permiten la afluencia de nutrientes y flujo de salida de los productos de desecho. También sirven para restringir la afluencia de antibióticos y mantener bajas concentraciones intracelulares. Además de alteraciones en la disminución de la producción de porinas o cambios en la estructura reducen su afinidad por un antibiótico que pueden alterar un fenotipo de resistencia. Los patógenos nosocomiales que muestran una disminución o pérdida de la síntesis de porinas se observan a menudo en combinación con otros mecanismos de resistencia, lo que resulta en patógenos resistentes a múltiples fármacos. (Becerra *et al.*, 2009; Tadesse, Daniel A., Shaohua Zhao, 2014)

#### **2.4.2.1.2 Biopelículas**

Son comunidades de bacterias que están unidas irreversiblemente a una superficie sólida e incrustadas en una matriz de exopolisacáridos. Los mecanismos de resistencia asociada a biopelículas parece ser multifactorial, que involucra un sistema complejo de comunicación química célula-célula que varía de organismo a organismo. Así, la

resistencia exhibida por las bacterias cuando crecen en biopelículas no se atribuye generalmente a mecanismos genéticos adquiridos, pero es determinado por las características químicas y físicas de su formación. Los mecanismos genéticos de resistencia parecen caer en factores de resistencia de dos clases generales:

1. Mecanismos innatos: Se activan como parte de la vía de desarrollo de la biopelícula; estos factores son partes integrales de la estructura y fisiología (por ejemplo, disminución de la penetración de antibióticos contra las barreras físicas o químicas, baja de oxígeno y disponibilidad de nutrientes, acompañado por actividad metabólica alterada).
2. Factores de resistencia inducida: Incluye los resultantes de la inducción por el agente antimicrobiano, lo que resulta en la expresión del gen de resistencia diferencial en toda la comunidad. Por lo tanto, puede ser vista como una combinación compleja de metabolismo anabólico innato y mecanismos genéticos inducidos, muchas de las cuales aún deben ser dilucidados. (Tadesse, Daniel A., Shaohua Zhao, 2014)

#### 2.4.2.1.3 Eflujo

Las bombas de eflujo funcionan como proteínas transportadoras para la extrusión de sustancias tóxicas y antibióticos desde el interior de la célula al medio ambiente externo. Naturalmente se producen y están presentes en microorganismos susceptibles y resistentes. Los mecanismos de eflujo pueden conferir resistencia a un agente antimicrobiano en particular o una clase de agentes.

Existen cinco superfamilias de proteínas de bombas de eflujo:

- I. Familia de casete de unión al ATP (ABC, por sus siglas en inglés, *ATP binding cassette*)
- II. Superfamilia del facilitador mayor (MFS, *major facilitator superfamily*)
- III. Familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (MATE, *multidrug and toxic-compound extrusion*)
- IV. Familia de resistencia pequeña a multifármacos (SMR, *small multidrug resistance*)

V. Familia de resistencia a división por nodulación (RND, *resistance nodulation division*).

De éstos, sólo ABC es transportador primario e hidrolizan ATP por ATPasas para proporcionar la energía necesaria para transporte activo de antibióticos y otras moléculas tóxicas, el resto de las familias son transportadores secundarios que utilizan un protón o gradiente de sodio como fuente de energía. RND es única para bacterias Gram negativas. El mecanismo de eflujo de la resistencia intrínseca está situado en el cromosoma y se activa por señales del medio ambiente o por una mutación en los genes reguladores. (Becerra *et al.*, 2009)

#### **2.4.2.1.4 Inactivación enzimática**

Las bacterias pueden producir enzimas que destruyen a los agentes antimicrobianos antes de que sean capaces de alcanzar los objetivos. Es uno de los mecanismos comúnmente adquiridos y de resistencia intrínseca para los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Casi todas las bacterias Gram negativas tienen resistencia cromosómica para la inactivación enzimática de antibióticos de la clase de Penicilina,  $\beta$ -lactamasas de clase C. (Paylan & Durham, 2006)

#### **2.4.2.2 Mecanismos extrínsecos**

Los microorganismos que co-evolucionaron con otros resistentes a antibióticos pueden haber adquirido nuevas funciones en los genes normales para ayudar a desintoxicarse de antimicrobianos. Así, mediante el proceso de la selección natural, pueden adquirir, desarrollar y difundir los determinantes de resistencia y utilizar múltiples combinaciones de resistencia a los antibióticos para sobrevivir a los ambientes tóxicos.

##### **2.4.2.2.1 Eflujo**

Aunque el flujo de salida juega un papel importante en la resistencia intrínseca, cambios en estas proteínas de la pared celular también pueden dar lugar a nuevos rasgos adquiridos. Además, algunas bombas de eflujo se han translocado a los plásmidos, que pueden ser

adquiridos por el intercambio horizontal de genes. En general, estos genes de múltiples fármacos están ampliamente conservados en bacterias y son codificados cromosómicamente. (Becerra *et al.*, 2009)

#### 2.4.2.2.2 Modificación del sitio blanco

Modificación de un sitio puede reducir la afinidad de unión del antibiótico al blanco. Se produce principalmente por mutación cromosómica y por la alteración enzimática de macrólidos, glicopéptidos, y sitios de destino de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel de la DNA girasa (resistencia de quinolonas), del RNAr 23S (macrólidos) de las enzimas PBP's (proteína fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a  $\beta$ -lactámicos). (Becerra *et al.*, 2009; Tadesse, Daniel A., Shaohua Zhao, 2014)

#### 2.4.2.2.3 Adquisición de nuevos blancos

Los microorganismos también se adaptan para volverse resistentes al adquirir dianas celulares con afinidad reducida por el antibiótico, por elementos genéticos móviles. Un ejemplo de la adquisición de un nueva diana por un patógeno, surgió poco después de la introducción de la meticilina en la clínica, como respuesta a la exposición de los efectos tóxicos del antibiótico es *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), evadió su actividad mediante la adquisición de un elemento móvil: cassette cromosómico estafilocócico mec (SCCmec), que le confiere resistencia al fármaco. El elemento de DNA móvil codifica una tríada de genes, *mecR1-mecI-mecA*.

El gen responsable de la resistencia a meticilina es *mecA* y codifica una PBP alternativa: PBP2A (también PBP2A'), una transpeptidasa-transglicosilasa bifuncional con afinidad reducida por antibióticos  $\beta$ -lactámicos incluyendo penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. (Tadesse, Daniel A., Shaohua Zhao, 2014)

#### **2.4.2.2.4 Inactivación enzimática**

La adquisición de las enzimas que desactivan directamente antibióticos es uno de los primeros mecanismos de resistencia identificados en bacterias. Los clásicos ejemplos estudiados son enzimas que median la hidrólisis del anillo de  $\beta$ -lactámico de los antibióticos que poseen esta estructura. Con la aparición de la resistencia mediada por plásmidos, aumentó la preocupación por la posible transmisión generalizada de estos mecanismos. (Paylan & Durham, 2006)

#### **2.4.3 Intercambio de información genética entre bacterias**

La resistencia es una estrategia evolutiva de los microorganismos para sobrevivir a entornos químicamente hostiles, tales como la exposición a los antibióticos. Sin embargo, la evolución y la transferencia vertical de estos determinantes a la progenie es sólo una parte para la supervivencia, utilizada por los microorganismos. Las bacterias tienen la notable capacidad de compartir los recursos genéticos, incluyendo la resistencia a través de transferencia lateral de genes (LGT), la cual requiere al menos dos procesos independientes: movimiento físico de DNA; y la incorporación en el genoma receptor. (Tadesse, Daniel A., Shaohua Zhao, 2014)

##### **2.4.3.1 Mecanismos horizontales de transferencia genética**

Los mecanismos de transferencia de resistencia de una bacteria a otras son transformación, transducción y conjugación.

###### **2.4.3.1.1 Transformación**

Es la transferencia genética que resulta de la incorporación de DNA desnudo por una célula receptora desde una célula donadora. Ciertas bacterias son capaces de tomar DNA del medio ambiente y ese DNA que es introducido puede llegar a ser incorporado al cromosoma de la célula bacteriana receptora. (Tadesse, Daniel A., Shaohua Zhao, 2014)

#### 2.4.3.1.1.1 Factores que afectan la transformación.

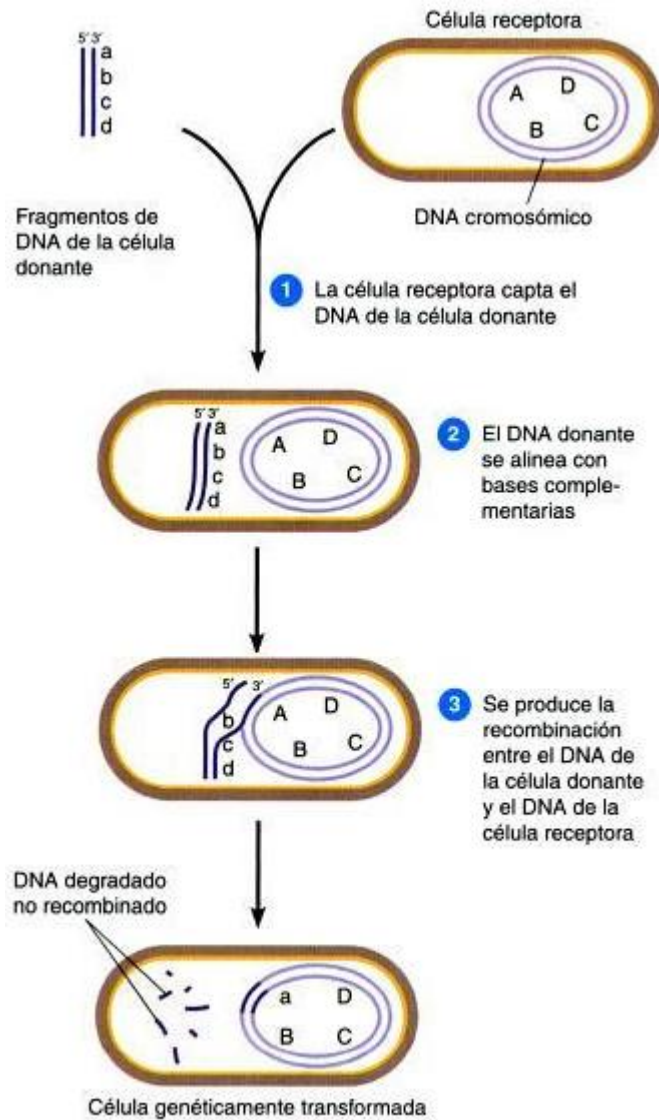
a. Tamaño del DNA – Funciona mejor el DNA de doble cadena de al menos  $5 \times 10^5$  Daltones. Por tanto, la transformación es sensible a las nucleasas del medio ambiente.

b. Competencia de la célula receptora – Algunas bacterias son capaces de incorporar DNA en forma natural. Sin embargo, estas bacterias solo toman al DNA en una etapa particular de su ciclo celular, cuando producen una proteína específica llamada factor de competencia. Cuando la bacteria se encuentra en este estadio se dice que es competente. Otras no son capaces de incorporar el DNA naturalmente, sin embargo en estas bacterias la competencia puede ser inducida *in vitro* mediante tratamiento con sustancias químicas (ej.  $\text{CaCl}_2$ ). (Tortora, Funke, & Case, 2007)

#### 2.4.3.1.1.2. Pasos de la transformación.

a. Incorporación del DNA – El DNA en bacterias Gram positivas se introduce en forma de moléculas de cadena sencilla y la cadena complementaria se sintetiza dentro de la célula receptora. En contraste, las bacterias Gram negativas incorporan DNA de doble cadena.

b. Recombinación General/Legítima/Homóloga – Luego de que el DNA de la célula donadora se ha incorporado, ocurre un evento de recombinación recíproca entre el cromosoma y el DNA de la célula donadora, esto requiere de que exista homología entre el DNA del donador y el cromosoma receptor, lo que finalmente resulta en la sustitución de DNA entre la receptora y la donadora, que necesita genes de recombinación bacteriana (*recA*, *B* y *C*) y de que exista homología entre los DNA's involucrados. Este tipo se denomina recombinación general, legítima u homóloga. Debido al requerimiento de homología entre las células donadora y huésped, solo el DNA de una bacteria cercanamente relacionada se esperaría que transformara exitosamente, aunque en raras ocasiones se ha demostrado que sí ocurre transferencia genética de este tipo entre bacterias relacionadas de forma más bien distante. (Neil & Reece, 2005)



**Figura 1.** Mecanismo de transformación genética bacteriana. Se necesitan algunas similitudes para alinear el DNA del donante y del receptor. Los genes *a*, *b*, *c* y *d* pueden ser mutaciones de los genes *A*, *B*, *C* y *D*. (Tomada de G. J. . Tortora *et al.*, 2007)

### 2.4.3.1.2. Transducción

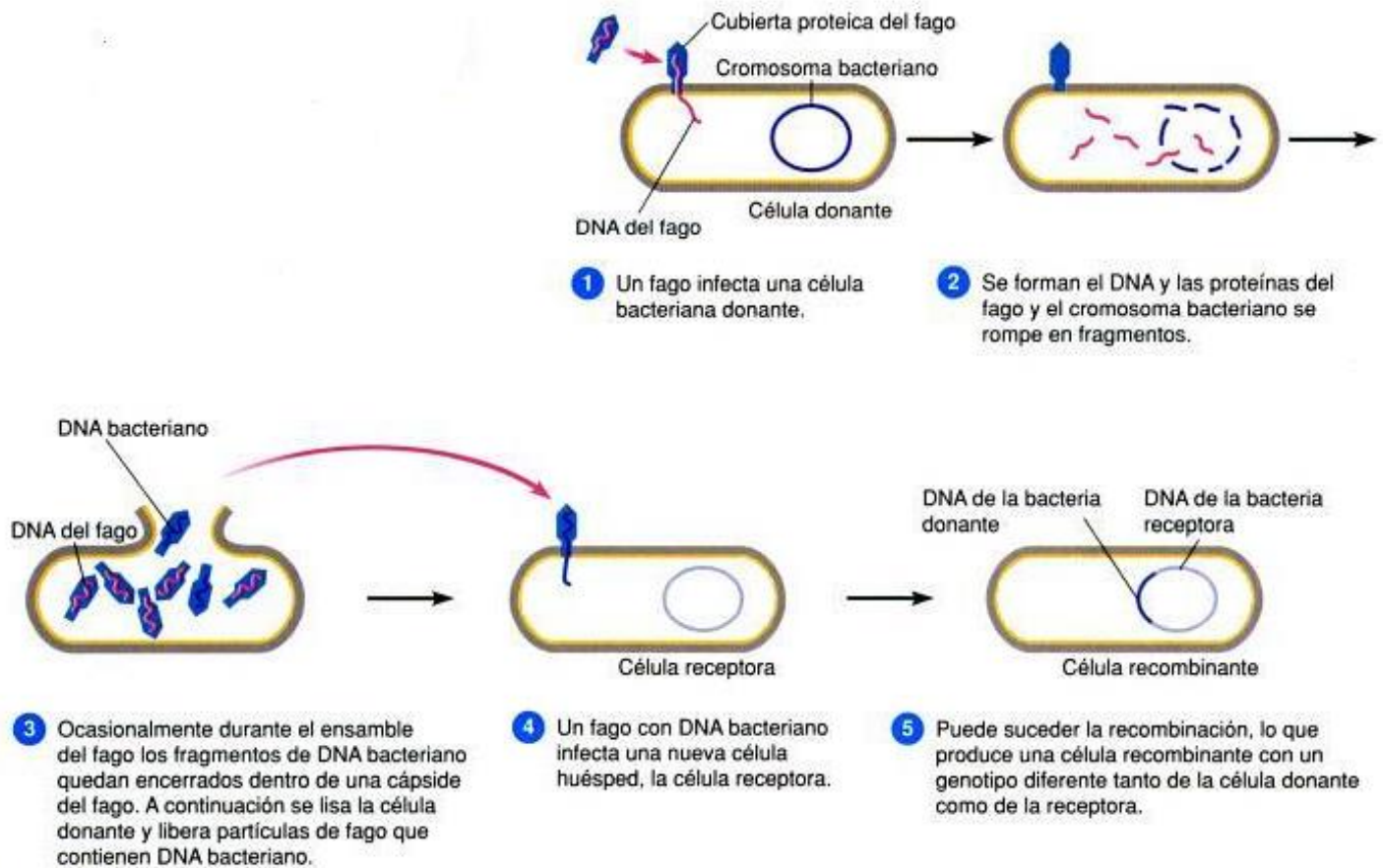
Es la transferencia de información genética desde un donador a un receptor y está mediada por un bacteriófago (fago). La cubierta del fago protege al DNA del medio ambiente, así es



que a diferencia de la transformación, no se ve afectada por las nucleasas en el medio ambiente. No todos los fagos pueden mediar la transducción. En la mayoría de los casos la transferencia genética se realiza entre miembros de las mismas especies bacterianas. La capacidad del fago para mediar la transducción, está relacionada con el ciclo de vida del mismo (Neil & Reece, 2005; G. J. . Tortora *et al.*, 2007)

#### 2.4.3.2.1 Tipos de Transducción

- Transducción Generalizada: Es el mecanismo por el cual potencialmente cualquier gen bacteriano de la célula donadora puede ser transferido a la célula receptora. Los fagos que median la transducción generalizada, normalmente cortan el DNA de la célula huésped en pequeñas piezas y empacan ambos DNA's al interior de la partícula fágica mediante un mecanismo llamado "*head full*" o llenado de las cabezas del fago. Ocasionalmente una de las piezas del DNA de la bacteria huésped resulta empacada al azar dentro de una cubierta de fago. Por lo tanto cualquier gen de la bacteria donadora puede ser potencialmente transferido, pero solamente se transferirá tanto DNA como pueda caber en una sola cápside. Cuando la célula receptora se infecta con un fago que contiene DNA de una donadora puede entrar en ella. Ya dentro de la célula receptora puede ocurrir el evento de la recombinación generalizada, en el cual se substituye el DNA de la célula donadora por el de la receptora.
- Transducción especializada: Es en la cual solo ciertos genes del donador pueden ser transferidos al receptor. Diferentes fagos pueden transferir diferentes genes pero un fago individual solamente puede trasladar unos pocos genes. Está mediada por fagos lisogénicos o fagos temperados y los genes que se llegan a transferir dependerán del lugar donde el profago queda insertado en el cromosoma. (Neil & Reece, 2005)



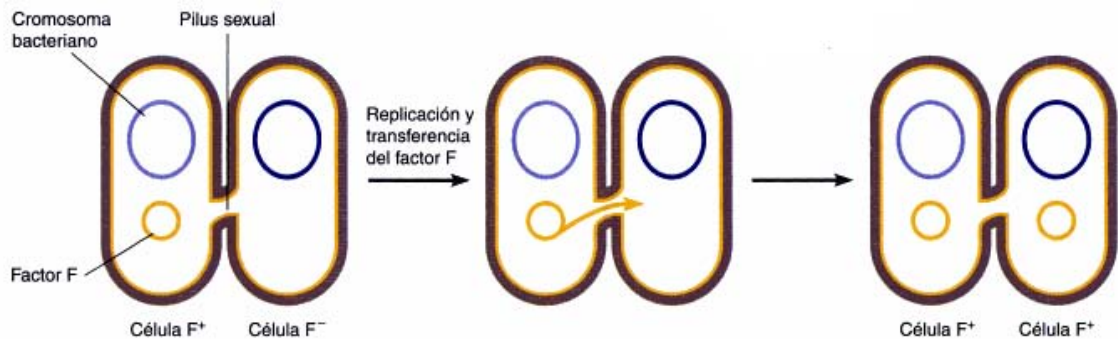
**Figura 2.** Transducción mediante un bacteriófago. Se muestra la transducción generalizada, en la cual cualquier DNA bacteriano puede ser transferido de una célula a otra. (Tomada de G. J. . Tortora *et al.*, 2007)

### 2.4.3.1.3. Conjugación

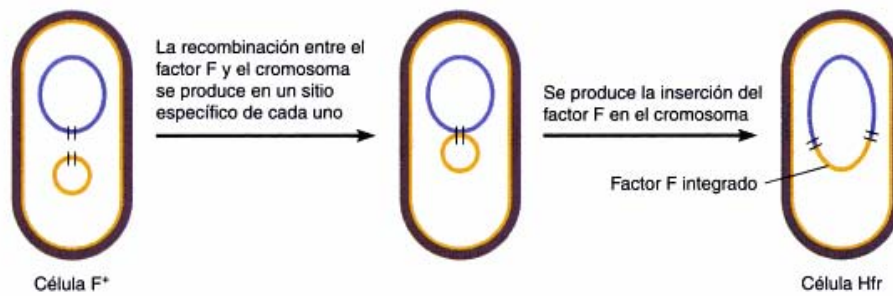
Es la transferencia de DNA de una donadora a una receptora, mediante contacto físico directo de forma temporal entre las células. En las bacterias existen dos tipos de células y son las donadoras (macho) y las receptoras (hembras) y la dirección de la transferencia genética es en un solo sentido; así el DNA se transfiere desde la donadora hacia la receptora. (Neil & Reece, 2005; G. J. . Tortora *et al.*, 2007)

#### 2.4.3.1.3.1. Tipos de células acopladas en las bacterias

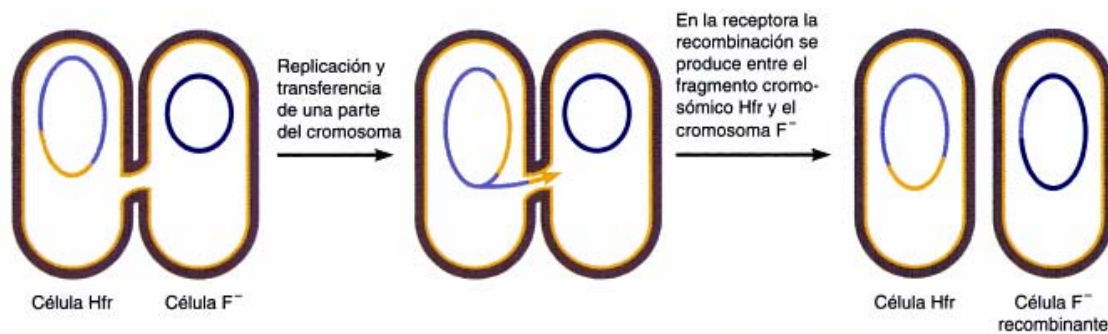
- Donadora—La capacidad de una bacteria de ser el donador es consecuencia de la presencia en dicha célula de una pieza extra de DNA, llamada factor F, factor de fertilidad o factor sexual. Es una pieza circular de DNA que es capaz replicar en forma autónoma en la célula; es un replicón independiente. Las piezas de DNA extracromosomal que pueden replicar autónomamente, reciben el nombre genérico de plásmidos. Posee los genes necesarios tanto para su replicación como para su habilidad de transferir DNA a la célula receptora. Una de las cosas que codifica es la capacidad de producir una estructura llamada pili sexual (pili F) sobre la superficie de la bacteria. Este pili es importante en el proceso de conjugación. El factor F no es el único plásmido que puede mediar la conjugación pero generalmente se toma como modelo
- Receptora—La capacidad de actuar como receptora es consecuencia de la carencia de esta célula del factor F.(Neil & Reece, 2005)



(a) Cuando un factor F (un plásmido) se transfiere de una célula donante (F<sup>+</sup>) a una receptora (F<sup>-</sup>), la célula F<sup>-</sup> se convierte en una célula F<sup>+</sup>.



(b) Cuando un factor F se integra al cromosoma de una célula F<sup>+</sup> la convierte en una célula on alta frecuencia de recombinación (Hfr).



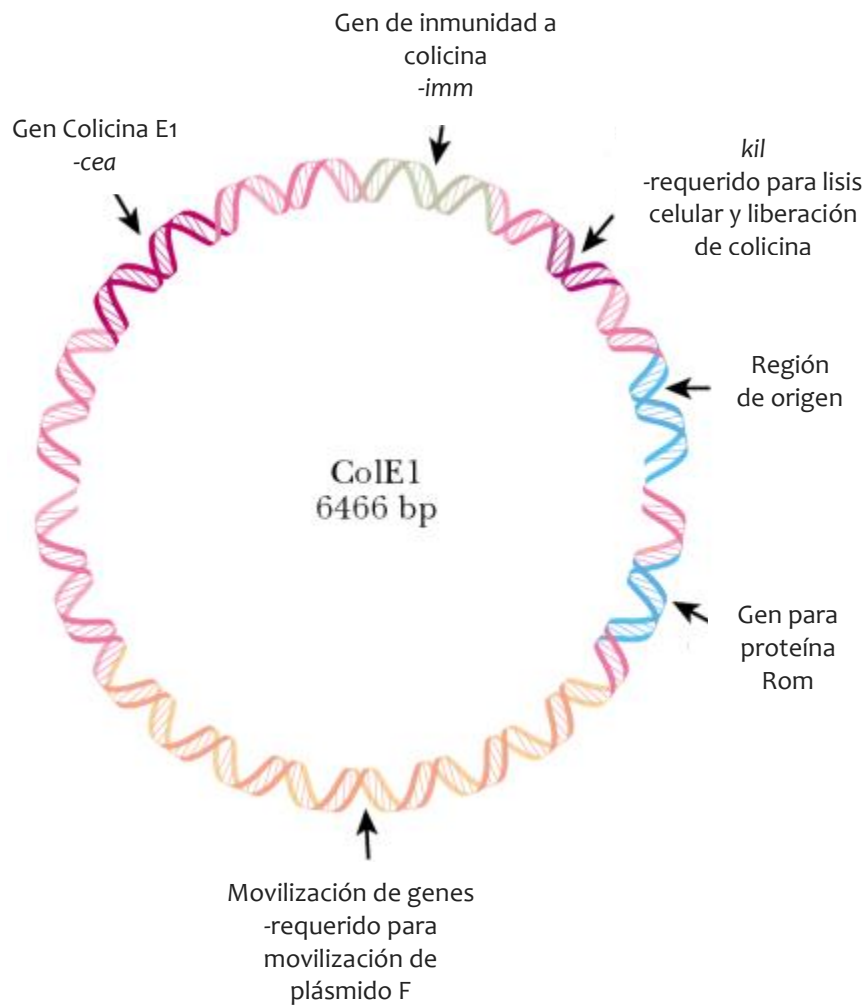
(c) Cuando una célula donante Hfr pasa una porción de su cromosoma a una célula receptora F<sup>-</sup> se produce una célula F<sup>-</sup> recombinante.

Figura 3. Conjugación en *E. coli* (Tomada de G. J. . Tortora *et al.*, 2007)

#### 2.4.3.1.4 Plásmidos

Son elementos de doble cadena de DNA circulares que se replican independientemente del cromosoma (contienen los genes necesarios para replicarse) y se puede adquirir e

intercambiar información con el cromosoma y otros plásmidos del huésped. Pueden ser conjugativos y auto-transmisibles o no conjugativos, los rasgos codificados normalmente no son esenciales para que las bacterias puedan sobrevivir, pero les proporcionan genes que confieren alguna ventaja selectiva como determinantes de virulencia, adherencias, y resistencia a antibióticos. Los que llevan los genes de resistencia se denominan plásmidos R o factores R y juegan un papel clave en su difusión. No es infrecuente que un único plásmido pueda mediar resistencia a múltiples antimicrobianos y ser compartida entre diferentes géneros bacterianos simultáneamente. (Molina L. & Uribarren B., 2014)



**Figura 4.** El plásmido ColE1 de *E. coli* lleva genes para colicina E1 (*cea*), la inmunidad a la colicina E1 (*imm*) y el gen *kil*, requerido para la liberación de colicina de la célula productora. El gen Rom está implicado en el control del número de copias especialmente en las células de crecimiento lento. ColE1 es la base para muchos plásmidos utilizados en la ingeniería genética. Los genes de movilización de ColE1 permiten ser transferidos de una célula a otra durante la conjugación mediada por el plásmido F. (Tomada y modificada de Clark, 2005)

### 2.4.3.1.5 Elementos genéticos transponibles

#### 2.4.3.1.5.1 Transposones

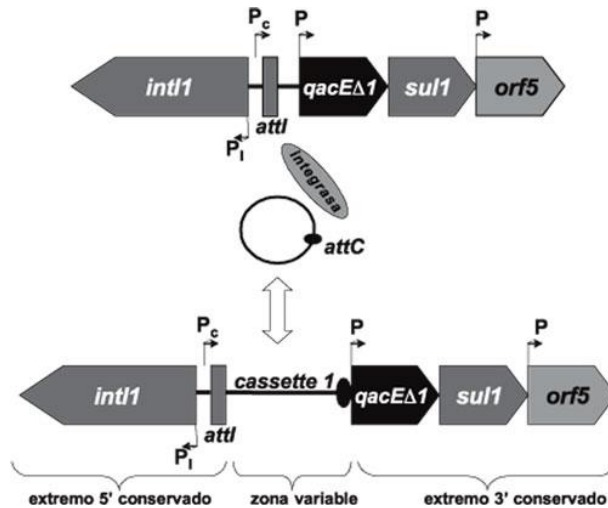
Son segmentos de DNA de gran movilidad, simples o compuestos; dan lugar a mutaciones, ya sea por inserción, pérdida de genes o diseminación de los mismos entre células. En los transposones (Tns) se encuentran habitualmente los genes que determinan la síntesis de toxinas, factores de adhesión, virulencia o resistencia a algunos antibióticos. Para la transposición se requiere una enzima denominada transposasa que facilita la recombinación homóloga ya que media este acontecimiento.

Al igual que los plásmidos, los Tns también son capaces de llevar genes de resistencia a antibióticos y funcionan como lanzaderas, llevan estos determinantes entre plásmidos y el cromosoma. La transmisión de un Tns de una especie bacteriana a otra puede llevarse a cabo por la inserción en un plásmido conjugativo o a través de un Tns conjugativo. Los Tns conjugativos parecen ser un híbrido entre Tns y plásmidos, que se han identificado en muchos Gram negativos. (Molina L. & Uribarren B., 2014; Neil & Reece, 2005)

#### 2.4.3.1.5.2 Integrones

Son elementos genéticos capaces de captar y expresar genes en cassettes de resistencia a antibióticos. Formando parte de la estructura básica del integrón se encuentra el gen *intl* que codifica una proteína con actividad de recombinasa específica de sitio (IntI), la integrasa, que forma parte de una familia de enzimas cuyo prototipo es la integrasa del bacteriófago, actualmente denominadas tirosina-recombinasas. Adyacente a *intl* se encuentra el sitio de recombinación específica de sitio, *attI*, en el que se integra el *cassette* genético de resistencia. Entre *intl* y *attI* se encuentran dos promotores divergentes,  $P_I$  para la expresión de *intl* y  $P_C$ , para la expresión de los *cassettes* genéticos insertados río abajo, puesto que la mayoría de éstos no tiene promotor. La enzima IntI permite la interacción entre *attI* y el sitio *attC* o elemento de 59 pb de los *cassettes* genéticos, uniendo ambos sitios y facilitando la

integración o escisión del *cassette* de resistencia en la zona variable del integrón. (González R, Mella M, Zemelman Z, Bello T, & Domínguez Y, 2004; Molina L. & Uribarren B., 2014)



**Figura 5.** Representación esquemática de la estructura básica de un integrón y de la adquisición de *cassettes* genéticos de resistencia. *int1*: gen que codifica la integrasa clase 1; *P<sub>i</sub>*: promotor que transcribe la integrasa; *P<sub>c</sub>*: promotor que dirige la transcripción de los *cassettes* integrados; *attI*: sitio de recombinación del integrón en el cual los *cassettes* son integrados. *attC*: sitio de recombinación del *cassette* genético (Tomado de González, R. *et al*, 2004).

#### 2.4.3.1.5.2.1 Cassettes genéticos y elementos de 59 pb

Los *cassettes* genéticos constituyen un grupo diverso de pequeños elementos móviles que usualmente contienen sólo un marco de lectura abierta completo (*orf*), o región codificante (gen). Además, formando parte de su estructura, a continuación del *orf*, existe un sitio de recombinación específica denominado elemento de 59 pb, o sitio *attC*, localizado en el extremo 3' del gen. Aunque se considera que son elementos móviles, no codifican enzimas u otros productos involucrados en su propia movilización. Estos elementos pueden existir libremente en forma de moléculas circulares covalentemente cerradas, generadas por acción de la integrasa que escinde el *cassette* desde un integrón. La inserción específica de sitio de los *cassettes* genéticos al interior de la región variable de los integrones ha sido solamente detectada en las células que expresan la actividad de la integrasa, esto indica que



esta recombinasa es necesaria para la integración de los *cassettes*, predominantemente dentro del sitio *attI* del integrón, aunque también es posible la recombinación entre dos sitios *attC*. La integrasa interactúa con los dos sitios primarios de recombinación, el sitio *attI* de los integrones y el sitio *attC* de cada *cassette* genético. Por otra parte, la especificidad de la orientación de los *cassettes* genéticos integrados permite su transcripción desde un promotor común localizado en el extremo 5'CS de los integrones, cuya secuencia nucleotídica es altamente conservada y en el cual pequeñas variaciones afectan la fuerza de transcripción del promotor, llegando incluso a niveles tan bajos de expresión que la bacteria aparece fenotípicamente susceptible, aunque es potencialmente resistente por poseer el gen que codifica la resistencia. Por lo tanto, el uso de un determinado antibiótico, al ejercer la correspondiente presión selectiva, puede seleccionar las cepas con promotores más fuertes y capaces de expresar el gen, determinando la resistencia de las bacterias al antibiótico. El nivel de resistencia a un determinado antibiótico, codificado por un *cassette* genético de resistencia, depende de su posición en el integrón, más cercana o lejana del promotor común. Las bacterias manifiestan niveles de resistencia más elevados cuando el gen de resistencia se ubica en el primer *cassette*, esto es, muy cercano al promotor y estos niveles se reducen a medida que los genes están en *cassettes* posteriores, río abajo del promotor. (González R et al., 2004)

#### **2.4.3.1.5.3. Secuencias de inserción**

Son secuencias cortas de DNA que actúan como un elemento de transposición simple, tienen dos características principales; son pequeños en relación con otros elementos de transposición y sólo codifican para proteínas implicadas en la actividad de transposición. Estas proteínas incluyen generalmente la transposasa, que cataliza la reacción enzimática que permite la secuencia se mueva, y también una proteína reguladora, que estimula o inhibe la actividad de transposición. Variedades de estas secuencias han demostrado estar asociadas con la resistencia a los antimicrobianos. (Tadesse, Daniel A., Shaohua Zhao, 2014)

#### 2.4.4 Microbiota y resistencia

La microbiota humana se compone principalmente de bacterias no patógenas. Su composición difiere entre los individuos, pero se han encontrado más de 100.000 genes. Debido a la elevada cantidad de bacterias intestinales no es de extrañar que pueden conducir a un mayor intercambio de la información genética a lo largo de la biota comensal, la cual se ve afectada debido a alteraciones en la dieta, estilo de vida, proceso de envejecimiento y el tratamiento con antibióticos. Se ha demostrado que la administración de antibióticos durante la vida del individuo, incluso a corto plazo puede conducir a que las poblaciones de bacterias resistentes en el intestino humano persistan durante años. Varios estudios (tabla 2) han señalado que los integrones en la microbiota son un reservorio para los genes de resistencia (O'Sullivan et al., 2013; Ravi et al., 2014; Stecher et al., 2012)

**Tabla 2.** Microbiota comensal como fuente de genes de resistencia en integrones (Tomada y modificada de Ravi *et al.*, 2014)

Clase de integrón	Muestra	Origen del integrón	Resistencia a antibiótico	Referencia
I y II	Heces humanas	<i>E. coli</i> comensal	Trimetoprima y Aminoglucósidos	(Kang <i>et al.</i> , 2005)
I	Heces humanas	<i>Citrobacter freundii</i>	Aminoglucósido	(Nørskov-Lauritsen <i>et al.</i> , 2001)
II	Heces humanas	<i>E. coli</i> comensal	Trimetoprima, Estreptomina y Espectinomicina	(Bailey, Pinyon, Anantham, & Hall, 2010)
I	Heces humanas	<i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Pseudomonadaceae</i>	Aminoglucósido, Estreptomina y Espectinomicina	(Lévesque, Piché, Larose, Roy, & Roy, 1995)
I	Heces porcinas	<i>E. coli</i> comensal	Sulfametoxazol, Tetraciclina y Ampicilina	(Phongpaichit, Liamthong, Mathew, Chethanond, 2007)
I	Heces de wallaby en cautiverio	Metagenoma	Espectinomicina, Estreptomina y Trimetoprima,	(Power, Emery, & Gillings, 2013)
I	Heces humanas	<i>E. coli</i> comensal	Sulfametoxazol, Cefotaxima, Gentamicina y Ciprofloxacino	(Sepp <i>et al.</i> , 2009)
ND*	Heces de aves y cerdos	<i>E. coli</i> comensal	Tetraciclina, Sulfametoxazol, Quinolonas y Estreptomina	(Koo, Woo, 2012)
I	Heces humanas	<i>E. coli</i> comensal	Estreptomina y Tetraciclina	(Skurnik <i>et al.</i> , 2005)
II	Heces humanas	<i>E. coli</i> comensal	Estreptomina	(Skurnik <i>et al.</i> , 2005)

\*ND: no determinado

## 2.4.5 Resistencia global

El aumento de la resistencia a antibióticos es un problema emergente entre los seres humanos. En diversos estudios en todo el mundo, se ha informado la propagación de Enterobacterias patógenas resistentes y *P. aeruginosa*, adquiridas en la comunidad, productoras de BLEE, capaces de hidrolizar casi todas las cefalosporinas, además del

aumento de dichas bacterias productoras de carbapenemasas aisladas de infecciones clínicas (Nordmann *et al.*, 2011). Debido a esto, estudios internacionales han monitoreado dicha resistencia, y demostrado la prevalencia de las principales cepas productoras en el mundo, revelando una tasa mayor en América Latina, África, y Asia, siendo la tasa más baja en Europa (Tabla 3).

**Tabla 3.** Prevalencia de las principales cepas aisladas productoras de BLEE en el mundo (Kanj & Kanafani, 2011)

Continente	<i>E. coli</i> (%)	<i>Klebsiella</i> spp. (%)	<i>Enterobacter</i> spp. (%)
Europa	6,4	8.8	11.8
América	12	27.6	31.1
Asia	19.6	22.9	36.4
África	10	27.4	17.8

## 2.4.6 Resistencia en México

La resistencia bacteriana mediada por BLEE, constituye en México uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia en el entorno hospitalario y en los casos de brotes, lo que incentivó la investigación sobre dicha resistencia.

Tal es el caso de Miranda *et al.*, en 2004 reportando que de 184 muestras de sangre con aislados de *K. pneumoniae* en un año de un hospital pediátrico, al seleccionar 50 muestras al azar todas poseían  $\beta$ -lactamasas tipo SHV-5 y TEM-1, en 2007 Garza-Ramos *et al.*, describen que de 14 aislamientos de Enterobacterias de un banco de cepas de 7 hospitales mexicanos, todas las muestras presentaron un patrón de  $\beta$ -lactamasas tipo SHV-5 y SHV-2, en otro estudio en 2008 hecho por Mosqueda-Gómez *et al.*, encontraron que de aislados de sangre a partir de pacientes con bacteremias por *Klebsiella* spp. adquiridas en el hospital el 52.9% eran productoras de BLEE, en la publicación en 2010 de Quinones-Falconi *et al.*, se reportó en sangre y muestras respiratorias la presencia de *P. aeruginosa* productora de metalo- $\beta$ -lactamasas, en 2011 Garza-González *et al.*, encontraron que de las muestras de heridas infectadas, sangre, orina y de tracto respiratorio que se analizaron obtuvieron que el 35.9%

de *K. pneumoniae*, 35.6% *Enterobacter cloacae* y 30% *E. coli* fueron productoras de BLEE, mientras que Llanes *et al.*, en 3 años de análisis de muestras de orina, sangre, secreciones bronquiales, catéter y heridas infectadas con *E. coli*, mostró resistencia en el 52.9% de los casos , y en el estudio de Silva-Sánchez *et al.*, recolectaron durante 7 años muestras de sangre, orina y otros fluidos corporales, en ocho hospitales y hallaron que las bacterias resistentes prevalentes fueron *K. pneumoniae* (56%), *Enterobacter spp.* (29%) y *E. coli* (15%), finalmente en 2012 y 2013 Morfin-Otero *et al.*, reporta que de los aislados de sangre, piel y en pacientes con neumonía con bacterias Gram-negativas, se aislaron principalmente *E. coli* y *Klebsiella spp.*, *P. aeruginosa* fue el tercer microorganismo más común, seguido de *Acinetobacter spp.*, el cuarto más común aislado durante ese estudio.

## 2.5 Antibióticos $\beta$ -lactámicos

Contienen un anillo  $\beta$ -lactámico de cuatro miembros, nitrogenado en el centro de su estructura. Los carbapenémicos se caracterizan porque su anillo  $\beta$ -lactámico se encuentra unido a un anillo de cinco componentes, que es insaturado y contiene un átomo de carbono en sustitución del átomo de azufre típico de las penicilinas. Los monobactámicos se caracterizan por presentar una única estructura central el anillo  $\beta$ -lactámico. Carbacefem se caracteriza por la sustitución del átomo de azufre por un grupo metileno.

**Tabla 4.** Estructura de antibióticos utilizados en el proyecto (tomado y modificado de (B. Forbes, Sahn, & Weissfeld, 2009; Walker, Kimberly E., *et al.*, 2014)

Clase de betalactámico	Ejemplos	Estructura molecular básica	Acción de betalactamasas
Penicilinas	Penicilina Ampicilina Piperacilina		
Cefalosporinas	Cefazolina Cefuroxima Cefotetán Cefotaxima Ceftriaxona Ceftazidima Cefepima		
Monobactámicos	Aztreonam		
Carbapenémicos	Imipenem Meropenem Ertapenem Doripenem		
Cefamicinas	Cefoxitina		
Quinolonas*	Ciprofloxacino Ácido Nalidíxico		
Inhibidores de betalactámicos	Ácido Clavulánico		

\*No aplica acción de betalactamasas

**Tabla 5.** Clasificación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Betty Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009; Quetglas & Azanza, 2008; Winn et al., 2008)

Clase de $\beta$ -lactámico	Mecanismo de acción	Ejemplos
Penicilinas	Inhiben la síntesis de la pared celular por unión a enzimas involucradas en la producción de peptidoglicano (es decir, proteínas de unión a la penicilina, PBP). La mayoría de las células bacterianas no pueden sobrevivir después de haber perdido la capacidad para producir y mantener su capa de peptidoglicano. La muerte es el resultado de la inestabilidad osmótica causada por la síntesis defectuosa de la pared celular o bien la unión del $\beta$ -lactámico a una PBP desencadena una serie de acontecimientos que llevan a la autólisis.	Penicilina, Ampicilina, Piperacilina, Meticilina, Nafcilina, Oxacilina, Dicloxacilina, Cloxacilina, Amoxicilina, Carbenicilina, Ticarcilina, Azlocilina, Mezlocilina
Cefalosporinas		1ª generación: Cefazolina, Cefalotina, Cefapirina, Cefradina 2ª generación: Cefamandol, Cefonicida, Cefuroxima, Cefaclor, Cefoxitina, Cefotetan 3ª generación: Cefoperaxona, Ceftazidima, Cefotaxima, Ceftriaxona 4ª generación: Cefepima, Cefpirona
Carbapenémicos		Meropenem, Imipenem, Ertapenem, Doripenem
Carbacefem		Loracarbef
Monobactámicos		Aztreonam
Inhibidores de $\beta$ -lactamasas	Compuestos que se unen a las $\beta$ -lactamasas y las inactivan, evitando que se fijen en los antibióticos y los destruyan.	Combinaciones: Amoxicilina-Ácido Clavulánico, Ampicilina-Sulbactam, Piperacilina-Tazobactam, Ticarcilina-Ácido Clavulánico, Ceftazidima-Ácido Clavulánico

## 2.6 $\beta$ -lactamasas

La hidrólisis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos es el mecanismo más común de resistencia contra los agentes antibacterianos clínicamente más importantes en bacterias Gram negativas y estas  $\beta$ -lactamasas pueden ser encontradas en el espacio periplásmico.

**Tabla 6.** Clasificación de  $\beta$ -lactamasas (tomado y modificado de Bush & Jacoby, 2010)

Grupo Bush-Jacoby (2009)	Clase molecular	Sustrato característico	Inhibido por		Enzimas representativas
			AC o TZB	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	No	No	E. coli AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefalosporinas	No	No	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	Sí	No	PC1
2b	A	Penicilinas y cefalosporinas	Sí	No	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	Sí	No	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	No	No	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	No	No	TEM-50
2c	A	Carbenicilina	Sí	No	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilina, Cefepime	Sí	No	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variable	No	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	No	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenémicos	Variable	No	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Sí	No	CepA
2f	A	Carbapenémicos	Variable	No	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1) B (B3)	Carbapenémicos	No	Sí	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Carbapenémicos	No	Sí	CphA, Sfh-1

AC: Ácido Clavulánico, TZB: Tazobactam, EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

Dentro de la clasificación de todas las  $\beta$ -lactamasas, las familias de enzimas de mayor importancia clínica son: CMY, TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, KPC, SME, OXA, IMP, VIM e IND. (Bush & Jacoby, 2010; Tadesse, Daniel A., Shaohua Zhao, 2014)



## 2.7 Infecciones nosocomiales o intrahospitalarias

Es una infección contraída por un paciente internado en un hospital o en otro establecimiento de atención de salud en quien la infección no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento del internado. Son más frecuentes las infecciones de heridas quirúrgicas, de vías urinarias y de vías respiratorias inferiores (nosocomial deriva de una palabra griega correspondiente a hospital). Las infecciones que ocurren más de 48 horas después de estar hospitalizados suelen considerarse intrahospitalarias. Los agentes nosocomiales pueden ser bacterias, virus, parásitos y hongos. En lo que respecta a bacterias pueden colonizar a los pacientes:

- Bacterias comensales: Algunas pueden causar infección si el huésped natural está comprometido.
- Bacterias patógenas: Tienen mayor virulencia y causan infecciones (esporádicas o endémicas), independientemente del estado del huésped.

Las infecciones contraídas en los establecimientos de atención de salud se encuentran entre las principales causas de defunción y de aumento de la morbilidad en pacientes hospitalizados, ya que puede tratarse de un microorganismo resistente, lo que lleva a la limitación de las opciones terapéuticas. (Girard *et al.*, 2003; G. Tortora *et al.*, 2007)

## 2.8 Detección fenotípica

Se recomiendan cuatro métodos basados en la inhibición in vitro de la actividad de BLEE por el Ácido Clavulánico para su confirmación: prueba de combinación de discos, prueba de sinergismo de doble disco, E-test y microdilución en caldo.

### **2.8.1 Prueba de combinación de discos**

Para esta prueba se aplican discos de ensayo que contienen sólo una Cefalosporina (Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftazidima, Cefepima) y otro en combinación con Ácido Clavulánico. La zona de inhibición alrededor del disco de Cefalosporina combinado con Ácido Clavulánico se compara con la zona alrededor del disco que sólo contiene la Cefalosporina. La prueba es positiva si el diámetro de la zona de inhibición es 5 mm más grande que sin el inhibidor de  $\beta$ -lactamasas.

### **2.8.2 Prueba sinergia de doble disco (DDST)**

Los discos que contienen las Cefalosporinas (Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftazidima, Cefepima) se aplican al lado de un disco con Ácido Clavulánico (Amoxicilina-Ácido Clavulánico o Ácido Clavulánico-Ticarcilina). El resultado positivo se indica cuando las zonas de inhibición alrededor de cualquiera de los discos de Cefalosporina se aumentan en la dirección del disco que contiene Ácido Clavulánico. Para la detección de AmpC en el laboratorio, se utilizan las pruebas de sinergia y potenciación con ácido borónico, ya que tiene efectos inhibitorios contra las  $\beta$ -lactamasas clase C. El ácido 3-aminofenilborónico (AFB), un derivado del ácido borónico, es utilizado para comparar la actividad de estas enzimas en presencia y ausencia del inhibidor.

### **2.8.3 Epsilon-test® (E-test)**

Se aplica y se lee de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La prueba es positiva si se observa una reducción de 8 veces en la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la Cefalosporina en combinación con Ácido Clavulánico en comparación con la CMI de la Cefalosporina sola. Debe utilizarse para la confirmación de la única producción de BLEE.

## 2.8.4 Microdilución en caldo

Se realiza con caldo Müller-Hinton que contiene diluciones en serie de Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftazidima y/o Cefepima en concentraciones que van desde 0,25 hasta 512 mg/L, con y sin Ácido Clavulánico en una concentración fija de 4 mg/L. Una suspensión bacteriana se inocula en cada pocillo de la placa de microtitulación, la cual se incuba a 37 °C durante 18 a 24 horas. La prueba es positiva si se observa una reducción de 8 veces en la CMI de la Cefalosporina en combinación con Ácido Clavulánico en comparación con la CMI de la Cefalosporina sola. (Giske *et al.*, 2014; Stuart *et al.*, 2011, Wayne, P.A., 2013)

## 2.9 Detección genotípica

Para la confirmación genotípica de la presencia de genes de BLEE se recomienda utilizar PCR y secuenciación de genes o un método basado en microarreglos de DNA. (Giske *et al.*, 2014)

### 2.9.1 PCR tiempo real

En PCR tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Esta tecnología se basa en la detección de la emisión de fluorescencia durante cada ciclo de amplificación, la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado, lo cual permite el monitoreo continuo de la reacción de PCR. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos.

- ♣ Agentes intercalantes: Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a DNA de doble hélice.

♣ Sondas de hibridación específicas: Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas *molecular beacons* y las sondas FRET:

1. *Sondas de hidrólisis*. Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de DNA diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la Taq polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador.

2. *Molecular beacons*. Son sondas parecidas a las anteriores. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el DNA diana. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada. Sin embargo, al hibridar con el DNA diana la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el donador.

3. *Sondas FRET*. El sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del DNA diana. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo.

En todos estos sistemas, el incremento de DNA en cada ciclo corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de

fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales. (Costa, 2004; B. Forbes et al., 2009)

### 3. JUSTIFICACIÓN

Se está acumulando en los últimos años evidencia respecto a que la microbiota intestinal juega un papel importante como reservorio de bacterias resistentes. Las bacterias en el intestino no sólo son capaces de adquirir genes de resistencia sino también ayudan en la diseminación de estos genes a otras bacterias en el intestino (Ravi *et al.*, 2014). Debido a la transmisión de genes de la microbiota a patógenos, como un posible factor de riesgo, pero no el único, es importante realizar estudios de susceptibilidad y búsqueda de genes sobre las bacterias resistentes a antibióticos aisladas del tracto gastrointestinal de pacientes en las instituciones de salud ya que las bacterias presentes en la flora normal causan infección por transmisión a sitios fuera del hábitat natural o heridas. Las bacterias Gram negativas del aparato digestivo causan a menudo infección en el sitio de una herida después de una intervención quirúrgica abdominal o urinaria en pacientes sometidos a cateterización, además éstas bacterias también pueden transmitirse por medio de personal contaminado durante la atención del paciente (manos, ropa, nariz y garganta) que se convierte en portador transitorio o permanente, e incluso en artículos como ropa de cama, equipo y suministros empleados en la atención. (OMS, 2003). Al ser resistentes pueden causar una amplia morbilidad y mortalidad por la limitación de las opciones terapéuticas, en casos de infecciones nosocomiales.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

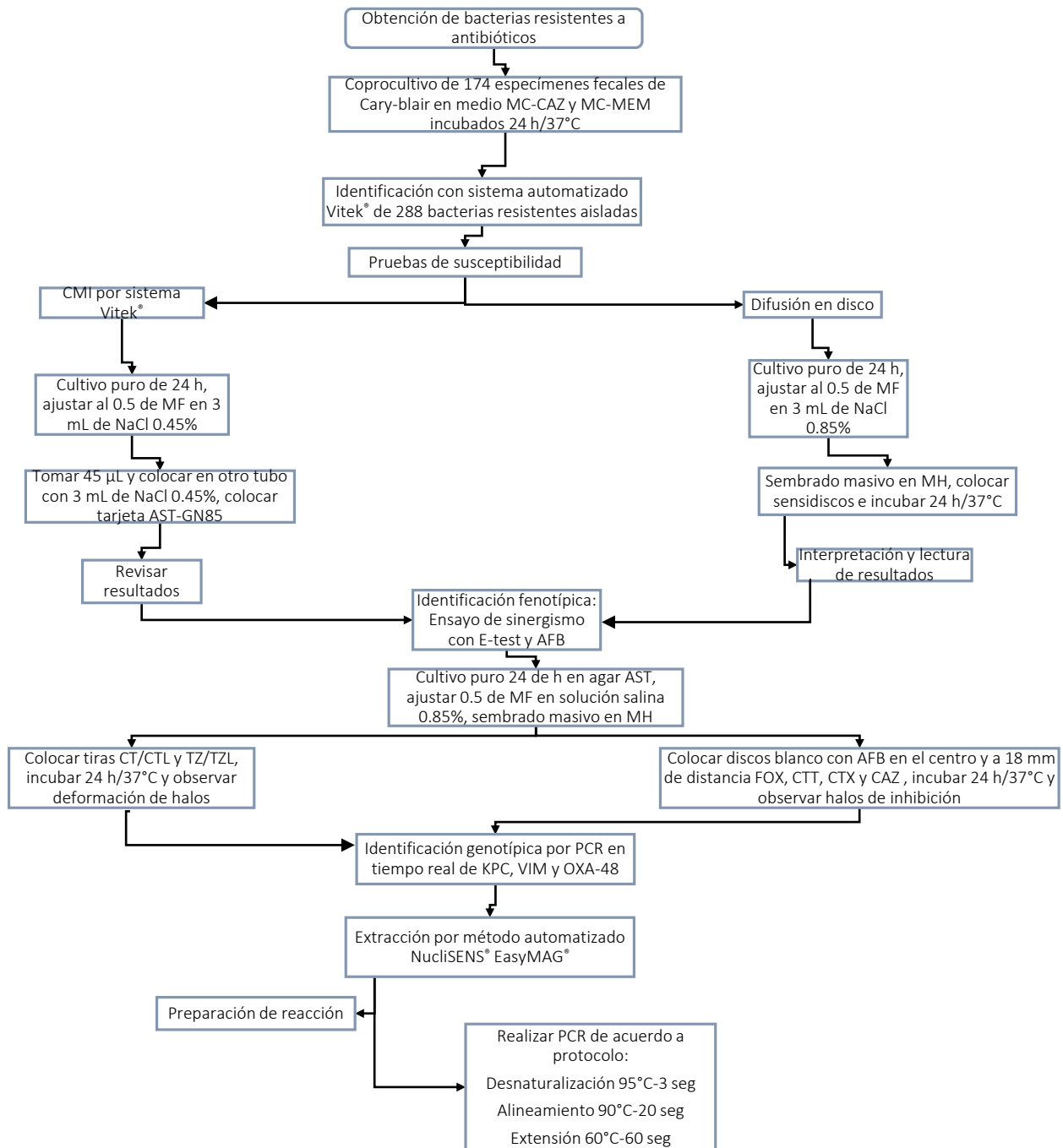
Aislar e identificar Enterobacterias de la microbiota intestinal de pacientes en un hospital de tercer nivel para establecer el perfil de resistencia a cefalosporinas y carbapenémicos mediante pruebas de susceptibilidad y ensayos fenotípicos así como determinar la presencia de  $\beta$ -lactamasas que confieren resistencia a carbapenémicos por PCR en tiempo real.

### 4.2 Objetivos particulares

- Aislar e identificar Enterobacterias resistentes a cefalosporinas y carbapenémicos en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) mediante el uso de medio adicionado con antibióticos Ceftazidima y Meropenem.
- Realizar pruebas de susceptibilidad por difusión en disco y método automatizado Vitek® de antimicrobianos a bacterias resistentes.
- Uso de ensayos fenotípicos para determinar la presencia de actividad de BLEE mediante pruebas de sinergismo.
- Determinar la presencia de las enzimas KPC, VIM y OXA-48 que confieren resistencia a  $\beta$ -lactámicos mediante PCR en tiempo real.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Diagrama de flujo



## 5.2 Cepas bacterianas

El aislamiento de bacterias resistentes se hizo a partir de un coprocultivo recolectado en medio de transporte Cary-blair (Becton, Dickinson, MD, E.U.), dichas muestras se sembraron en agar MC adicionados con antibiótico (Ceftazidima [1 mg/mL] y Meropenem [1 mg/mL]) y se incubaron 24 horas (h) a 37°C, durante el periodo del 15 de abril al 20 de mayo del 2014, en el Laboratorio de Bacteriología intestinal del departamento de Infectología del INCMNSZ.

## 5.3 Identificación y susceptibilidad bacteriana

Se realizó con tarjetas de identificación de bacterias Gram negativas (GNI) usando el sistema Vitek® Jr. 60 (bioMérieux, Francia). La susceptibilidad a antibióticos se determinó por dos métodos: difusión en disco y de CMI utilizando los resultados del Vitek®.

### 5.3.1 Método de CMI por sistema Vitek®

A partir de un cultivo puro de 24 h proveniente del medio MC sin antibiótico, se preparó una suspensión bacteriana en un tubo de ensaye de poliestireno de 12x75 mm con 3 mL de solución salina estéril (NaCl 0.45%, pH 7.0), ajustando la turbiedad a 0.5 unidades de la escala de McFarland (MF) con densitómetro DensiChek™ (bioMérieux, Francia), a partir de esta suspensión se tomaron 45 µL y se colocaron en otro tubo que contenía igualmente 3 mL de NaCl, al primer tubo se le colocó la tarjeta GNI y al tubo diluído la tarjeta AST-GN85 (Amikacina, Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Aztreonam, Cefazolina, Cefepima, Cefpodoxima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Ciprofloxacino, Doripenem, Ertapenem, Gentamicina, Meropenem, Nitrofurantoína, Piperacilina/Tazobactam, Tigeciclina Y Trimetoprim/Sulfametoxazol) para susceptibilidad, posteriormente los tubos con suspensión bacteriana se colocaron en una gradilla especial (cassette) con su tarjeta correspondiente en la ranura, insertando el tubo de transferencia de la tarjeta dentro del tubo con la suspensión correspondiente y se introdujo en el sistema de incubación Vitek®, después de 24 h se



revisaron los resultados de identificación y el patrón de susceptibilidad de las cepas analizadas.

### 5.3.2 Método de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en disco

Se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). A partir de un cultivo puro de 24 h, se preparó una suspensión bacteriana ajustada al 0.5 de MF en 3 mL de solución salina estéril al 0.85%, con un hisopo estéril se realizó un sembrado masivo de la suspensión en una placa de agar Müller-Hinton; posteriormente se colocaron los sensidiscos (Becton, Dickinson, E.U.) de los agentes antimicrobianos evaluados: Ampicilina **AMP** (10 µg), Meropenem **MEM** (10 µg), Imipenem **IPM** (10 µg), Ertapenem **ETP** (10 µg), Cefoxitina **FOX** (30 µg), Ciprofloxacino **CIP** (5 µg), Ácido Nalidíxico **NA** (30 µg), Ceftriaxona **CRO** (30 µg), Cefepima **FEP** (30 µg), Aztreonam **ATM** (30 µg), Ceftazidima **CAZ** (30 µg), Ceftazidima-Ácido Clavulánico **CAZ-CLA** (30 µg/10 µg), Cepodoxima **CPD** (10 µg), Cefotaxima **CTX** (30 µg), se incubaron a 37°C durante 24 h; después de la incubación se interpretó y registró la lectura de los halos de inhibición.

## 5.4 Pruebas fenotípicas

### 5.4.1. Ensayo de sinergismo

Para este ensayo se utilizaron discos de FOX, CTT, CTX y CAZ de 30 µg, además se prepararon discos que contenían una concentración final de 300 µl del ácido AFB, disolviendo en 6 mL de agua destilada estéril 120 µg de AFB, después de diluir completamente se agregaron 20 µl de esta solución a discos en blanco sin antibiótico, posteriormente se dejaron secar protegidos de la luz, una vez secos se guardaron en viales ámbar a 4°C.

A partir de un cultivo puro de 24 h proveniente de agar AST, se preparó una suspensión al 0.5 de MF en un tubo estéril con 2 mL de solución salina al 0.85%, posteriormente en una placa de agar Müller-Hinton se sembró de forma masiva la bacteria en estudio con un hisopo estéril, una vez inoculada se colocó un disco en blanco con AFB en el centro y a una

distancia de 18 mm se colocaron los discos FOX, CTT, CTX y CAZ, se incubaron a 37°C por 24 h, después se observó la forma de los halos de inhibición. La deformación del halo de crecimiento alrededor de los discos con antibióticos hacia el disco con AFB es indicativa de la producción de una enzima  $\beta$ -lactamasa clase C.

#### **5.4.2 Sinergismo por E-test**

Para este ensayo se utilizaron dos tiras de E-test Cefotaxima/Cefotaxima-Ácido Clavulánico CT / CTL 16/1 y Ceftazidima/Ceftazidima-Ácido Clavulánico TZ / TZL 32/4 (bioMérieux, Francia).

A partir de un cultivo puro de 24 h proveniente de agar AST, se preparó una suspensión al 0.5 de MF en un tubo estéril con 2 mL de solución salina al 0.85%, posteriormente En una placa de agar Müller-Hinton se sembró de forma masiva la bacteria en estudio con un hisopo estéril, una vez inoculada se colocaron los dos E-test, posterior a una incubación a 37°C por 24 h, se observaron la presencia de halos formados. La deformación en la elipse CT o TZ es indicativa de la presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.

#### **5.5 Identificación genotípica por PCR en tiempo real de KPC, VIM y OXA-48**

Para la identificación genotípica, a partir de las 136 muestras fecales se eligieron 50 muestras al azar, mediante la asignación numérica del 1 al 136 y posteriormente utilizando el programa Excel de Microsoft Office®, con la fórmula =ALEATORIO.ENTRE(1,136) se obtuvieron las muestras para realizar PCR en tiempo real (Tabla 7). En algunas muestras donde se aislaron 2 o más bacterias se volvió a utilizar la misma fórmula, indicando en el lugar de 136, el número total de microorganismos.

**Tabla 7.** Numeración al azar de bacterias en estudio mediante el uso de Excel para genotipificación

Asignación numérica	No. De Laboratorio	Bacteria	Medio de aislamiento	Asignación numérica	No. De Laboratorio	Bacteria	Medio de aislamiento
4	20,083	<i>E. coli</i>	CAZ	68	20,176	<i>E. coli</i>	CAZ
8	20,090	<i>K. oxytoca</i>	CAZ	71	20,179	<i>K. pneumoniae</i>	CAZ
10	20,094	<i>E. coli</i>	CAZ	72	20,180	<i>E. coli</i>	CAZ
13	20,099	<i>K. pneumoniae</i>	CAZ	73	20,181	<i>E. coli</i>	CAZ
17	20,106	<i>E. coli</i>	CAZ	102	20,214	<i>P. putida</i>	MEM
18	20,107	<i>S. maltophilia</i>	MEM	119	20,256	<i>P. aeruginosa</i>	MEM
19	20,109	<i>Enterobacter cloacae</i>	CAZ	83	20,191	<i>E. coli</i>	CAZ
25	20,116	<i>P. fluorescens</i>	MEM	88	20,196	<i>E. coli</i>	CAZ
32	20,126	<i>E. coli</i>	CAZ	91	20,199	<i>E. coli</i>	CAZ
37	20,132	<i>P. stutzeri</i>	CAZ	124	20,262	<i>S. maltophilia</i>	MEM
40	20,135	<i>P. aeruginosa</i>	CAZ	100	20,212	<i>Enterobacter cloacae</i>	CAZ
41	20,136	<i>E. coli</i>	CAZ	101	20,213	<i>P. aeruginosa</i>	CAZ
43	20,138	<i>E. coli</i>	CAZ	104	20,240	<i>E. coli</i>	CAZ
50	20,147	<i>E. coli</i>	CAZ	107	20,243	<i>E. coli</i>	CAZ
52	20,153	<i>E. coli</i>	CAZ	108	20,244	<i>E. coli</i>	CAZ
55	20,160	<i>K. pneumoniae</i>	CAZ	109	20,245	<i>E. coli</i>	CAZ
56	20,161	<i>E. coli</i>	CAZ	114	20,251	<i>K. pneumoniae</i>	CAZ
58	20,163	<i>E. coli</i>	MEM	132	20,270	<i>Acinetobacter baumannii</i>	MEM
62	20,168	<i>E. coli</i>	CAZ	135	20,275	<i>P. aeruginosa</i>	MEM
64	20,171	<i>E. coli</i>	CAZ	129	20,267	<i>Enterobacter cloacae</i>	CAZ
67	20,175	<i>K. pneumoniae</i>	MEM	134	20,274	<i>A. hydrocaviae</i>	CAZ
70	20,178	<i>Enterobacter cloacae</i>	MEM	89	20,197	<i>E. coli</i>	CAZ
77	20,185	<i>Enterobacter cloacae</i>	CAZ	103	20,239	<i>S. maltophilia</i>	MEM
90	20,198	<i>E. coli</i>	CAZ	106	20,242	<i>E. coli</i>	CAZ
99	20,211	<i>P. aeruginosa</i>	MEM	120	20,257	<i>P. aeruginosa</i>	MEM

### 5.5.1 Extracción de DNA por método automatizado NucliSENS® EasyMAG®

Se realizó con las 50 muestras elegidas aleatoriamente, las cuales se descongelaron para sembrarse en medio de soya triptica y se incubaron a 37°C por 24 h, después del tiempo

transcurrido se igualaron al 0.5 de MF en 2 mL de buffer de fosfato salino (PBS) en tubos estériles, del cual se tomó 1 mL para agregar en 2 mL de buffer de lisis. Siguiendo el protocolo del equipo NucliSENS® EasyMAG® (bioMérieux, Francia), se registraron los lotes de reactivos a utilizar: buffer de lavado 1,2 y 3 mediante el código de barras, posteriormente se agregó en un tubo estéril 1 mL de sílica magnética con 1 mL de agua Milli-Q, y se homogeneizó en un agitador tipo vórtex, se preparó un contenedor de 24 pocillos con sus puntas, a cada uno se le añadieron 100 µL de esta mezcla, más 2 mL de muestra previamente tratada usando pipetas de transferencia en los pocillos, después se registraron las muestras de la corrida en el equipo (identificación, volumen de elución 25 µL, volumen y tipo de muestra), a continuación se puso el contenedor y las puntas en el equipo, y se registró la posición tanto del contenedor como de la muestra con su respectivo código de barras, después de cerrar el equipo se inició el proceso, una vez extraído el DNA se colocó en tubos estériles Eppendorf de 0.5 mL y se refrigeraron a -20°C hasta su uso.

### 5.5.2 PCR tiempo real

A partir de las 50 muestras seleccionadas (Tabla 7) se realizó la detección de *bla*KPC, *bla*VIM y *bla*OXA-48, utilizando el termociclador de PCR en tiempo real 7500 de Applied Biosystems® (Life Technologies, E.U.) con los cebadores y sondas TaqMan® específicos para cada uno, los cuales fueron elegidos a partir de diversos artículos publicados y se mandaron a sintetizar a la empresa Life Technologies. (Tabla 8, 9)

**Tabla 8.** Cebadores utilizados para la identificación de genes de resistencia mediante PCR en tiempo real

Gen	Secuencia
BA-VIM-F	CGGAGATTGAGAAGCAAATTGG
BA-VIM-R	CGCCCGAAGGACATCAA
BA-OXA48-F	AACGGGCGAACCAAGCA
BA-OXA48-R	TCCTTAACCACGCCCAAATC
BA-KPC-F	GCGCGCACCTATTGTGTTG
BA-KPC-R	TCGCTGTGCTTGTCATCCTT

**Tabla 9.** Sondas específicas utilizadas para PCR en tiempo real

Sonda	Secuencia
BA-KPC-P	VIC-CCGTCTACACCCGGGCGCC
BA-VIM-P	VIC-ACGCACTTTCATGACGACCGGTC
BA-OXA48-P	6FAM-CCTTTAAAATTCCAATAGCTTGATCGCCC

Previo a la preparación de la mezcla de reacción para cada muestra, se encendió el equipo y se abrió el programa “7500 system SDS software”, creando la plantilla a utilizar para indicar el nombre, los pozos específicos a utilizar para las muestras y controles, detector y tipo de placa (número de pozos).

Para la mezcla se usaron placas frías de 96 pozos, agregando a cada pozo un volumen final de 25 µl de acuerdo a la tabla 10, calculándose el número de reacciones a utilizar (material utilizado libre de RNAsas y DNAsas), posteriormente se cubrió cada pozo con su respectiva tapa, se metió la placa al equipo y se programó de acuerdo al protocolo de cebadores. (Tabla 11)

**Tabla 10.** Reactivos utilizados en la mezcla de reacción para PCR en tiempo real

Reactivos	Concentración	Volumen (µl)
Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG*	2X	12.5
Primer F	10 µM	1
Primer R	10 µM	1
Sonda	10 µM	1
H <sub>2</sub> O	-	4
ROX ~	10X	0.5
DNA	-	5

\* Contiene 40 mM Tris-HCl (pH 8.4), 100 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 800 µM dUTP, 40 unidades/ml UDG, 60 unidades/ml Platinum® Taq Polimerasa, estabilizadores

~ Contiene glicina conjugada de 5-carboxi-X-rodamina, succinimidil éster (25 µM) in 20 mM Tris- HCl (pH 8.4), 0.1 mM EDTA, 0.01% Tween\* 20.

**Tabla 11.** Tiempos programados para la detección de los genes de resistencia

Tiempo	Temperatura (°C)
3 minutos	95
20 segundos	95
60 segundos	60

Los controles positivos que se utilizaron fue a partir de DNA de una cepa pura de *Klebsiella pneumoniae* ATCC®BAA-1705™ para KPC, cepas silvestres previamente estudiadas y analizadas genéticamente donadas por el Instituto Nacional de Salud Pública, *P. aeruginosa* para VIM y *Klebsiella pneumoniae* para OXA-48.

Los controles negativos utilizados fueron DNA de *E. coli* ATCC® 25922™ y un pozo con todos los reactivos excepto la muestra.

Al finalizar el tiempo indicado se realizó el análisis de resultados.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Bacterias aisladas e identificadas en los medios de MC con CAZ y MC con MEM

Se aislaron e identificaron 314 Enterobacterias, de las cuales 26 resultaron sensibles a los antibióticos ceftazidima y meropenem y 288 resistentes, las cuales se incluyeron en este estudio, obtenidas de un total de 174 especímenes fecales de pacientes con padecimiento gastrointestinal.

**Tabla 12.** Bacterias resistentes identificadas por el Sistema automatizado Vitek®

Situación de paciente	No. de pacientes	CAZ	Total de bacterias	MEM	Total de bacterias
Hospitalizados	60	<i>E. coli</i>	69	<i>E. coli</i>	4
		<i>P. aeruginosa</i>	5	<i>P. aeruginosa</i>	7
		<i>P. stutzeri</i>	1	<i>P. fluorescens</i>	1
		<i>Klebsiella</i> spp.	22	<i>S. maltophilia</i>	3
		<i>P. putida</i>	1	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	1
		<i>Enterobacter cloacae</i> complex	4	<i>P. putida</i>	2
		<i>Citrobacter</i> spp.	5	<i>Ac. Baumannii</i> complex	1
		<i>Aeromonas</i> spp.	2		
		Total	109	Total	20
Consulta externa	26	<i>E. coli</i>	44	<i>P. putida</i>	1
		<i>P. aeruginosa</i>	2		
		<i>Klebsiella</i> spp.	3		
		<i>Citrobacter</i> spp.	2		
		<i>Enterobacter cloacae</i> complex	2		
		<i>Aeromonas</i> spp.	1		
		Total	54	Total	1
Indeterminado*	48	<i>E. coli</i>	69	<i>Klebsiella</i> spp.	2
		<i>P. aeruginosa</i>	4		
		<i>Klebsiella</i> spp.	15		
		<i>Enterobacter cloacae</i> complex	4		
		<i>Citrobacter</i> spp.	10		
		Total	102	Total	2

\*Indeterminado: paciente en urgencias del cual se desconoce su situación posterior  
*Klebsiella* spp: *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*  
*Citrobacter* spp: *Citrobacter freundii*, *Citrobacter youngae*, *Citrobacter braakii*

## 6.2 Resistencia a antibióticos

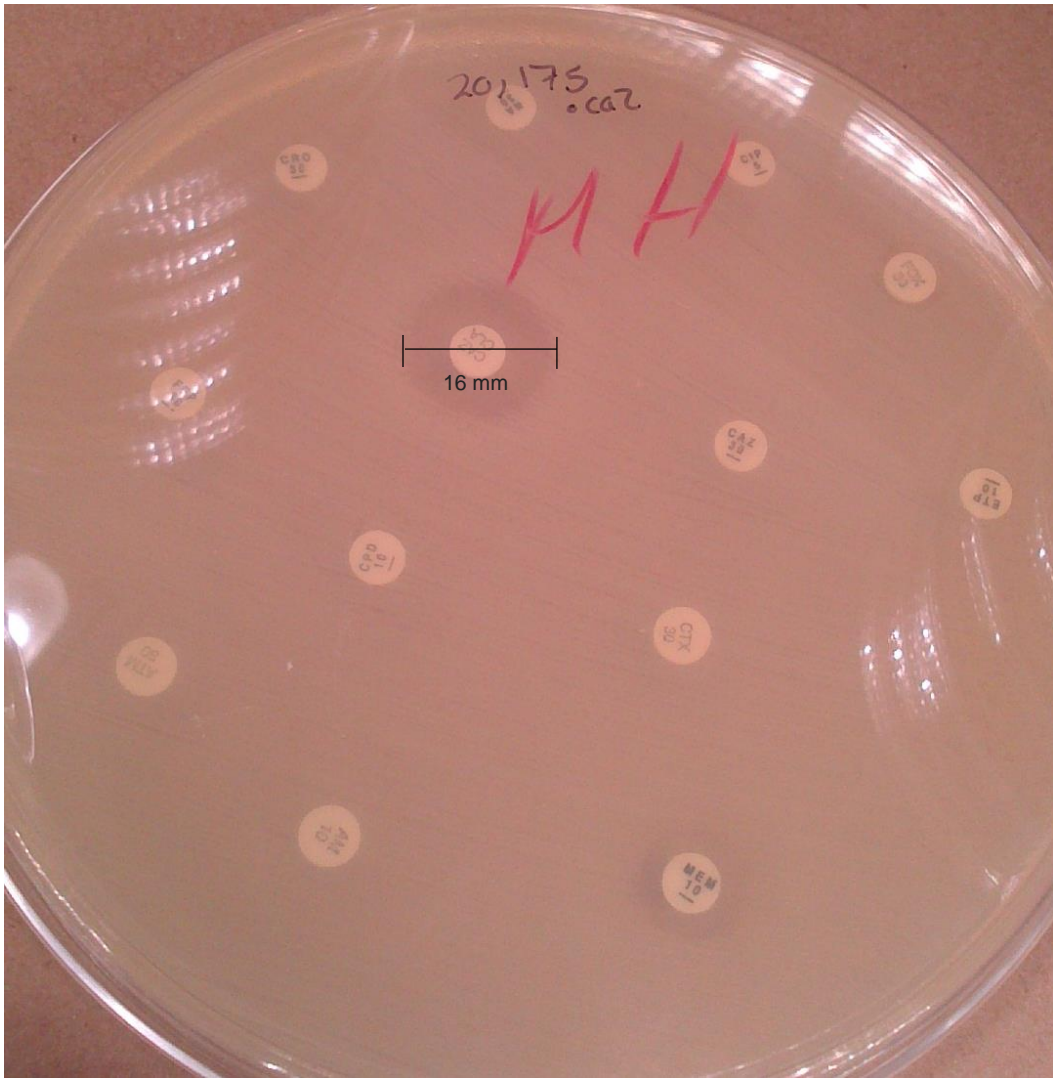
A las bacterias aisladas como se mencionó se les realizó la susceptibilidad a diversos antibióticos, lo cual se muestra en la tabla 13

**Tabla 13.** Porcentaje de resistencia bacteriana por el método de Kirby Bauer

Situación del paciente	Bacteria	Resistencia a antibióticos (%)												
		CAZ	CTX	CPD	FOX	CRO	ATM	AMP	FEP	ETP	CIP	NA	IPM	MEM
Hospitalizado	<i>E. coli</i> (n=73)	87.67	84.93	83.56	38.35	78.08	72.6	100	56.16	6.84	84.93	91.78	1.36	4.1
	<i>Aeromonas</i> spp. (n=2)	S	S	50	50	S	S	100	S	100	S	50	100	50
	<i>Klebsiella</i> spp. (n=22)	59.09	54.54	54.54	27.27	54.54	54.54	95.45	31.81	4.54	13.63	18.18	9.09	S
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex (n=5)	80	80	80	100	80	100	100	20	20	S	S	20	20
	<i>P. putida</i> (n=3)	100	100	100	100	100	100	100	S	100	S	100	33.33	33.33
	<i>P. aeruginosa</i> (n=12)	75	100	100	100	33.33	100	50	91.66	50	S	100	75	75
	<i>P. fluorescens</i> (n=1)	100	100	100	100	100	100	S	100	100	S	100	100	100
	<i>P. stutzeri</i> (n=1)	S	S	S	S	100	100	100	S	S	100	100	S	S
	<i>Citrobacter</i> spp. (n=5)	100	40	80	60	20	40	100	20	S	20	20	S	S
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (n=3)	100	100	100	100	100	100	100	66.66	100	S	33.33	100	100
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (n=1)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Consulta externa	<i>E. coli</i> (n=44)	50	47.72	50	25	43.18	36.36	84.09	27.27	S	45.45	63.63	2.27	S
	<i>P. aeruginosa</i> (n=3)	33.33	100	100	100	100	33.33	100	100	33.33	S	100	S	S
	<i>P. putida</i> (n=1)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	S
	<i>Klebsiella</i> spp. (n=3)	33.33	S	S	S	S	S	100	S	S	S	S	S	S
	<i>Citrobacter</i> spp. (n=2)	S	50	S	100	S	S	50	S	S	S	S	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex (n=2)	S	S	100	100	S	S	100	S	S	S	S	S	S
	<i>Aeromonas</i> spp. (n=1)	S	S	S	S	S	S	100	S	S	S	S	S	S
Indeterminado	<i>E. coli</i> (n=69)	75.36	73.91	78.26	18.84	75.36	66.66	100	36.23	5.79	60.86	82.6	S	S
	<i>P. aeruginosa</i> (n=4)	25	100	100	100	75	25	100	25	75	S	100	S	S
	<i>Klebsiella</i> spp. (n=15)	60	66.66	33.33	40	66	33.33	93.33	20	S	20	33.33	13.33	20
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex (n=4)	25	50	25	75	50	25	100	S	25	S	S	S	25
	<i>Citrobacter</i> spp. (n=10)	60	10	80	80	20	20	80	10	20	20	20	10	S

S=sensible



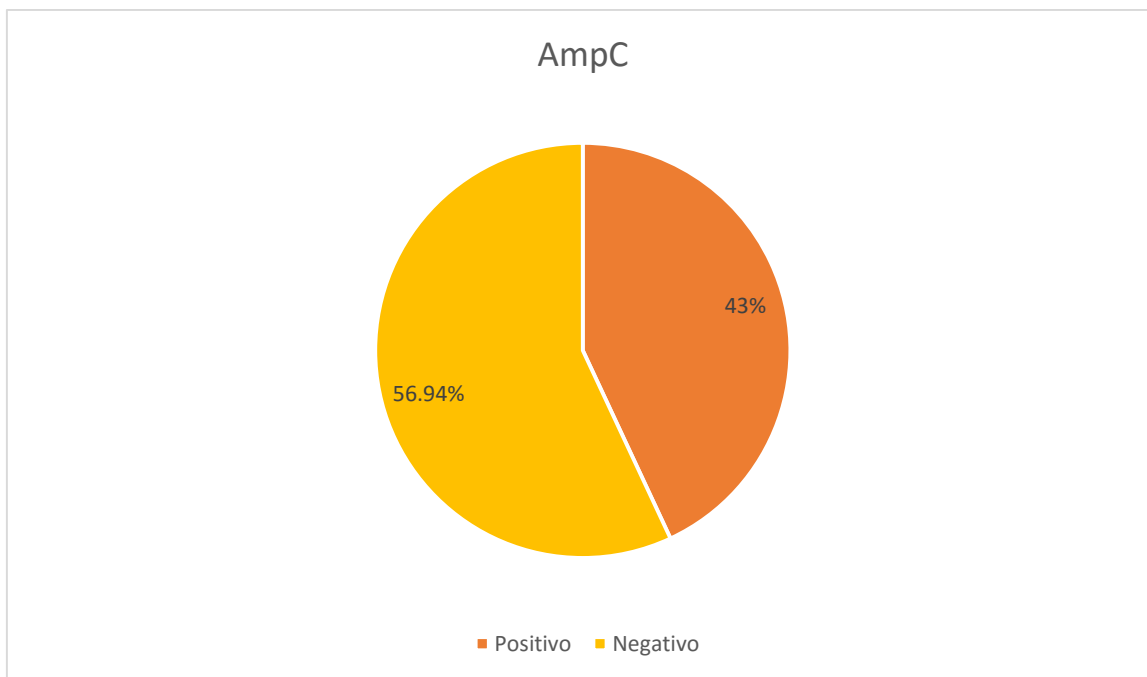


**Figura 6.** Ensayo de Kirby Bauer de la muestra 20,175 de *K. pneumoniae*, se observa que únicamente presenta sensibilidad a CAZ-CLA, mientras que a los demás antibióticos probados es resistente.

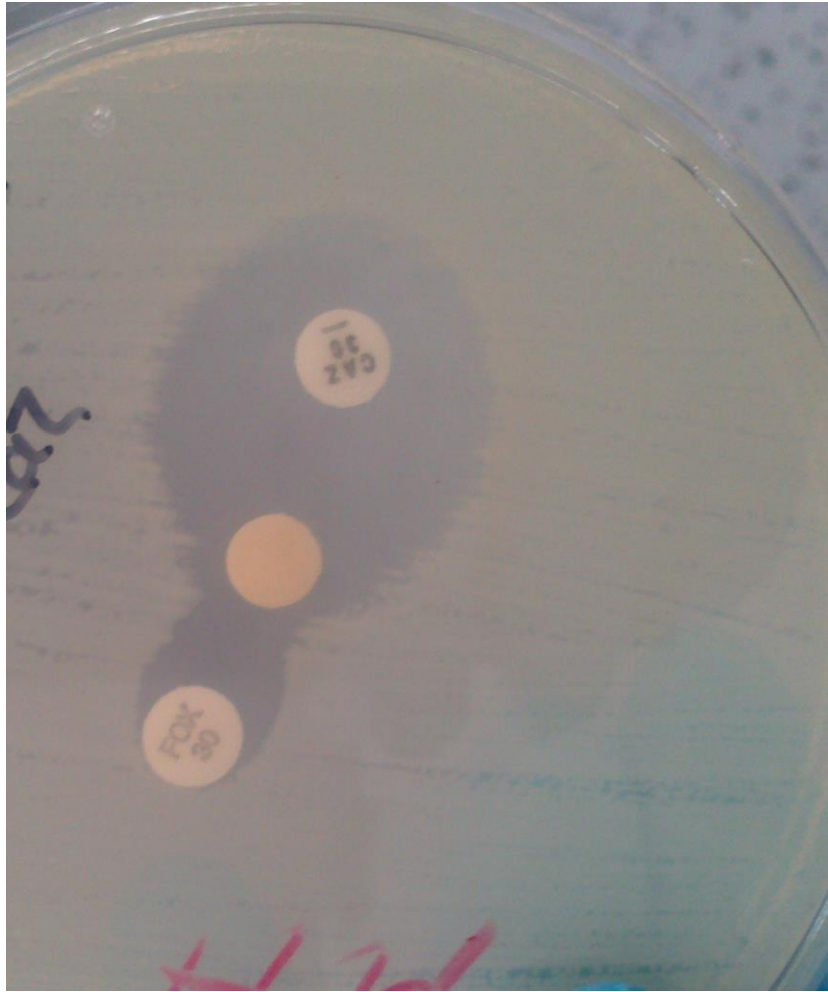
## 6.3 Fenotipificación

### 6.3.1 Detección de AmpC en Enterobacterias aisladas

La fenotipificación se realizó a las bacterias que mostraban un patrón de AmpC, respecto a lo obtenido en Kirby Bauer, a un total de 72 muestras.

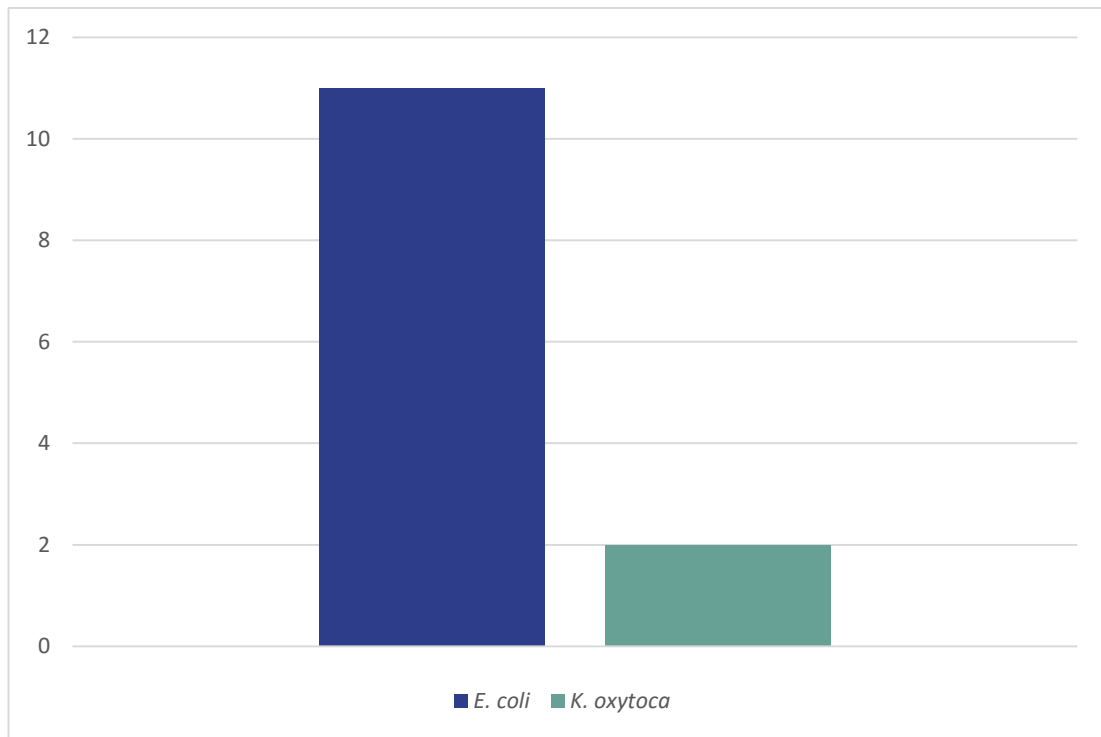


**Gráfico 1.** Porcentaje de muestras positivas y negativas para AmpC obtenido de prueba de sinergismo con los antibióticos FOX, CTT, CTX y CAZ. Se puede observar que la mayoría de las cepas probadas resultaron negativas con un 56.94% mientras que las positivas con un 43%, las cuales fueron: *E. coli* 21 de 40 probadas, *Enterobacter cloacae complex* 4 de 8, *Klebsiella* spp. 4 de 8, *Citrobacter* spp. 4 de 5, *P. putida* 2 de 4, *Stenotrophomonas maltophilia* 1 de 1, *P. aeruginosa* 2 de 6 y *Aeromonas* spp. 1 de 1.



**Figura 7.** Ensayo de sinergismo de la muestra 20,131 aislada de CAZ de *E. coli*. Se observa un alargamiento del halo hacia los antibióticos CAZ y FOX hacia el disco con 300  $\mu$ g de AFB.

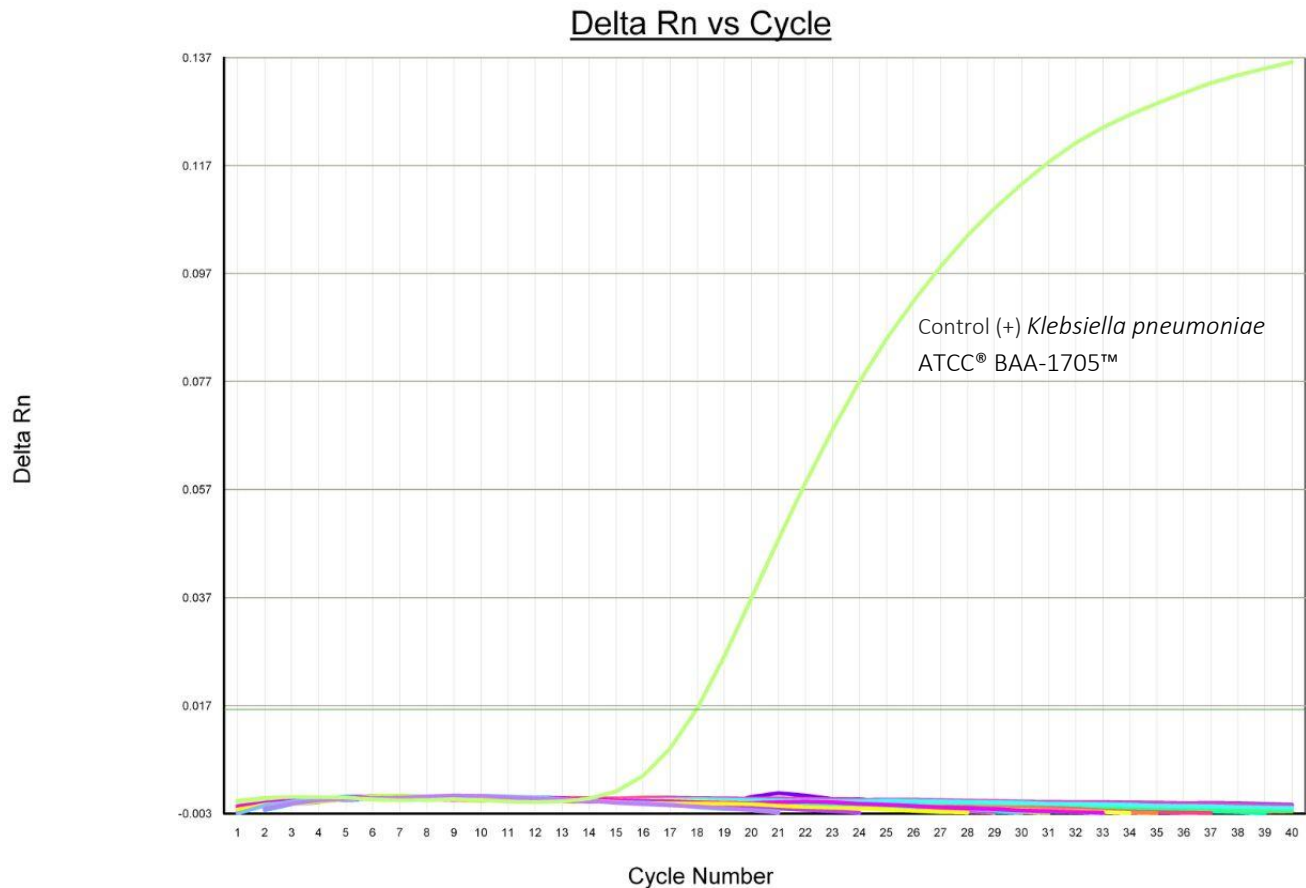
### 6.3.2 Detección de BLEE mediante prueba de confirmación E-test®



**Gráfico 2.** Bacterias positivas en la prueba de E-test para confirmación de la presencia de BLEE. Mediante esta prueba fenotípica se puede observar que 11 cepas de *E. coli* son productoras de BLEE y únicamente 2 aislamientos de *K. oxytoca* se mostraron positivos.

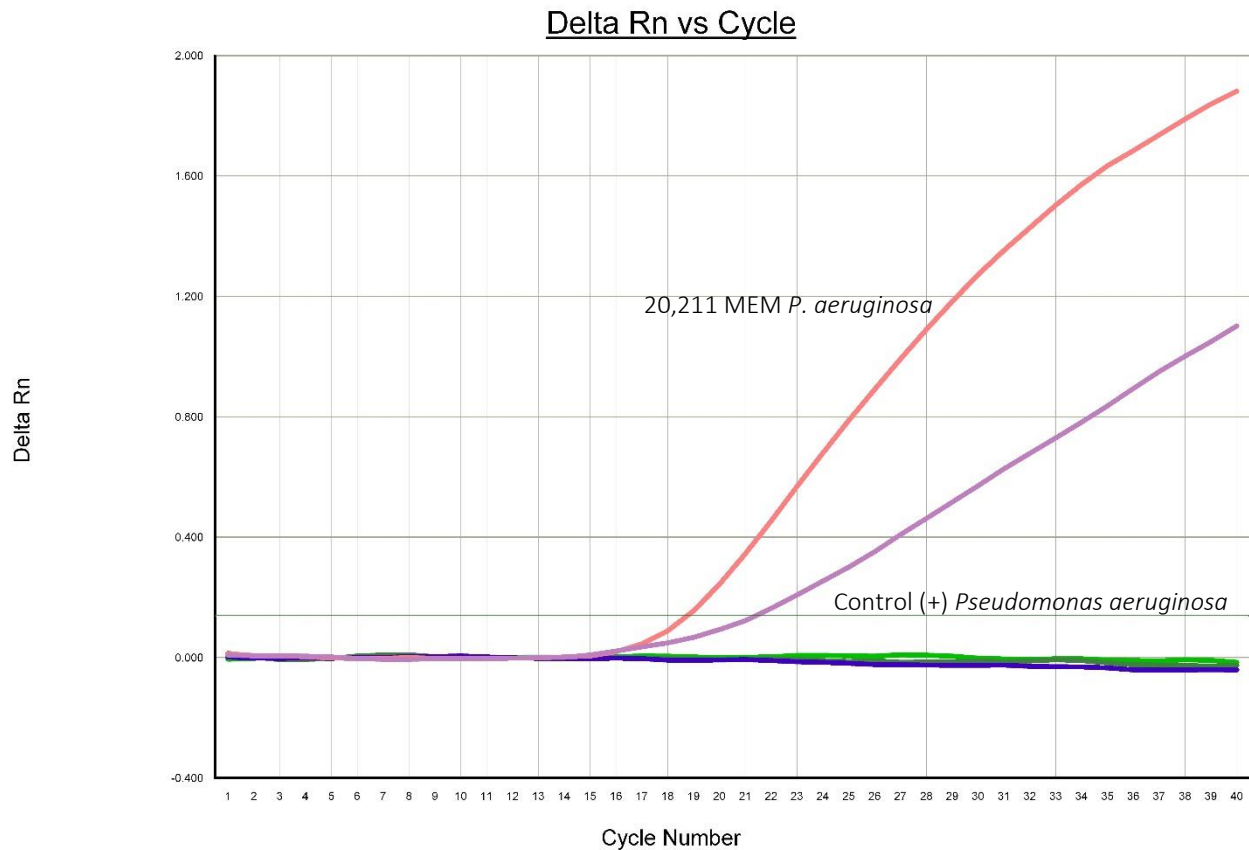
## 6.4 Genotipificación mediante PCR tiempo real

### 6.4.1 Detección de $\beta$ -lactamasas: KPC, VIM y OXA-48



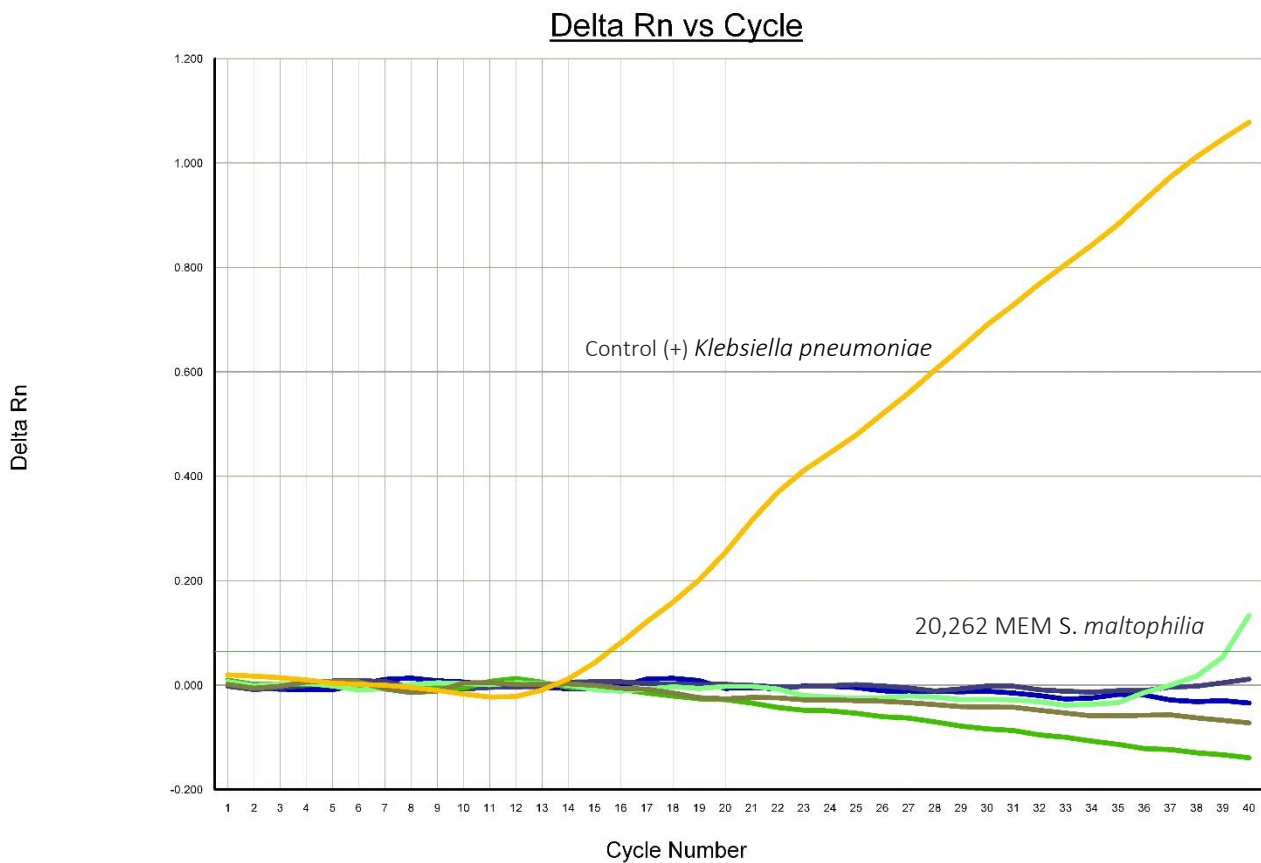
Selected Detector: All  
Well(s): A1-H12  
Document: kpc.sds (Standard Curve)

**Gráfico 3.** Amplificación por PCR tiempo real de KPC-2 de muestras al azar, se aprecia que únicamente amplifica en el ciclo 18 el control positivo de *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-1705™ en verde, mostrando la presencia del gen, mientras que las demás muestras negativas se observan de distintos colores en la línea base.



Selected Detector: VIM; Start: 3; End: 15; Threshold: 0.14020599  
 Well(s): A2,B2,C2,D2,F2  
 Document: IraisTesis.sds (Standard Curve)

**Grafico 4.** Amplificación por PCR tiempo real de VIM de muestras al azar, se aprecia que amplifica en el ciclo 20 el control positivo de *P. aeruginosa* en lila así como la amplificación de la muestra 20,211 en el ciclo 18 en rosa, la cual también es la bacteria *P. aeruginosa*, mostrando la presencia del gen, mientras que las demás muestras negativas se observan de distintos colores en la línea base.



Selected Detector: OXA48; Start: 3; End: 15; Threshold: 0.06460480  
 Well(s): A3,B3,C3,D3,E3,G3  
 Document: IraisTesis1.sds (Standard Curve)

**Gráfico 5.** Amplificación por PCR tiempo real de OXA-48 de muestras al azar, se observa que el control positivo en amarillo de *Klebsiella pneumoniae* amplifica en el ciclo 15, mientras que la muestra 20,262 de *S. maltophilia* en verde amplificó en el ciclo 38, mostrando la presencia del gen, mientras que las demás muestras negativas se observan de distintos colores en la línea base.

## 7. DISCUSIÓN

El desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno natural, no obstante, algunas actividades humanas aceleran su aparición y propagación, razón por la cual, se ha

convertido en una amenaza cada vez más grave para la salud pública mundial. En México, al igual que en muchos otros países en vías de desarrollo, las condiciones que pueden fomentar la resistencia a los antibióticos y su prevalencia difieren de los países desarrollados. En el caso de países en desarrollo, el abuso de antimicrobianos, junto con medicamentos de baja calidad, la contaminación fecal y otros rasgos de hacinamiento, pueden crear entornos ideales para la selección, intercambio y mantenimiento de rasgos de resistencia. (Amábile-Cuevas, 2010).

A partir del aumento en los casos de resistencia que se han encontrado, en los últimos años se han centrado algunos estudios en la microbiota intestinal, ya que el uso de antibióticos, puede causar la propagación de genes de resistencia, por lo que se ha visto es un importante reservorio de estos genes, mismos que podrían ser transferidos desde bacterias intestinales a patógenos o a bacterias oportunistas. (Machado, Coque, Cantón, Sousa, & Peixe, 2013; Porres-Osante, Sáenz, Somalo, & Torres, 2014; Ravi et al., 2014) Por esta razón es muy importante el estudio de microorganismos resistentes, por la cual en el presente estudio se aislaron Enterobacterias resistentes a partir de muestras fecales a cefalosporinas y carbapenémicos en el INCMNSZ.

Como se puede observar en la tabla 12, se aislaron 288 Enterobacterias de diferente género y especie resistentes a Ceftazidima y Meropenem en el medio de MC, de las cuales la mayor resistencia presentada fue a Ceftazidima, la cual es una Cefalosporina de tercera generación con una importante actividad contra *Pseudomonas*, y representa una opción para tratar infecciones adquiridas en hospitales por bacterias Gram negativas (Nichols, 2003), contra 23 resistentes a Meropenem, el cual es un carbapenémico similar al Imipenem con una afinidad ligeramente diferente por las proteínas fijadoras de penicilina específicas, es resistente a la mayoría de las  $\beta$ -lactamasas (Nichols, 2003).

La tasa más elevada de aislamientos se presentó en pacientes hospitalizados en el INCMNSZ, siendo *E. coli* la bacteria más aislada, seguida de *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* y



*Citrobacter* spp., *Enterobacter cloacae* complex y en menor proporción *Aeromonas* spp., *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas putida* con solo un aislamiento para el antibiótico CAZ, mientras que *P. aeruginosa* resultó con mayor resistencia a MEM, seguida de *E. coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *Enterobacter cloacae* complex y *Acinetobacter baumannii* complex con sólo 1 bacteria aislada, lo cual demuestra, que los pacientes hospitalizados presentan mayores tasas de bacterias resistentes a antibióticos aunque se realicen todos los esfuerzos posibles para eliminar o controlar la proliferación de microorganismos en el ambiente hospitalario, esto se debe en parte a que ciertos miembros de la microbiota normal del cuerpo humano son oportunistas y representan un peligro particularmente grande para los pacientes hospitalizados. En el caso de las bacterias del tracto gastrointestinal, se ha demostrado que pueden causar infecciones en heridas y catéteres, lo cual puede transmitirse por medio del personal contaminado y llevar incluso a infecciones nosocomiales, dado que en muchos casos, el huésped se encuentra en un estado comprometido o debilitado, y al ser resistentes no responden al tratamiento ordinario, prolongando la enfermedad, llevando a un mayor riesgo de defunciones y costos más elevados. (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2012; G. Tortora et al., 2007)

Respecto a los pacientes que acuden a consulta externa, *E. coli* nuevamente se encontró en mayor proporción mostrando resistencia a CAZ, seguido de *Klebsiella* spp. y con menor aislamiento *P. aeruginosa*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter cloacae* complex y *Aeromonas* spp., mientras que de MEM únicamente se aisló *P. putida*, estos pacientes si no tienen las medidas de higiene adecuadas podrían también transmitir estas bacterias fecales resistentes, ya que los seres humanos y los animales predisponen a una mayor contaminación de los suministros de alimentos y agua para completar un ciclo de transmisión. Tanto en entornos urbanos como rurales, hay muchos medios por los que los patógenos resistentes se difunden, incluyendo la migración humana, hacinamiento, contaminación química, aguas residuales y aguas subterráneas sin tratar. (Salles, Zurita, Mejía, & Villegas, 2013)

En los pacientes indeterminados también *E. coli* fue la bacteria con mayor aislamiento, en segundo lugar *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., seguido de *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae* complex en CAZ y únicamente 2 *Klebsiella* spp. para MEM.

En estudios del año 2004 al 2010 en América Latina, Fernandez-Canigia, *et al.*, reportaron altos niveles de resistencia a los antimicrobianos en organismos Gram negativos, incluyendo *E. coli*, *Klebsiella* spp. y no fermentadores como *Acinetobacter* spp. y *P. aeruginosa*, Morfín-Otero *et al.*, en un estudio del 2005 al 2010 en dos hospitales mexicanos, la bacteria más aislada con frecuencia fue *E. coli*, seguido de *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* el tercero más aislado, *Acinetobacter* y *Enterobacter*, mientras que en 2010 Bailey *et al.*, en Australia, como un estudio internacional, a partir de muestras de pacientes sanos, *E. coli* fue la única especie dominante en un 62-99%, además de otras especies detectadas fueron *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, especies de *Enterobacter* e incluso *P. aeruginosa* en un rango de 1–38%, de acuerdo a una revisión hecha por Salles *et al.*, en 2008, había 23 centros en diez países de América Latina (Argentina, Brasil, Chile, Colombia, República Dominicana, Guatemala, México, Panamá, Perú, Venezuela) que participaron en SMART (The Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends), de 1003 bacilos Gram negativos aislados, *E. coli* estuvo presente en el 50%, *K. pneumoniae* (15%), y *Enterobacter cloacae* (7%).

Comparando estos estudios con lo obtenido, a pesar de basarse únicamente en pacientes del hospital, estos resultados muestran como en la comunidad mexicana sigue el patrón de mayores aislamientos resistentes de *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter* spp. y *Enterobacter* spp., lo que puede deberse a que como la microbiota subdominante está compuesta por anaerobios facultativos pertenecientes a varias especies de la familia *Enterobacteriaceae*, principalmente *E. coli*, pero también incluye los géneros *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*. (Collignon & Butel, 2006). La única excepción con dichos estudios fue *Acinetobacter* spp., ya que en este caso únicamente

se aisló un espécimen, lo que puede indicar una tasa de reducción en las infecciones producidas por este patógeno nosocomial.

Después de aislar en el medio MC se realizó la susceptibilidad por el método de Kirby Bauer con los 14 antibióticos utilizados, como se muestra en la tabla 13 para cada rubro de pacientes. En el caso de las bacterias más resistentes con mayor aislamiento, Llanes *et al.*, reportó que a nivel mundial, los informes de pruebas de susceptibilidad de resistencia a antibióticos de *E. coli* van desde 6,8% a 91%, con un promedio general de 52,9%. La tasa de resistencia a la Ceftriaxona fue ligeramente menor que 60%, y un poco más del 50% a la Ceftazidima; las bacterias muestran menos resistencia a Imipenem. Nuestros resultados están de acuerdo con los reportados, tanto de su resistencia como en que en los que los Carbapenémicos fueron los antibióticos con la menor resistencia. Otro estudio reportado por Morfín-Otero *et al.*, en Monterrey, los aislamientos de *Klebsiella* spp. mostraron altas tasas de resistencia a ceftazidima, pero relativamente baja resistencia a las Fluoroquinolonas, lo cual también concuerda con los resultados obtenidos, además de acuerdo al CLSI, en el caso de *K. pneumoniae*, posee una resistencia intrínseca a Ampicilina, mientras que para *Pseudomonas aeruginosa* en sus aislamientos presentaron altas tasas de resistencia a los Imipenem y Meropenem, y en los resultados mostrados únicamente este patrón se presentó en pacientes hospitalizados, además esta bacteria presenta una resistencia intrínseca a Cefotaxima, Ceftazidima y Ertapenem. Sader *et al.*, incluye en su estudio que la hidrólisis de carbapenémicos, en donde se demostró en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. (con resistencia intrínseca a Aztreonam y Ertapenem) y *P. fluorescens*, mismas bacterias que mostraron un patrón de resistencia similar.

Respecto a *P. putida*, se han reportado aislados con resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y se cree que pueden actuar como reservorios ambientales de dicha resistencia (Meireles *et al.*, 2013), mismas que muestran resistencia a diversos antibióticos tanto en pacientes hospitalizados como en ambulatorios.

Otro aislamiento en menor proporción fue *Stenotrophomonas maltophilia*, una bacteria ambiental encontrada en hábitats acuosos y alimentos, y patógeno oportunista mundial multirresistente emergente, posee resistencia intrínseca a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, Cefalosporinas, Fluoroquinolonas, Aminoglucosidos, Macrólidos, Tetraciclinas, y a Carbapenémicos, debido a la baja permeabilidad de la membrana que contribuye a la resistencia, la presencia de bombas de eflujo cromosómicamente codificadas da resistencia a múltiples fármacos, además de  $\beta$ -lactamasas. Se sugiere que esta resistencia pudo haberse adquirido en entornos naturales y no se debe únicamente a la utilización de antibióticos en los centros médicos, además de usar su maquinaria metabólica para desintoxicar y descomponer compuestos nocivos (incluyendo antibióticos). Las vías bioquímicas utilizadas por estas bacterias pueden permitir el uso de antibióticos como fuentes de alimento (Brooke, 2012), dicho microorganismo se aisló solamente de pacientes hospitalizados, lo cual demuestra que es una bacteria oportunista y con multirresistencia que presenta únicamente sensibilidad a Ciprofloxacino.

*Aeromonas* spp. aisladas de pacientes hospitalizados y de consulta externa, se han asociado con varios brotes de origen alimentario y se han encontrado en pacientes con diarrea del viajero. Actualmente, es un patógeno entérico emergente porque tienen la capacidad inherente para crecer en sistemas de distribución de agua, especialmente en biopelículas, donde pueden ser resistentes a la cloración (Igbinosa, Igumbor, Aghdasi, Tom, & Okoh, 2012), dichas bacterias desde hace mucho tiempo han exhibido resistencia a Penicilinas, como Ampicilina, y su resistencia es usualmente mediada cromosómicamente, pero en el caso de las  $\beta$ -lactamasas producidas, estas ocasionalmente pueden ser codificadas por plásmidos o integrones (Awan, Maqbool, Bari, & Krovacek, 2009), lo cual se puede observar en el patrón de resistencia obtenido.

De acuerdo a los estudios hechos del 2004 al 2010, *Enterobacter cloacae* presentaba una resistencia a Ceftazidima del 40.5%, a Ceftriaxona del 45.5% y a los Carbapenémicos Imipenem y Meropenem del 1.4 y 3.8 respectivamente en Latinoamérica (Fernández-Canigia

& Dowzicky, 2012), en la resistencia presentada, dicha tasa de resistencia aumentó en los 4 antibióticos ya que en el caso de hospitalizados para Ceftazidima y Ceftriaxona se duplicó, además de que la resistencia intrínseca a Ampicilina de *Enterobacter cloacae* se presenta en todos los casos.

Conforme a un estudio realizado en Latinoamérica en 2011, Jones *et al.*, reportó que *Citrobacter* spp presentaba una resistencia a Ceftazidima del 25%, a Ceftriaxona 32.1%, Meropenem de 1.8% y a Cefepime 10.7%, en lo obtenido se observa que todas las bacterias aisladas son sensibles a Meropenem, mientras que al comparar Ceftazidima en caso de hospitalizaciones muestra una resistencia del 100%, mientras que a Ceftriaxona se ve disminuida con respecto al estudio, y en el caso de Cefepime se ve aumentada la resistencia, además en el caso de *Citrobacter freundii* posee una resistencia intrínseca a Ampicilina. Se ha demostrado que los mejores indicadores de la producción de BLEE son Ceftazidima para SHV y TEM, Cefotaxima para CTX-M, Cefepime y Cepodoxima para otras  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro.(Livermore & Brown, 2005; Pino I et al., 2007)

Después de observar la resistencia en Kirby Bauer y de acuerdo al patrón presentado, se realizaron las pruebas fenotípicas, las cuales se muestra el porcentaje en el gráfico 1 para AmpC, que son  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de clase C, a menudo inducibles en la presencia de ciertos  $\beta$ -lactámicos tales como Cefoxitina o Imipenem, pero que confieren un perfil de resistencia amplio cuando están desreprimidas, hiperproducidas o mediadas por plásmidos. Estas enzimas, suponen una enorme repercusión en los tratamientos clínicos porque son activos contra todos los  $\beta$ -lactámicos, excepto las Cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos. *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Providencia* y *Morganella*, poseen estas  $\beta$ -lactamasas cromosómicas inducibles. (García, de la Gándara, & García, 2010; Porres-Osante et al., 2014), como se observa el 43% de las bacterias presentaron un patrón de AmpC.

Además de la presencia del tipo AmpC, se realizó la búsqueda de otras BLEE, como se puede ver en el gráfico 2, usando E-test, únicamente 13 fueron indicativos fenotípicamente de la presencia de BLEE, de las cuales 11 *E. coli* y 2 *K. oxytoca*. Cepas productoras de BLEE se han reportado alrededor del mundo en diferentes géneros de la familia *Enterobacteriaceae* y se han aislado a partir de diferentes muestras clínicas, es un mecanismo común y de fácil detección fenotípica en bacilos Gram negativos fermentadores de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*, aunque no lo es para *P. aeruginosa*. (Aquino-andrade et al., 2009; Fernández-Canigia & Dowzicky, 2012). Los resultados obtenidos en estos pacientes, muestran semejanza con respecto a *E. coli* en los estudios realizados en América Latina, ya que Llaca-Díaz et al. y Salles et. al., han reportado que aislamientos de *E. coli* son positivos para BLEE, pero también se ha demostrado la presencia de dichas enzimas en *Klebsiella pneumoniae*, y en esta población de estudio fue encontrada en otra especie del género *Klebsiella*.

Posterior a esto, se realizó PCR en tiempo real en búsqueda de la presencia de las enzimas KPC, VIM y OXA48, para demostrar si conferían la resistencia previamente obtenida, en el gráfico 3 se observa que únicamente amplificó el control positivo *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-1705™, lo que indica que las muestras de la comunidad del hospital que se probaron no poseen KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), la cual es de naturaleza plasmídica asociada al trasposón *Tn4401*, a pesar de que se ha reportado en un número cada vez mayor de Enterobacterias y de bacilos no fermentadores, aislándose en *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *S. marcescens*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Salmonella enterica* y *Raultella* spp. (Tzouveleki, Markogiannakis, Psychogiou, Tassios, & Daikos, 2012), mientras que en América Latina fue encontrada por primera vez en Colombia, y posteriormente encontrada en Brasil, Argentina y en algunos informes también han demostrado su presencia de productores en Puerto Rico y México, respecto a nuestro país se han realizado estudios en donde en 2 brotes se obtuvieron las cepas KPC-2 y otro aislamiento de KPC-3 (Garza-Ramos et al., 2014; Maya et al., 2013; Nordmann et al., 2011; Rodríguez-Zulueta et al., 2013). Debido a que los genes que codifican esta enzima se

encuentran en elementos genéticos móviles (Maya et al., 2013), al existir estos hallazgos en distintos países, a pesar de no existir en las muestras la presencia, demuestra la facilidad de transmisión y que incluso en el país existen otras muestras con la presencia de KPC.

Para la segunda enzima buscada, se observa en el gráfico 4 para VIM (Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase) que sólo la muestra 20,211 aislada del medio adicionado con MEM proveniente de un paciente hospitalizado, *P. aeruginosa*, es productora de VIM, una metallo- $\beta$ -lactamasa, las cuales fueron descritos inicialmente en los cromosomas de las bacterias ambientales y patógenos oportunistas, a diferencia de las carbapenemasas cromosómicas, las metallo- $\beta$ -lactamasas forman parte de los elementos genéticos móviles, por lo que han demostrado un aumento alarmante entre las bacterias clínicamente importantes, no sólo en América Latina sino en todo el mundo, en donde se ha encontrado en *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Proteus stuartii*, *P. mirabilis*. (Tzouvelekis et al., 2012) De acuerdo a estudios a partir del 2004, se ha reportado en Latinoamérica su presencia en Chile, Venezuela, Brasil, Colombia, Argentina y en México entre las diferentes especies de *Pseudomonas*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* y *Providencia rettgeri* (Maya et al., 2013). Además de la presencia de dicha carbapenemasa, *P. aeruginosa* suele conferir resistencia de alto nivel a carbapenémicos, debido principalmente a su mayor resistencia intrínseca, determinada por la producción de la cefalosporinasa inducible AmpC, la expresión basal de bombas de expulsión (sobre todo MexAB-OprM) y la pérdida de la porina OprD. (Nicolau & Oliver, 2010) A pesar de haberse encontrado en una muestra de *P. aeruginosa*, su presencia en el Instituto sugiere que desde su descubrimiento se ha diseminado en la comunidad, y podría encontrarse ya en otros pacientes y continuar con su transmisión entre bacterias.

Finalmente en el gráfico 5 se observa, la muestra 20,262 de un paciente hospitalizado aislada del medio adicionado con MEM, *S. maltophilia*, por lo que demuestra la presencia del gen blaOXA-48, el cual se encuentra en Tn1999, un transposón compuesto hecho de dos copias

de la secuencia de inserción IS1999 (Aubert, D., *et al.*, 2006) , dicho gen confiere alto nivel resistencia a la mayoría de los compuestos  $\beta$ -lactámicos, tales como penicilinas y cefalosporinas, pero de forma variable afecta la susceptibilidad a carbapenémicos esta enzima tiene la mayor tasa de hidrólisis entre los enzimas de tipo OXA, y se ha detectado alrededor del mundo en Turquía, Medio Oriente, norte de África, Reino Unido, Bélgica, Francia, Países Bajos, India y Senegal en cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *C. freundii*, *P. mirabilis*. En América Latina (Argentina, Brasil, Colombia, Guatemala, Uruguay, México y Panamá), OXA-48 y OXA-163 (que difiere de OXA-48 por una sustitución de un aminoácido y por una menor capacidad para hidrolizar carbapenémicos) solamente se han reportado en cepas de *E. cloacae* y *K. pneumoniae* (Gijón, Curiao, Baquero, Coque, & Cantóna, 2012; Kanj & Kanafani, 2011; Maya *et al.*, 2013; Tzouveleki *et al.*, 2012), su presencia demuestra también como de las demás enzimas su capacidad de fácil transmisión.

En los casos de la presencia de OXA-48 en *S. maltophilia* y VIM en *P. aeruginosa*, al provenir ambas de pacientes hospitalizados podrían estar presente debido a que adquirieron las bacterias genes de resistencia al ser tratados con antibióticos durante un largo periodo de tiempo, en una infección nosocomial, o el ser transferido el paciente desde otro centro de salud ya colonizado o infectado con la bacteria productora de la carbapenemasa e incluso ya tener al microorganismo con este gen adquirido en el entorno desde antes sin presentar algún síntoma, por lo que podría darse un seguimiento a las demás bacterias aisladas de los mismos pacientes para observar si se ha transmitido el gen y de igual manera al personal que ha estado en contacto con dichos pacientes. Aunque únicamente se encontraron dos carbapenemasas, se presentó una cierta variabilidad en todas las bacterias con resistencia, que puede explicarse mediante la posible adquisición de otros mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, tales como la alteración en la permeabilidad mediado por porinas o la adquisición de bombas de expulsión, sin embargo no se puede descartar la presencia de otras carbapenemasas como NDM, IMP, GES, o BLEE clásicas, con actividad fundamentalmente penicilinasas e inhibibles por el Ácido Clavulánico, como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, codificadas en plásmidos, que han sustituido de 1 a 3 aminoácidos cercanos al sitio



activo confiriendo resistencia a aztreonam, cefotaxima y ceftazidima, además de CTX-M, cefotaximasa procedente de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas del género *Kluyvera*, (Andrade, *et al.*, 2004) ya que de acuerdo con lo obtenido en Kirby-Bauer y pruebas fenotípicas, se puede dar una idea de la presencia de dichas enzimas clásicas.

Es importante dar un seguimiento de estos pacientes debido a que el depósito de los productores de carbapenemasas y otras BLEE sigue siendo la flora intestinal, por lo que muestras de frotis fecales y rectales son adecuadas para la realización de pruebas de detección.(Nordmann, Naas, & Poirel, 2011)

## 8. CONCLUSIONES

- Se realizó el aislamiento e identificación de distintos géneros y especies de la familia de Enterobacterias resistentes a cefalosporinas y carbapenémicos principalmente *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter* spp. y *Enterobacter* spp.
- La resistencia elevada obtenida en esta muestra poblacional demuestra que en México, y específicamente en el INCMNSZ, los pacientes poseen en el tracto gastrointestinal bacterias que pueden diseminarse tanto a otros pacientes como a personas externas.
- El uso de ensayos fenotípicos permite dar una idea de la presencia de una BLEE, y debe realizarse en laboratorios de microbiología clínica.
- La mayor prevalencia se dio para AmpC, mostrando su presencia en *E. coli*, *Enterobacter cloacae* complex, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *P. putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *P. aeruginosa* y *Aeromonas* spp., mientras que la presencia de enzimas de tipo KPC no se aisló en dichas muestras, VIM únicamente en *P. aeruginosa* y OXA-48 en *S. maltophilia*, lo que demuestra que no son el principal

mecanismo de resistencia y dichas bacterias usan sus diferentes mecanismos tanto intrínsecos como extrínsecos.

- De acuerdo a lo obtenido, se demuestra la presencia de BLEE, por lo que es importante llevar a cabo una vigilancia epidemiológica continua de los aislamientos resistentes a carbapenémicos y cefalosporinas en los hospitales de México.
- En el INCMNSZ es importante realizar este tipo de estudios de monitoreo a los pacientes para tener conocimiento y dar seguimiento a los microorganismos resistentes que se encuentran en el hospital, ya que pueden ser causantes de infecciones intrahospitalarias y llevar a una estadía prolongada que aumenta los costos tanto para pacientes como para el instituto debido al mayor uso de medicamentos, la necesidad de aislamiento, más estudios de laboratorio y otros con fines de diagnóstico.

## 9. REFERENCIAS

1. **Amábile-Cuevas, C.** (2010). Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *Journal of Infection in Developing Countries*, 4, 126–131.
2. **Andrade, V., Espinosa De Los Monteros, L. E., Jiménez, V., Cervantes, C., & Silva, J.** (2004). Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la  $\beta$ -lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. *Salud Publica de México*, 46(6), 524–528.
3. **Aubert, D., Naas, T., He, C., Poirel, L., & Nordmann, P.** (2006). Functional Characterization of IS 1999 , an IS 4 Family Element Involved in Mobilization and Expression of  $\beta$ -Lactam Resistance Genes. *Journal of Bacteriology*, 188(18), 6506–6514.
4. **Awan, M. B., Maqbool, A., Bari, A., & Krovacek, K.** (2009). Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* spp. isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *New Microbiológica*, 32, 17–23.

5. **Bailey, J. K., Pinyon, J. L., Anantham, S., & Hall, R. M.** (2010). Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. *Journal of Medical Microbiology*, 59(Pt 11), 1331–9.
6. **Becerra, G., Plascencia, A., & Luévanos, A.** (2009). Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(2), 70–76.
7. **Brenner, D. J., & Farmer, J. J.** (2007). Enterobacteriales. In G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, & J. R. Staley (Eds.), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2* (2nd ed.). Springer Science & Business Media.
8. **Bush, K., & Jacoby, G. A.** (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–76.
9. **Clark, D. P.** (Ed.). (2005). Plasmids. In *Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution* (p. 444). England: Academic Press.
10. **Collignon, A., & Butel, M.-J.** (2006). Establishment and Composition of the gut microflora. In Jean-Claude Rambaud & Jean-Paul Buts (Eds.), *Gut Microflora: Digestive Physiology and Pathology* (pp. 22–23). Paris: John Libbey Eurotext.
11. **Costa, J.** (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 22(5), 299–305.
12. **Davies, J., & Davies, D.** (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74(3), 417–33.
13. **Delost, M. D.** (Ed.). (2014). Enterobacteriaceae. In *Introduction to Diagnostic Microbiology for the Laboratory Sciences*. Jones & Bartlett Publishers.
14. **Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Sargent, M., Gill, S. R., Relman, D. A.** (2006). Diversity of the human intestinal microbial flora, *308*(5728), 1635–1638.
15. **Engelkirk, P. G., & Duben-Engelkirk, J. L.** (Eds.). (2008). Gram negative bacilli: The Family Enterobacteriaceae. In *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins.

16. **Fernández-Canigia, L., & Dowzicky, M. J.** (2012). Susceptibility of important Gram-negative pathogens to tigecycline and other antibiotics in Latin America between 2004 and 2010. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*.
17. **Forbes, B., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S.** (Eds.). (2009). Principios de la acción y de la resistencia a los antimicrobianos. In *Diagnostico Microbiológico* (12th ed., pp. 172–180). Médica Panamericana.
18. **Forbes, B., Sahm, D., & Weissfeld, A.** (Eds.). (2009). Métodos analíticos de identificación y caracterización de microorganismos basados en los ácidos nucleicos. In *Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico* (12th ed., p. 135). Buenos Aires: Médica Panamericana.
19. **García, C. S., de la Gándara, M. P., & García, F. J. C.** (2010). Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 28(Supl 1), 12–18.
20. **Garza-González, E., Mendoza Ibarra, S. I., Llaca-Díaz, J. M., & González, G. M.** (2011). Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates at a tertiary-care centre in Monterrey, Mexico. *Journal of Medical Microbiology*, 60(Pt 1), 84–90.
21. **Garza-Ramos, U., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Sánchez-Pérez, A., Tamayo-Legorreta, E., Ibarra-Pacheco, A., Silva-Sanchez, J.** (2014). Characteristics of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) clinical isolates from outbreaks in 2 Mexican medical centers. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(4), 483–485.
22. **Garza-Ramos, U., Martínez-Romero, E., & Silva-Sánchez, J.** (2007). SHV-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) are encoded in related plasmids from enterobacteria clinical isolates from Mexico. *Salud Pública de México*, 49(6), 415–21.
23. **Gijón, D., Curiao, T., Baquero, F., Coque, T. M., & Cantóna, R.** (2012). Fecal carriage of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: A hidden reservoir in hospitalized and nonhospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(5), 1558–1563.

24. Girard, R., Perraud, M., Prüss, A., Savey, A., Tikhomirov, E., Thuriaux, M., & Vanhems, P. (2003). Prevención de las infecciones nosocomiales. [http://www.who.int/csr/resources/publications/ES\\_WHO\\_CDS\\_CSR\\_EPH\\_2002\\_12.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/ES_WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12.pdf)
25. Giske, C. G., Martinez-Martinez, L., Cantón, R., Stefani, S., Skov, R., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M. (2014). Antimicrobial susceptibility testing EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) disk diffusion method. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/Version\\_4/Manual\\_v\\_4.0\\_EUCAST\\_Disk\\_Test.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Version_4/Manual_v_4.0_EUCAST_Disk_Test.pdf)
26. González R, G., Mella M, S., Zemelman Z, R., Bello T, H., & Domínguez Y, M. (2004). Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista Médica de Chile*, 132, 619–626.
27. Guarner, F., & Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361(9356), 512–9.
28. Igbinosa, I. H., Igumbor, E. U., Aghdasi, F., Tom, M., & Okoh, A. I. (2012). Emerging Aeromonas Species Infections and Their Significance in Public Health. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–13.
29. Janda, Michael J., Abbott, S. L. (2009). The family Enterobacteriaceae. In L. H. Goldman, Emanuel, Green (Ed.), *Practical Handbook of Microbiology* (2nd ed., pp. 217–222). CRC Press.
30. Jones, R. N., Guzman-Blanco, M., Gales, A. C., Gallegos, B., Castro, A. L. L., Martino, M. D. V., Castanheira, M. (2013). Susceptibility rates in Latin American nations: Report from a regional resistance surveillance program (2011). *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 17(6), 672–681.
31. Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. P., & Chassard, C. (2012). New insights in gut microbiota establishment in healthy breast fed neonates. *PloS One*, 7(8), e44595.
32. Kang, H. Y., Jeong, Y. S., Oh, J. Y., Tae, S. H., Choi, C. H., Moon, D. C., Lee, J. C. (2005). Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in Escherichia

- coli isolates from humans and animals in Korea. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(5), 639–44.
33. **Kanj, S. S., & Kanafani, Z. A.** (2011). Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Foundation for Medical Education and Research*, 86(3), 250–9.
34. **Kayser, F. H.** (2005). Bacteria as Human Pathogens. In K. A. Kayser, F.H., Bienz (Ed.), *Medical Microbiology* (10th ed., pp. 278–284). Alemania: Thieme.
35. **Koneman Elmer W., & Allen, S.** (Eds.). (2008). Bacilos gramnegativos no fermentadores, Enterobacteriaceae. In *Koneman. Diagnóstico Microbiológico* (6a ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana. 220-281, 297, 301-306
36. **Koo, H.J.; Woo, G.J.** (2012) Characterization of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* recovered from foods of animal and fish origin in Korea. *J. Food Prot.*, 75, 966–972.
37. **Lescano, A. G., Montgomery, J. M., & Blazes, D. L.** (2010). Outbreak Investigation. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, & R. Dolin (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases* (7th ed.). United States: Churchill Livingstone Elsevier.
38. **Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., Roy, P. H., & Roy, P. H.** (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. These include : PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(1).
39. **Livermore, D. M., & Brown, D. F. J.** (2005). Detection of  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1–16.
40. **Llaca-Díaz, J. M., Mendoza-Olazarán, S., Camacho-Ortiz, A., Flores, S., & Garza-González, E.** (2012). One-year surveillance of ESKAPE pathogens in an intensive care unit of Monterrey, Mexico. *Chemotherapy*, 58(6), 475–81.

41. Llanes, J. M., Varon, J., Salvador, J., Félix, V., & Pavel, F. (2012). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in Mexico : How serious is the problem ? *The Journal of Infection in Developing Countries*.
42. López Aldeguer, J., Prats Pastor, G. (2005). Infecciones por Enterobacterias patógenas primarias. In S. Ausina Ruiz, Vicente, Moreno Guillén (Ed.), *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (1st ed., pp. 327–336). Ed. Médica Panamericana.
43. Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., Sousa, J. C., & Peixe, L. (2013). Commensal Enterobacteriaceae as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and sul genes in Portugal. *Frontiers in Microbiology*, 4(April), 80.
44. Martínez, L., Gómez, L., & Garau, J. (2005). Infecciones por Pseudomonas. In V. Ausina & S. Moreno (Eds.), *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (1a ed, pp. 347–356). Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana.
45. Maya, J. J., Ruiz, S. J., Blanco, V. M., Gotuzzo, Eduardo; Guzman-Blanco, Manuel; Labarca, J., Salles, M., Quinn, J. P., & Villegas, M. (2013). Current status of carbapenemases in Latin America. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11(7), 657–667.
46. Meireles, C., Costa, G., Guinote, I., Albuquerque, T., Botelho, A., Cordeiro, C., & Freire, P. (2013). Pseudomonas putida are environmental reservoirs of antimicrobial resistance to beta-lactamic antibiotics. *World J Microbiol Biotechnol*, 29, 1317–1325.
47. Merino, L. A. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* : una bacteria con personalidades múltiples. *Revista Argentina de Microbiología*, 727, 7541.
48. Miranda, G., Castro, N., Leñós, B., Valenzuela, A., Garza-ramos, U., Rojas, T., Solo, F. (2004). Clonal and Horizontal Dissemination of Klebsiella pneumoniae Expressing SHV-5 Extended-Spectrum b-Lactamase in a Mexican Pediatric Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 30–35.

49. Molina L., J., & Uribarren B., T. (2014). Generalidades de bacterias. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>
50. Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Silva-Sánchez, J., Rodríguez-Noriega, E., Laca-Díaz, J., Tinoco-Carrillo, P., Garza-González, E. (2013). Characterization of Enterobacteriaceae isolates obtained from a tertiary care hospital in Mexico, which produces extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 19(5), 378–83.
51. Morfín-Otero, R., Tinoco-Favila, J. C., Sader, H. S., Salcido-Gutierrez, L., Perez-Gomez, H. R., Gonzalez-Diaz, E., Rodriguez-Noriega, E. (2012). Resistance trends in gram-negative bacteria: surveillance results from two Mexican hospitals, 2005-2010. *BMC Research Notes*, 5(1), 277.
52. Mosqueda-Gómez, J. L., Montañó-Loza, A., Rolón, A. L., Cervantes, C., Bobadilla-del-Valle, J. M., Silva-Sánchez, J., Sifuentes-Osornio, J. (2008). Molecular epidemiology and risk factors of bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* A case-control study. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 12(6), 653–9.
53. Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., Pfaller, M. A. (Ed.). (2009). Enterobacteriaceae. In *Medical Microbiology* (6th ed., pp. 258–271).
54. Neil, C. A., & Reece, J. B. (Eds.). (2005). Genética de los virus y de las bacterias. In *Biología* (7th ed., pp. 346–357). Médica Panamericana.
55. Nichols, W. K. (2003). Drogas antiinfecciosas. In A. R. Gennaro (Ed.), *Remington Farmacia* (20th ed., pp. 1823, 1826). Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.
56. Nicolau, J. C., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 28(Supl 1), 19-28.
57. Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1791–8.



58. Nørskov-Lauritsen, N., Sandvang, D., Hedegaard, J., Fussing, V., Mortensen, K. K., Sperling-Petersen, H. U., & Schønheyder, H. C. (2001). Clonal origin of aminoglycoside-resistant *Citrobacter freundii* isolates in a Danish county. *Journal of Medical Microbiology*, 50(7), 636–41.
59. O’Sullivan, O., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., Conde, S., Claesson, M. J., Cusack, S., Ross, R. P. (2013). Alterations in intestinal microbiota of elderly Irish subjects post-antibiotic therapy. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(1), 214–21.
60. Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2012). Resistencia a los antimicrobianos (RAM). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
61. Paylan, C., & Durham, R. (2006). Surgical Infections: Principles of Management and antibiotic usage. In T. A. Miller (Ed.), *Physiologic Foundations and Clinical Applications* (3rd ed.). Informa Healthcare.
62. Phongpaichit, S.; Liamthong, S.; Mathew, A.G. (2007); Chethanond, U. Prevalence of class 1 integrons in commensal *Escherichia coli* from pigs and pig farmers in Thailand. *J. Food Prot.*, 70, 292–299.
63. Pino I, C., Domínguez Y, M., González R, G., Bello T, H., Sepúlveda A, M., Mella M, S., Zemelman Z, R. (2007). Extended spectrum beta lactamases (ESBL) production in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from Chilean hospitals belonging to VIII Region. *Revista Chilena de Infectología : Órgano Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 24(2), 137–141.
64. Porres-Osante, N., Sáenz, Y., Somalo, S., & Torres, C. (2014). Characterization of Beta-lactamases in Faecal Enterobacteriaceae Recovered from Healthy Humans in Spain: Focusing on AmpC Polymorphisms. *Microbial Ecology*.
65. Porres-Osante, N., Sáenz, Y., Somalo, S., & Torres, C. (2014). Characterization of Beta-lactamases in Faecal Enterobacteriaceae Recovered from Healthy Humans in Spain: Focusing on AmpC Polymorphisms. *Microbial Ecology*.

66. Power, M. L., Emery, S., & Gillings, M. R. (2013). Into the wild: dissemination of antibiotic resistance determinants via a species recovery program. *PloS One*, 8(5), e63017.
67. Quetglas, E. G., & Azanza, J. R. (2008). Antibióticos  $\beta$ -lactámicos. In A. Moreno, J. C. Leza, I. Lizasoain, M. A. Moro Sánchez, A. Portolés Pérez, & P. Lorenzo Fernández (Eds.), *Velázquez. Farmacología Básica y Clínica* (18th ed., pp. 805–815). Médica Panamericana.
68. Quinones-Falconi, F., Galicia-Velasco, M., Marchiaro, P., Mussi, M. a, Ballerini, V., Vila, a J., Limansky, a S. (2010). Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo-beta-lactamases of the IMP-15 and VIM-2 types in Mexico. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(2), 126–31.
69. Ravi, A., Avershina, E., Ludvigsen, J., L'Abée-Lund, T., & Rudi, K. (2014). Integrons in the Intestinal Microbiota as Reservoirs for Transmission of Antibiotic Resistance Genes. *Pathogens*, 3(2), 238–248.
70. Rodríguez-Zulueta, P., Silva-Sánchez, J., Barrios, H., Reyes-Mar, J., Vélez-Pérez, F., Arroyo-Escalante, S., Garza-Ramos, U. (2013). First outbreak of kpc-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (st258) clinical isolates in a mexican medical center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 4086–4088.
71. Romero Cabello, R. (Ed.). (2007). Enterobacterias y Pseudomonas. In *Microbiología y parasitología humana* (3rd ed. pp. 741-747, 875–876,). México: Médica Panamericana.
72. Sader, H. S., Castanheira, M., Mendes, R. E., Toleman, M., Walsh, T. R., & Jones, R. N. (2005). Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(1), 57–61.

73. Salles, M. J. C., Zurita, J., Mejía, C., & Villegas, M. V. (2013). Resistant gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America. *Epidemiology and Infection*, 141(12), 2459–72.
74. Sepp, E., Stsepetova, J., Lõivukene, K., Truusalu, K., Kõljalg, S., Naaber, P., & Mikelsaar, M. (2009). The occurrence of antimicrobial resistance and class 1 integrons among commensal *Escherichia coli* isolates from infants and elderly persons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8, 34.
75. Skurnik, D., Le Menac’h, A., Zurakowski, D., Mazel, D., Courvalin, P., Denamur, E., Ruimy, R. (2005). Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 3062–5.
76. Stecher, B., Denzler, R., Maier, L., Bernet, F., Sanders, M. J., Pickard, D. J., Hardt, W.-D. (2012). Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1269–74.
77. Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, a L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–64.
78. Stuart, J. C., Diederer, B., Al Naiemi, N., Fluit, A., Arents, N., Thijsen, S., Leverstein-van Hall, M. (2011). Method for phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacter* species in the routine clinical setting. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(7), 2711–3.
79. Surinder, K. (Ed.). (2012). Enterobacteriaceae: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* and other genera. In *Textbook of Microbiology*. JP Medical.
80. Tadesse, Daniel A., Shaohua Zhao, and K. A. (2014). Antimicrobial Agent Mechanisms of Action and Resistance. In *Textbook of Diagnostic Microbiology* (5th edit., pp. 254–273).

81. Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (Eds.). (2007). Genética microbiana, Principios de enfermedad y epidemiología In *Introducción a la microbiología* (9th ed. pp. 214-220, 421-423 ). Médica Panamericana.
82. Turrone, F., Peano, C., Pass, D. a, Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M. J., Ventura, M. (2012). Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS One*, 7(5), e36957.
83. Tzouveleki, L. S., Markogiannaki, a., Psychogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 682–707.
84. Vila, J., & Marco, F. (2007). Antibiotic Resistance in the Intensive Care Unit. In J. Rello, M. H. Kollef, E. Díaz, & A. Rodríguez (Eds.), *Infectious Diseases in Critical Care* (2nd ed. pp. 214-216). Springer.
85. Walker, Kimberly E., Mahon, Connie R., Lehman Donald, G. M. (2014). Enterobacteriaceae. In G. Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., Manuselis Jr. (Ed.), *Textbook of Diagnostic Microbiology* (5th ed. pp. 265, 420-444). Elsevier Health Sciences.
86. Wayne, P.A. CLSI. (2013) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute.