



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

*"Desarrollo de una plataforma de PCR para la identificación
de genes de resistencia a antibióticos en bacterias causales
de sepsis neonatal"*

TESIS PRESENTADA
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
EN EL ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA:

Q.F.B. MARILYN PANECATL RAMOS

Directora de tesis:

Dra. Bertha Alicia León Chávez
Profesora titular del Área de Bioquímica
y Biología Molecular, BUAP

Co-Director de tesis:

Dr. Juan Antonio González Barrios
Jefe del Laboratorio de Medicina Genómica,
Hospital Regional "1º de Octubre", ISSSTE

DICIEMBRE-2016

Resumen

Uno de los periodos de vida en los que el individuo es más vulnerable a los agentes infecciosos es durante la etapa neonatal, debido a la limitada respuesta inmunológica que este presenta. La sepsis es considerada la principal causa de muerte entre los neonatos, tan solo en Latino América se presentan alrededor de 630,000 – 750,000 casos al año, con una mortalidad del 40%. La principal razón de la alta tasa de mortalidad es el retraso en la identificación del patógeno y de la sensibilidad a los antibióticos. Por lo que se hace necesario el desarrollo de una plataforma diagnóstica de PCR, que identifique los genes que confieren resistencia a antibióticos en los 10 principales agentes causales (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella tify*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus β -hemoliticus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Cándida albicans*), que son responsables del 99% de los procesos sépticos. Partiendo del escrutinio y análisis bioinformático de las secuencias de los genes de resistencia a antibióticos, y del diseño de oligonucleótidos para la amplificación de los mismos, se ha hecho la búsqueda de los controles positivos para cada uno de estos genes. Los resultados obtenidos se compararán contra los reportes de cultivo y antibiogramas convencionales.

Estos estudios muestran que existe una multirresistencia a antibioticos con determinantes geneticos compartidos en las cepas estudiadas. El estudio metagenómico mostró una mayor sensibilidad en la identificación de un microorganismo comparado con las pruebas bioquímicas convencionales realizadas por el equipo Vitek, aunados con los errores humanos en el aislamiento de los microorganismo, lo que llevaría a resultados dispares entre la identificación de bacterias Gram negativas o positivas. Por lo que, se propone que en el laboratorio de microbiología que se implemente que se realice una identificación adecuada del microorganismo y su pureza antes de usar el equipo Vitek. Una vez obtenido un correcto aislamiento nos facilitaria su identificación del microorganismo y una correspondencia con los datos obtenidos de la secuenciación y el estudio metagenómico.

Existe un método molecular comercial para la identificación de 3 marcadores de resistencia, el sepsis Seeplex de seegen pero que solo abarca 2 marcadores de resistencia a vancomicina (VanA y van B) y 1 para meticilina (mecA). Por lo que, esta propuesta proporciona un rango más amplio para identificar los genes de resistencia. Sin embargo, existen otros mecanismos de resistencia a antibióticos que no fue considerado en este estudio y que presentan una mayor variabilidad que podrían ser considerados en el futuro. Esta plataforma representa un apoyo para el manejo terapeutico de un paciente, la implementación de un tratamiento en particular es responsabilidad del médico quién considera los casos particulares de cada paciente. Con estos estudios encontramos la correlación del perfil fenotípico de resistencia con el genotípico, donde se encontró por lo menos un determinante genético de resistencia para dicho perfil. De esta forma se logró una plataforma en PCR punto final para la identificación de genes de resistencia a los antibióticos mayormente utilizados en la clínica.

ÍNDICE

Resumen	1
ÍNDICE	4
CAPÍTULO 1. Introducción	10
SEPSIS NEONATAL	12
Epidemiología	12
Signos y síntomas	13
Clasificación de la sepsis neonatal	13
Etiología en la sepsis neonatal	14
Diagnóstico de la sepsis neonatal	15
Tratamiento antibiótico de la sepsis neonatal	17
AGENTES ANTIMICROBIANOS, MECANISMO DE ACCIÓN Y RESISTENCIA	18
Agentes antimicrobianos	18
Mecanismos de resistencia de los agentes antimicrobianos	19
B-lactámicos mecanismo de acción y resistencia	20
Meticilina mecanismo de acción y resistencia	26
Tetraciclinas mecanismo de acción y resistencia	27
Cloranfenicol mecanismo de acción y resistencia	29
Aminoglucósidos mecanismo de acción y resistencia	30
Quinolonas mecanismo de acción y resistencia	32
Antibióticos del grupo MSL (Macrólidos, Liincosamidas y Estreptograminas) mecanismo de acción y resistencia	35
Glicopéptidos mecanismo de acción y resistencia	39
Sulfonamidas y Trimetopim, mecanismo de acción y resistencia	40
Transferencia horizontal de genes de resistencia	42
Resistencia transferible mediante conjugación	43
Resistencia mutacional	43
Plásmidos de resistencia a agentes antibacterianos	44
Transposones	44
Integrones	45
CAPÍTULO 2. Justificación	46
CAPÍTULO 3. Hipótesis	46
CAPÍTULO 4. Objetivos	47
Objetivo general	47
Objetivos específicos	47
CAPÍTULO 5 Material y Métodos	48

Muestras biológicas.....	48
Cultivo y aislamiento	48
Identificación bioquímica	49
Pruebas de sensibilidad a antibióticos	51
Cultivo genérico	53
Extracción de DNA.....	53
Espectrofotometría digital.....	54
Integridad del DNA.....	54
Fotodocumentación	54
PCR punto final	55
Secuenciación masiva.....	56
Fabricación de las librerías.....	56
Fragmentación y marcaje del DNA	56
Amplificación por PCR.....	56
Limpieza del producto de PCR	57
Normalización de la librería.....	58
Formación del pool de librerías para la secuenciación con MiSeq	58
CAPÍTULO 6. RESULTADOS.....	59
Diseño de oligonucleótidos	59
Búsqueda de los controles positivos por PCR punto final.....	60
β-lactamasas.....	60
Estreptograminas.....	62
Quinolonas	64
Vancomicinas	66
Aminoglucósidos	67
Tetraciclinas	69
Macrólidos.....	71
Sulfonamidas y Trimetropim.....	73
Meticilina	74
Secuenciación masiva.....	77
Ensamble de novo Shotgun y análisis metagenómico	77
Análisis bioinformático de los datos obtenidos por secuenciación masiva..	93
CAPÍTULO 7. Discusión de resultados	97
CAPÍTULO 8. Conclusión	117
CAPÍTULO 9. Perspectivas.....	117
BIBLIOGRAFÍA	118

Lista de tablas

Tabla 1. Mecanismo de acción de los diferentes grupos antibióticos.	19
Tabla 2. Protocolo de termociclado para PCR punto final.	55
Tabla 3. Protocolo de termociclado para amplificación en la secuenciación masiva.	57
Tabla 4. Diseño de oligonucleótidos para la búsqueda de genes que codifican B-lactamasas poco comunes.	59
Tabla 5. Cepas analizadas en la búsqueda de genes de resistencia a B-lactamasas.	60
Tabla 6. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a fármacos B-lactámicos.	61
Tabla 7. Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a β -lactámicos.	62
Tabla 8. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a fármacos Estreptograminas	63
Tabla 9. Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a Estreptograminas	63
Tabla 10. Cepas analizadas en la búsqueda de genes de resistencia a Quinolonas.	64
Tabla 11. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a Quinolonas.	65
Tabla 12. Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a Quinolonas.	65
Tabla 13. Cepas analizadas en la búsqueda de genes de resistencia a Vancomicinas.	66
Tabla 14. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a Vancomicinas.	66
Tabla 15. Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a Vancomicinas.	66
Tabla 16. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Aminoglucósidos.	67
Tabla 17. Cepas analizadas en la búsqueda de genes de resistencia a Aminoglucósidos.	67
Tabla 18. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a Aminoglucósidos.	68
Tabla 19. Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a fármacos Aminoglucósidos.	69
Tabla 20. Cepas analizadas en la búsqueda de genes de resistencia a Tetraciclinas.	69
Tabla 21. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a Tetraciclinas.	70
Tabla 22. Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a Tetraciclinas.	70

Tabla 23. Cepas analizadas en la búsqueda de genes de resistencia a Macrólidos.	71
Tabla 24. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a Macrólidos.	72
Tabla 25. Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a Macrólidos.	72
Tabla 26. Cepas analizadas en la búsqueda de genes de resistencia a Sulfonamidas y trimetropim.	73
Tabla 27. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a Sulfonamidas.	74
Tabla 28. Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a Sulfonamidas.	74
Tabla 29. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a Trimetropim.	74
Tabla 30. Configuración de placa para evaluación de genes de resistencia a antibióticos en PCR punto final.	75
Tabla 31. Diseño de la plataforma múltiplex PCR punto final.	76
Tabla 32. Comparativa entre la identificación por métodos bioquímicos y análisis metagenómico, número de secuencias codificantes (CDS), número de contigs obtenidos del ensamble de novo y tamaño total del ensamble.	77
Tabla 33. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 1, identificada como <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	78
Tabla 34. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 2, identificada como <i>Enterococcus faecalis</i> .	79
Tabla 35. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 3, identificada como <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	80
Tabla 36. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 4, identificada como <i>Enterococcus faecalis</i> .	81
Tabla 37. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 5, identificada como <i>Enterococcus faecalis</i> .	82
Tabla 38. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 6, identificada como <i>Acinetobacter baumannii</i> complex.	83
Tabla 39. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 7, identificada como <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	84
Tabla 40. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 8, identificada como <i>Enterococcus faecalis</i> .	85
Tabla 41. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 9, identificada como <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	86
Tabla 42. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 10, identificada como <i>Escherichia coli</i> .	87
Tabla 43. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 11, identificada como <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	88
Tabla 44. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 12, identificada como <i>Acinetobacter colcoeticus</i> .	89
Tabla 45. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 13, no identificada.	90
Tabla 46. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 14, identificada como <i>Enterobacter cloacae</i> .	91

Tabla 47. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 15, identificada como <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	92
---	----

Lista de figuras

Figura 1. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a B-lactamasas.	60
Figura 2. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Estreptogramin	62
Figura 3. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Quinolonas.	64
Figura 4. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Vancomicinas.	66
Figura 5. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Tetraciclinas.	69
Figura 6. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Macrólidos.....	71
Figura 7. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Sulfonamidas.....	73
Figura 8. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Trimetropim.....	73
Figura 9. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Meticilinas.	74
Figura 10. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Cloranfenicol.	75
Figura 11. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 1, identificada como <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	78
Figura 12. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 2, identificada como <i>Enterococcus faecalis</i>	79
Figura 13. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 3, identificada como <i>Staphylococcus epidermidis</i>	80
Figura 14. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 4, identificada como <i>Enterococcus faecalis</i>	81
Figura 15. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 5, identificada como <i>Enterococcus faecalis</i>	82
Figura 16. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 6, identificada como <i>Acinetobacter baumannii</i> complex.....	83
Figura 17. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 7, identificada como <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	84
Figura 18. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 8, identificada como <i>Enterococcus faecalis</i>	85
Figura 19. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 9, identificada como <i>Klebsiella pneumoniae</i>	86
Figura 20. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 10, identificada como <i>Escherichia coli</i>	87
Figura 21. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 11, identificada como <i>Klebsiella pneumoniae</i>	88

Figura 22. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 12, identificada como <i>Acinetobacter colcoaceticus</i>	89
Figura 23. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 13, no identificada.	90
Figura 24. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 14, identificada como <i>Enterobacter cloacae</i>	91
Figura 25. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 15, identificada como <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	92
Figura 26. Patrón de corrimiento electroforético donde se observa las bandas correspondiente al gen <i>blaSHV-1</i> en la cepa secuenciada no. 9, identificada metagenómicamente como <i>Klebsiella pneumoniae</i>	93
Figura 27. Captura de pantalla del análisis bioinformático para el gen <i>BlaSHV</i> en la cepa no.9 identificada como <i>Klebsiella pneumoniae</i>	94
Figura 28. Patrón de corrimiento electroforético donde se observa las bandas correspondiente al gen <i>blaSHV</i> en la cepa secuenciada no. 11, identificada metagenómicamente como <i>Klebsiella pneumoniae</i>	94
Figura 29. Captura de pantalla del análisis bioinformático para el gen <i>BlaSHV</i> en la cepa no.11 identificada como <i>Klebsiella pneumoniae</i>	95
Figura 30. Patrón de corrimiento electroforético donde se observa las bandas correspondiente al gen <i>gyrA</i> en la cepa secuenciada no. 10, identificada como <i>Escherichia coli</i>	95
Figura 31. Captura de pantalla del análisis bioinformático para el gen <i>gyrA</i> en la cepa secuenciada no.10 identificada como <i>Escherichia coli</i>	96
Figura 32. Patrón de corrimiento electroforético donde se observa las bandas correspondiente al gen <i>ParC</i> en la cepa secuenciada no. 10, identificada como <i>Escherichia coli</i>	96
Figura 33. Captura de pantalla del análisis bioinformático para el gen <i>ParC</i> en la cepa no.10 identificada como <i>Escherichia coli</i>	97

CAPÍTULO 1. Introducción

La sepsis es un problema de salud pública al que se enfrentan los profesionales de la salud, particularmente en los pacientes que se encuentran en los extremos de la vida, en los cuales origina una alta tasa de mortalidad, principalmente en países en vías de desarrollo, en donde se reportan 5 millones de defunciones anuales. (1)

Actualmente, los métodos diagnósticos y de elección terapéutica en los pacientes sépticos representan el principal obstáculo para el éxito del tratamiento. La identificación del agente etiopatogénico, realizada con medios de cultivo convencionales requiere de 72 – 96h, más 24 horas adicionales para el análisis de sensibilidad a antibióticos, tiempo que un neonato no tiene, por lo que el tratamiento se establece de forma empírica cubriendo todo el espectro de microorganismos causales de sepsis, lo cual incluye un agente antiviral, antimicótico y antibacteriano, en especial para estos últimos se utilizan fármacos de amplio espectro que pudiesen ser efectivos contra microorganismos Gram (+) y Gram (-), fármacos que en múltiples ocasiones generan efectos adversos, que impiden el correcto desarrollo de los pacientes sobrevivientes. (2)

El diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno y efectivo son de suma importancia para evitar el progreso de la sepsis, las estadísticas sugieren que la tasa de mortalidad aumenta 8% por hora de demora en la administración de antibióticos eficientes contra el microorganismo causal de sepsis severa. (3)

El principal problema de instaurar un tratamiento antibiótico empírico es la resistencia a antibióticos ya sea intrínseca, inducida o clínica, sin identificación bacteriana y sin conocer la sensibilidad a los antibióticos del agente etiopatogénico, aunque su efectividad no supera el 60%, debido al desconocimiento del perfil fenotípico de resistencia del o los agentes causales.

Aunque en años recientes se han desarrollado diversas técnicas para el diagnóstico rápido de sepsis por medio de marcadores sugestivos, identificación del patógeno por técnicas moleculares, así como la identificación de algunos genes por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que confieren resistencia a un reducido número de antibióticos, en la actualidad no

se cuenta con una prueba de diagnóstico que nos permita conocer el perfil completo de resistencia de los microorganismos. (4)

Debido a la importancia de estos casos y al impacto que representan a nivel mundial, es necesario mejorar las estrategias de identificación de los mecanismos genéticos de resistencia a los antibióticos para administrar un tratamiento oportuno y eficiente.

El uso de técnicas moleculares, específicamente la PCR, es usada tanto para la identificación de microorganismos como de genes que confieren resistencia a antibióticos, ofertando un método de mayor sensibilidad, especificidad y eficiencia, que requiere un periodo de tiempo mínimo para la obtención de resultados, comparado con los métodos convencionales. (5)

El presente trabajo desarrollará una plataforma de PCR en tiempo real para la identificación de genes que confieren resistencia a antibióticos en bacterias causales de sepsis neonatal, así como el perfil de expresión de genes de resistencia del o los microorganismos más comunes en la clínica, para establecer las bases de un tratamiento temprano, específico y eficiente, que mejorará el pronóstico y aumentará las posibilidades de sobrevivencia de los pacientes diagnosticados con sepsis neonatal.

Tomando en cuenta las fortalezas y debilidades que presentan los métodos actuales para el diagnóstico de sepsis neonatal y dado que los distintos mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias tienen su origen a nivel de ADN, se propone el desarrollo de un arreglo de PCR en tiempo real para la identificación de los genes de resistencia presentes en las principales bacterias causales de sepsis neonatal, que pueda utilizarse como una herramienta diagnóstica rápida del resistoma a antibióticos y que permita instaurar un tratamiento antimicrobiano temprano, específico y eficiente.

Este trabajo es continuación de la tesis de **IF. Adalid Juárez Juárez**, (6) la cual estuvo bajo la dirección del **Dr. Juan Antonio González Barrios** y que lleva por título “Diseño de oligonucleótidos para la identificación de genes de resistencia a antibióticos en bacterias multirresistentes causales de sepsis neonatal”, presentada en noviembre del 2013 en la Unidad Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, donde se realizó un análisis bioinformático de los mecanismos de resistencia presentes en las 10 principales especies de microorganismos causales de sepsis neonatal, se

analizaron 6966 secuencias que codifican para mecanismos de resistencia y se diseñaron 350 oligonucleótidos para la identificación de los mismos, en este trabajo se evidenciará la eficiencia y especificidad de las 175 reacciones de PCR de punto final diseñadas para identificar a la totalidad los genes analizados, con la finalidad de obtener los controles positivos que la plataforma requerirá, secuenciando cada uno de los genes amplificados, con la finalidad de poder escalar la tecnología a una PCR de tiempo real para disminuir el tiempo requerido de identificación del resistoma a antibióticos contenido por una bacteria o por un microbioma completo.

SEPSIS NEONATAL

La sepsis sigue siendo un problema crítico con un alta tasa de morbilidad y mortalidad incluso en la era moderna del manejo de los cuidados intensivos (7), a pesar del uso de terapias más agresivas y antibióticos de amplio espectro, la mortalidad sigue siendo inaceptablemente alta (8).

La sepsis es el síndrome clínico definido por la presencia tanto de infección como del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) (9), sin embargo debido a que el SIRS que se presenta en los pacientes adultos y pediátricos no es aplicable a los neonatos, ya que estos responden de manera diferente al proceso infeccioso (10), la sepsis neonatal se define como el síndrome clínico caracterizado por signos y síntomas de infección sistémica que se confirma al aislarse en el hemocultivo, bacterias, hongos o virus y que se manifiesta dentro de los primeros 28 días de vida, aunque actualmente se tiende a incluir en la sepsis diagnosticadas después de esta edad, en recién nacidos de muy bajo peso ($\leq 1500\text{g}$) (11).

Epidemiología

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud se estima que las infecciones neonatales causan alrededor de 1.6 millones de muertes anualmente en los países en vías de desarrollo.

La sepsis continúa hoy día siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en niños (12). La sepsis neonatal tiene una incidencia de 2 a 4 por cada 1000 recién nacidos vivos en países desarrollados, pero esta tasa varía de acuerdo al estatus económico y la disponibilidad de los cuidados prenatales (13). En países en vías de desarrollo la tasa oscila de entre 6.5 a 38 casos por cada 1000 recién nacidos vivos (14), pero puede haber discrepancias en cuanto a las estadísticas y esto es debido al número de casos que no son reportados, particularmente en países subdesarrollados (15). Generalmente se asume que la mortalidad neonatal está sub-reportada en los países en vías de desarrollo en al menos un 20% (16).

Signos y síntomas

Como se mencionaba anteriormente, los neonatos responden de manera diferente al proceso infeccioso, las manifestaciones clínicas de la sepsis neonatal pueden ser muy variadas y con frecuencia inespecíficas, entre estos se incluyen: fiebre, hipotermia, distress respiratorio incluyendo cianosis y apnea, rechazo al alimento, letargia o irritabilidad, hipotonía, convulsiones, fontanela abultada, mala perfusión, problemas de coagulación, distensión abdominal, hepatomegalia, prueba de guayacol positiva, ictericia inexplicable y el más importante “luce enfermo” (17). La incidencia de bacteremia en infantes asintomáticos es baja, más no despreciable (18).

Clasificación de la sepsis neonatal

La sepsis se divide de acuerdo al tiempo de su aparición en inicio temprano o tardío, lo cual puede dar indicio del modo de transmisión.

La sepsis de inicio temprano, tiene su aparición dentro de la primera semana de vida y es debida a la transmisión vertical, por microorganismos localizados en el canal vaginal materno, produciéndose por contagio por vía ascendente al final de la gestación, o por contacto al momento del parto, la clínica suele iniciarse dentro de las primeras 72 horas de vida.

La sepsis de inicio tardío, tiene su aparición posterior a la primera semana del nacimiento y es atribuida a patógenos procedentes del entorno hospitalario, también denominada sepsis de transmisión nosocomial. La clínica se inicia después de la semana de vida y algunos autores lo manejan posterior a las 72 horas al nacimiento y siempre se constata algún factor de riesgo relacionado con procedimientos invasivos de diagnóstico y tratamiento

Esta denominación está sujeta a errores, ya que quedan excluidas sepsis verticales de comienzo tardío y sepsis nosocomiales de comienzo precoz.

El espectro de patógenos responsables es distinto de la sepsis temprana o de transmisión vertical a la sepsis de inicio tardío o nosocomial. (19), (11).

Etiología en la sepsis neonatal

Los agentes etiológicos asociados a la sepsis neonatal varían entre la sepsis de inicio temprano y la sepsis de inicio tardío, así como difieren entre los países desarrollados y en vías de desarrollo (11). En general los microorganismos Gram negativos son más frecuentes, entre ellos: *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* y *Salmonella*. Entre los microorganismos Gram positivos más comúnmente aislados se encuentran: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativo*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*.

En países desarrollados la sepsis de inicio temprano es mayormente más severa y su tasa de fatalidad es más alta, en estos países la sepsis de inicio tardío está comúnmente asociada a *Staphylococcus coagulasa negativo*, en donde se presenta una morbilidad baja. En países en vías de desarrollo la sepsis de inicio tardío tiene una mayor tasa de fatalidad, particularmente cuando están involucrados microorganismos Gram negativos,

En países en vías de desarrollo la sepsis de inicio temprano está asociada *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter*, *Enterococcus* y *Listeria*; y la sepsis de inicio tardío está asociada a

Pseudomonas, *Salmonella* y *Serratia*; *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus aureus* están asociadas a ambas (15).

Actualmente tiene importancia creciente los casos debidos a *Candida spp.*, ya que presenta una mortalidad del 10 – 15%.

Un dato que se presenta frecuentemente en las candidiasis invasivas es la intolerancia a los hidratos de carbono (hiperglucemia/glucosuria), aunque estos también pueden estar presentes en otras etiologías, se debe de sospechar de candidiasis sistémica ante un neonato séptico, con deterioro clínico progresivo a pesar del tratamiento antibiótico (11).

Diagnóstico de la sepsis neonatal

El diagnóstico temprano de la sepsis aún es un reto debido a las características clínicas inespecíficas de la sepsis neonatal, lo cual la hace difícil de distinguir de entre las patologías con etiología no infecciosa; y también debido a que el repertorio de pruebas de laboratorio es limitado y no siempre confiable. El hemocultivo continúa siendo la “prueba de oro” en el diagnóstico de la sepsis, sin embargo la sensibilidad es baja, debido a la administración profiláctica de antibióticos intraparto y también a la obtención de volúmenes muy pequeños de muestra (19). Se estima que en promedio se envía 1mL de sangre para el cultivo bacteriológico (20), pero en la práctica el volumen es mucho menor, principalmente de recién nacidos y prematuros, por lo tanto la sensibilidad del test oscila entre el 30 – 40%, este porcentaje aumenta al 70 – 80% cuando se envían 3mL de sangre para el cultivo (9), y la alternativa de tomar múltiples muestras pequeñas no añade sensibilidad a la prueba (21).

El hemocultivo es la prueba confirmatoria en casos de sepsis, pero como bien se sabe, la obtención de resultados no es pronta, ni sensible, particularmente por los volúmenes pequeños de muestra que se pueden obtener de neonatos. Por lo tanto, un hemocultivo positivo es diagnóstico de sepsis neonatal; sin embargo, un hemocultivo negativo, de ninguna manera descarta la enfermedad (22).

Dentro del diagnóstico de la sepsis neonatal también son de utilidad diferentes análisis bacteriológicos que coadyuvan al diagnóstico, como el análisis de líquido cefalorraquídeo, ya que del 20 – 25% de las sepsis se asocian con meningitis; el urocultivo obtenido por punción vesical suprapúbica, la presencia de leucocitos indica que se debe hacer instauración de antibioticoterapia precoz; cultivos de exudados periféricos, lo cual da un valor orientador sobre la etiología de la sepsis vertical, su positividad indica contaminación, pero la positividad de 3 o más exudados al mismo microorganismo, en presencia de clínica séptica y hemocultivo negativo es de gran valor para orientar la terapéutica; cultivo de frotis vagino-rectal materno, indicado cuando no se realizó durante el embarazo, si su positividad coincide con lo obtenido en hemocultivo, confirmaría transmisión vertical de la infección (11).

Dado que los análisis bacteriológicos tardan varios días en ofrecer resultados fiables, se dispone de pruebas que coadyuvan al diagnóstico como: test hematológicos; reactantes de fase aguda (proteína C reactiva y procalcitonina) (11); perfil de citocinas (Interleucina-6, Interleucina-8, Interleucina-10, Factor de necrosis tumoral α); marcadores celulares específicos para los cuales su producción aumenta posterior a la activación de leucocitos por bacterias (Neutrophil CD64 y Neutrophil/Monocyte CD11B) (19); aglutinación específica sobre látex para la detección de *Streptococcus agalactiae* (11). Sin embargo, ninguno de los marcadores incluyendo índices hematológicos, reactantes de fase aguda, citosinas, marcadores de superficie celulares han mostrado la sensibilidad y especificidad, ni el valor predictivo positivo o negativo, que sea suficientemente poderoso para guiar el manejo clínico en la sepsis neonatal (22), (17).

Ante un neonato que presenta signos y síntomas de sepsis, se requiere una pronta evaluación e iniciación de la terapia, para efectos del presente trabajo, nos enfocaremos en la terapia antibiótica.

Tratamiento antibiótico de la sepsis neonatal

Los temas en relación al diagnóstico son complicados, una vez que se decidió iniciar un tratamiento antibiótico, este debe de comenzarse inmediatamente después de que se hayan tomado las muestras para los cultivos pertinentes (22). Debido a que los agentes antimicrobianos son la piedra angular del tratamiento de la sepsis (23).

La terapia antimicrobiana se instaure empíricamente antes de la identificación del patógeno y esta se basa fundamentalmente en la epidemiología local de los microorganismos más frecuentes, patógenos basados en la historia perinatal, incluyendo cualquier síntoma que presente la madre y a los cultivos y procedimientos a los que haya sido sometido el neonato. (22).

El número de agentes antimicrobianos que se pueden utilizar en neonatos es reducido y la dosis necesita ser ajustada de acuerdo al peso y la edad post gestacional del neonato.

Se debe de considerar también los efectos de los antimicrobianos en la flora de la unidad de cuidados intensivos neonatales ya que la resistencia presente en las unidades de cuidado intensivo se ha convertido en el mayor problema cuando se han administrado de manera indiscriminada los agentes antimicrobianos de amplio espectro (13).

Ante la sospecha de sepsis de transmisión vertical, la antibioticoterapia debe cubrir *S.agalactie*, enterobacterias (sobre todo *E. coly* y *Klebsiella*) y *L. monocytogenes*. Lo cual se consigue con la asociación de ampicilina con aminoglucósidos, que tienen acción sinérgica. En pacientes con diagnóstico o sospecha clínica de meningitis se utiliza la asociación de ampicilina con cefotaxime.

Para el caso de sospecha de infección nosocomial se deben de utilizar antibióticos de amplio espectro, cubriendo a los microorganismos gram positivos y negativos, para estos casos se debe de identificar la flora prevalente en la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) (10). Para estos casos la antibioticoterapia empírica debe de incluir ampicilina, cefalosporinas de tercera generación o meropenem, más un aminoglucósido o vancomicina.

Actualmente el tratamiento de la sepsis nosocomial es extremadamente variable (23).

El apropiado uso de los antibióticos es importante para salvar vidas y reducir las complicaciones. El uso indiscriminado de los mismos incrementa la aparición de microorganismos resistentes y otras complicaciones, entre ellas la diseminación de infecciones por *candida*. (19).

El principal problema que presentan los médicos a la hora de instaurar un tratamiento antibiótico empírico es la resistencia a antibióticos, la cual describiremos a continuación.

AGENTES ANTIMICROBIANOS, MECANISMO DE ACCIÓN Y RESISTENCIA

Agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos actúan selectivamente sobre funciones microbianas vitales, sin afectar a las células del hospedero o con mínimos efectos sobre éste.

Ampliamente, los agentes antimicrobianos se pueden describir como bacteriostáticos y bactericidas. Los bacteriostáticos inhiben el crecimiento o la multiplicación de la bacteria, dándole tiempo al sistema inmune del hospedero para eliminarlos. Los bactericidas, matan a la bacteria, con o sin un sistema inmune competente.

El mecanismo de acción de los agentes antimicrobianos puede ser categorizado basándose en su estructura o función, éstas incluyen generalmente:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular
- Inhibición de la función del ribosoma
- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos
- Inhibición del metabolismo de los folatos
- Inhibición de la función de la membrana celular

La estructura química y los detalles de los mecanismos de acción ya han sido descritos en numerosa literatura, en la tabla se muestra un resumen del mecanismo de acción de las principales clases de antibióticos.

GRUPO DE ANTIBIÓTICO	EFECTO SOBRE LA BACTERIA		MECANISMO DE ACCIÓN GENERAL
B-LACTÁMICOS	Bactericida		Inhibición de la pared celular
QUINOLONAS	Bactericida		Inhibición de la síntesis del DNA
LINCOSAMIDAS	Bactericida		Inhibición de la síntesis de proteínas
ESTREPTOGRAMINAS	Bactericida		Inhibición de la síntesis de proteínas
AMINOGLUCÓSIDOS	Bactericida		Inhibición de la síntesis de proteínas
GLICOPÉPTIDOS (VANCOMICINA)	Bactericidas		Inhibición de la síntesis de pared celular.
MACRÓLIDOS	Bacteriostático		Inhibición de la síntesis de proteínas
TETRACICLINAS	Bacteriostático		Inhibición de la síntesis de proteínas
CLORANFENICOL	Bacteriostático		Inhibición de la síntesis de proteínas
SULFONAMIDAS	Bacteriostático	Sinergia	Inhibición de la síntesis de ácido fólico
TRIMETROPIM	Bacteriostático	Bactericida	Inhibición de la síntesis de ácido fólico

Tabla 1. Mecanismo de acción de los diferentes grupos antibióticos.

Mecanismos de resistencia de los agentes antimicrobianos

La resistencia bacteriana se define por la condición de un microorganismo a permanecer intacto de la actividad bactericida o bacteriostática de un antibiótico, es de naturaleza evolutiva y se caracteriza por expresar mecanismos biológicos que le permiten adecuarse a diferentes presiones ambientales.

La presión selectiva es uno de los factores que contribuyen a la aparición de los diversos mecanismos de resistencia, generados por mutaciones cromosomales o por intercambio de material genético a través de mecanismos de traducción, conjugación, transformación y trasposición.

La resistencia puede ser descrita de dos maneras:

- Intrínseca o natural. En los cuales los microorganismos de manera natural no poseen los sitios blancos de acción de los antibióticos o poseen baja permeabilidad al fármaco, con lo cual no se ve afectada por el tratamiento.

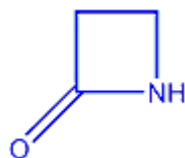
- b) Resistencia adquirida. En el cual un microorganismo naturalmente susceptible a la acción de un fármaco adquiere mecanismos para no verse afectada por el mismo.

Los mecanismos de resistencia adquirida pueden deberse a diversas razones:

- La presencia de una enzima que inactiva al agente antimicrobiano.
- La presencia de una enzima alternativa a la enzima que es inhibida por el agente antimicrobiano.
- Una mutación en el sitio blanco del antibiótico, el cual puede reducir la unión con el mismo.
- Modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales del sitio blanco del antibiótico, el cual reduce la unión con el mismo.
- Reducción de la entrada de antibiótico a la célula bacteriana.
- Eflujo activo de agente antimicrobiano.
- Sobreproducción del sitio blanco del agente antimicrobiano (24).

B-lactámicos mecanismo de acción y resistencia

El grupo de antibióticos B-lactámicos se caracteriza por poseer un anillo B-lactámico, anillo de cuatro miembros el cual es importante para la actividad de estos antibióticos.



Anillo β -lactámico

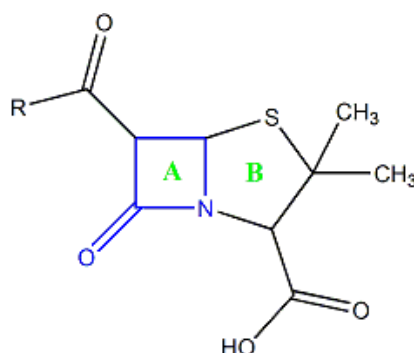
Dentro de este grupo se incluyen: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenems y los inhibidores de las β -lactamasas (24).

El mecanismo de acción de estos agentes es, al inhibir la síntesis de la pared bacteriana, debido a su unión covalente con las proteínas de unión a penicilinas (PBPs), las cuales catalizan los últimos pasos en la formación de la pared celular en bacterias tanto gram negativas como gram positivas (25).

Penicilinas

La penicilina fue el primer antibiótico en el amplio sentido de la palabra, esto es, que su origen procede de células vivas. Se descubrió en 1928, pero no fue utilizado hasta los 40's, tiene un estrecho espectro antibacterial actuando sobre microorganismos gram positivos (24).

La estructura básica de las penicilinas consiste en un anillo de tiazolidina (A) unido a otro anillo β -lactámico (B), el cual está unido a una cadena lateral (R).



Estructura de las penicilinas

Las penicilinas son ácidos 6-aminopenicilánicos sustituidos

Dentro de estas tenemos:

- Penicilinas

Penicilina G y V. estrecho espectro antibacterial, actúan sobre cocos gram positivos susceptibles, pero son hidrolizadas fácilmente por penicilinasas.

- Penicilinas estables a penicilinasas

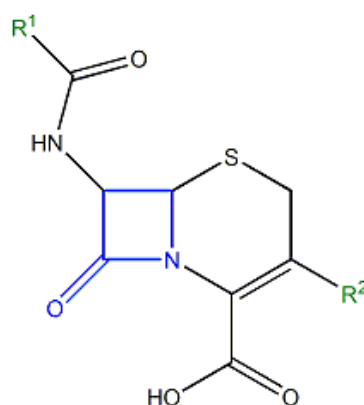
Se trata de penicilinas resistentes a la hidrólisis por parte de penicilinasas de estafilococos, a excepción de los llamados microorganismos resistentes a meticilina.

- Isoxazolilpenicilinas: oxacilina, cloxacilina y dicloxacilina; las cuales son inhibidores potentes del crecimiento de muchos estafilococos productores de penicilinasas.

- Nafcilina: penicilina semisintética muy resistente a la penicilinasa, eficaz contra infecciones causadas por *S. aureus* productoras de dicha enzima.
- Aminopenicilinas: entre ellas encontramos a la ampicilina y la amoxicilina, los cuales poseen una actividad similar y espectro más amplio a los fármacos antes mencionados, actuando sobre bacterias gram positivas y gram negativas. Estos fármacos son sensibles a la acción de B-lactamasas.
- Penicilinas contra pseudomonas: carboxipenicilinas (carbenicilina y ticarcilina) y ureidopenicilinas (mezlocilina y piperacilina), estas presentan acción contra algunas cepas de *P. aeruginosa* y de *Proteus* indol positivas (26).

Cefalosporinas

Son un grupo de amplio espectro, inicialmente aisladas de *Cephalosporium*, actualmente se disponen de compuestos semisintéticos. Difieren de las penicilinas al tener un heterociclo de seis miembros, un anillo que contiene azufre unido a un anillo betalactámico de cuatro miembros, son más estables a la acción de B-lactamasas y poseen un espectro de actividad más amplio.



Núcleo cefem

Las cefalosporinas se agrupan en generaciones por sus propiedades antimicrobianas.

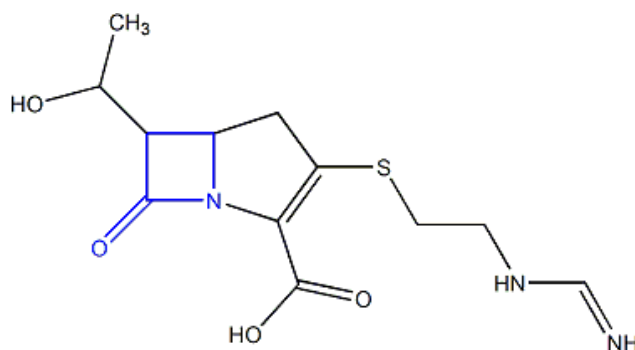
1ra generación. En esta se encuentran fármacos como cefalotina, cefazolina, cefalexina, etc., con excelente actividad contra gram positivos y poca actividad contra gram negativos.

2da generación. Como ejemplos tenemos: cefamandol, cefaclor, cefuroxima, cefotetán, etc., fármacos con una actividad un poco mayor contra los gram negativos, e incluyen algunos agentes con actividad contra anaerobios

3ra generación. En esta se encuentran: cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, etc., antimicrobianos con actividad contra gram positivos y una actividad mucho mayor contra enterobacterias, y un subgrupo con actividad contra *P. aeruginosa*.

4ta generación. Cefepima y cefpiroma, estos fármacos comprenden el espectro antimicrobiano de todos los fármacos de la tercera generación, con una mayor estabilidad contra la hidrólisis, por parte de las B-lactamasas cromosómicas inducibles (26) (27)

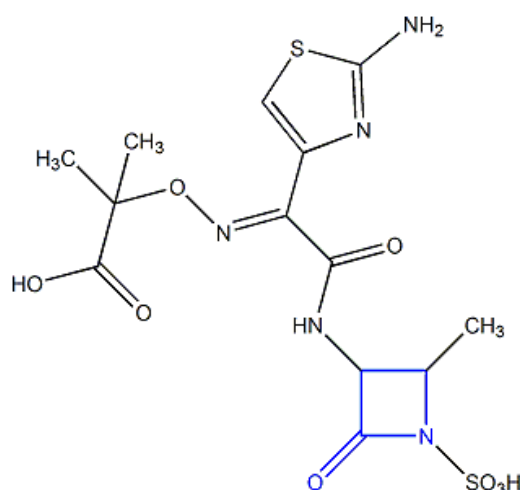
Carbapenems



Imipenem

Los carbapenémicos son B-lactámicos que contienen un anillo B-lactámico fusionado a un sistema anular pentamérico que difiere del de las penicilinas porque no está saturado y contiene un átomo de carbono en vez de uno de azufre. En este se incluyen imipenem, doripenem, ertapenem y meropenem, poseen el máximo espectro antimicrobiano de cualquier producto de esta categoría (26).

Monobactámicos



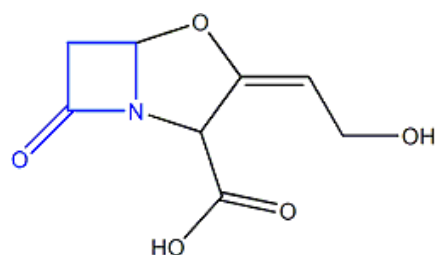
Aztreonam

En los monobactamas un anillo betalactámico de cuatro miembros está solo y no se encuentra unido a ningún anillo heterocíclico como en las penicilinas o en las cefalosporinas, son los B-lactámicos más simples con actividad antibacteriana

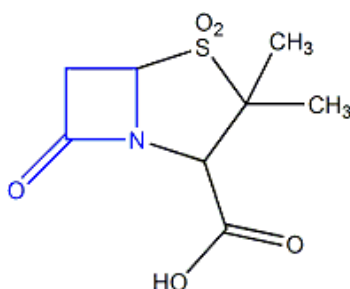
En este se encuentra el aztreonam el cual posee un espectro de acción contra gram negativos que se asemeja al de los aminoglucósidos, es resistente a penicilinasas pero no a B-lactamasas de espectro extendido (BLEE). (26)

Inhibidores de las B-lactamasas

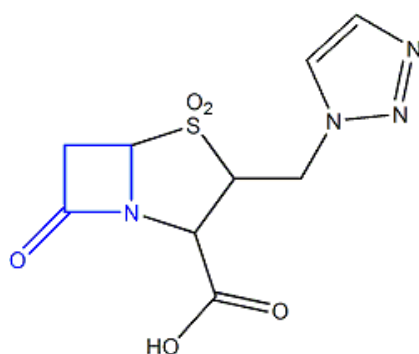
Se utilizan para ampliar el espectro de las penicilinas contra los microorganismos productores de B-lactamasa. Los inhibidores de las B-lactamasas son los más activos contra las B-lactamasas codificadas por plásmidos, pero también son inactivas contra las B-lactamasas cromosómicas tipo 1, inducidas en bacilos gram negativos (como *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Citrobacter*). Entre estos fármacos encontramos al clavulanato, sulbactam y tazobactam, su mecanismo de acción es por unión irreversible a las B-lactamasas producidas por diversos microorganismos (26).



Clavulanato



Sulbactam



Tazobactam

Resistencia a B-lactámicos

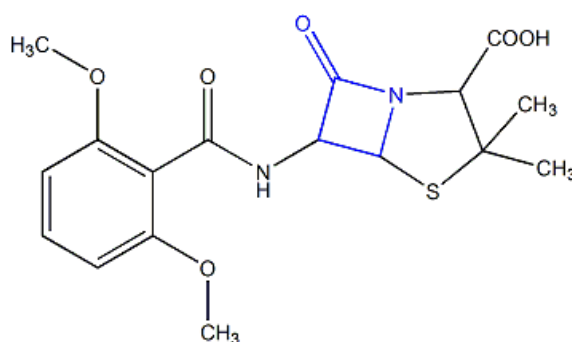
Los mecanismos de resistencia comprenden no sólo la generación de B-lactamasas, que en algunos casos destruyen todos los antibióticos B-lactámicos, sino también alteraciones o la adquisición de nuevas proteínas de unión a penicilina (PBP; *penicillin-binding proteins*) y disminución de la penetración del antibiótico, de la expulsión activa del mismo mediante bombas de eflujo (26) (28).

En bacterias gram positivas las proteínas de unión a penicilina de baja afinidad a penicilina representan el mecanismo de resistencia a B-lactámicos más importante. En el caso de bacterias gram negativas, la aparición de B-

lactamasas con una creciente eficiencia catalítica para la degradación de B-lactámicos representa el mayor mecanismo de resistencia. Sin embargo, la producción de B-lactamasas es el mecanismo de resistencia a B-lactámicos más efectivo (24).

Las B-lactamasas son enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar el anillo B-lactámico de estos fármacos y por lo tanto destruir completamente su efecto antibacteriano. El producto de esta reacción es el ácido peniciloico, el cual carece de actividad antibacteriana. Hoy día se conocen más de 200 diferentes betalactamasas y difieren una de la otra en que tienen diferentes perfiles de sustratos, incluyendo ácido clavulánico.

Meticilina mecanismo de acción y resistencia



Meticilina

La metcilina pertenece al grupo de los B-lactámicos, dentro de las penicilinas estables a penicilinasas, tiene la característica de presentar dos grupos metoxi voluminosos que protegen al anillo B-lactámico (26)

La metcilina se convirtió en un sustrato pobre para la penicilina estafilocócica, la cual se descubrió que degrada a la metcilina 30 más lento de lo que degrada a la penicilina G. Esta posee un bajo efecto sobre bacterias gram negativas, es ácido lábil por lo cual requiere de administración parenteral, por lo tanto su uso clínico hoy en día es pobre, pero su nombre se sigue utilizando para referirse a una forma temida de resistencia clínica, el SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a metcilina). El cual expresa clones de estafilococos resistentes a todos los betaláctamicos y tiende a propagarse epidémicamente. Esta resistencia no se debe a la presencia de B-lactamasas,

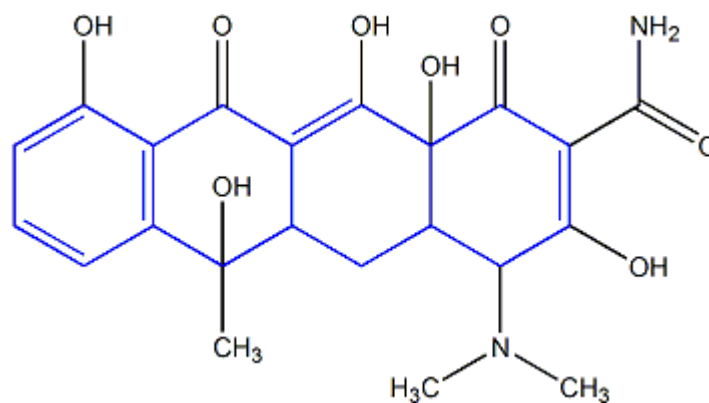
si no a la aceptación de un gen foráneo que expresa una proteína de unión a penicilina (PBP2) la cual tiene una muy baja afinidad a todos los B-lactámicos (24).

Resistencia a betalactámicos debida a cambios en las proteínas de unión a penicilinas

La disminución en la afinidad de los betalactámicos a las proteínas de unión a penicilinas es muy importante en la resistencia a betalactámicos en las bacterias. La resistencia a meticilina en SARM está mediado por el gen *mecA*, el cual se encuentra en el cromosoma del *Staphylococcus*. El gen *mecA* expresa una proteína de unión a penicilina PBP2 o PBP2a el cual exhibe una muy baja afinidad a las penicilinas. El gen *mecA* puede haberse desplazado horizontalmente entre diversas cepas de *Staphylococcus aureus* e incluso a otras especies bacterianas.

La disminución de la afinidad por parte de las PBPs es la causa de la resistencia también en pneumococo y se cree que este mecanismo apareció desde la introducción de la penicilina en los años 40s, éste es un ejemplo extremo de la habilidad de una enzima para evolucionar y poder discriminar entre su sustrato y su inhibidor estructuralmente análogo, y esto desarrollado bajo una presión de selección intensa por la distribución y uso ubicuo de los betalactámicos (27)

Tetraciclinas mecanismo de acción y resistencia



Tetraciclina

Las tetraciclinas son otro grupo de agentes antimicrobianos entre los más utilizados en la clínica, debido a su bajo costo, baja toxicidad y amplio espectro de acción. El nombre hace alusión a su estructura química, un anillo de cuatro miembros la cual contiene diversos grupos funcionales, los cuales varían dependiendo su origen microbiológico. La figura representa a la tetraciclina, originalmente aislada de *Streptomyces viridifaciens*. Estos agentes inhiben la síntesis de proteínas en impedir la unión del aminoacil-tRNA a su aceptor ribosomal o sitio A, son antibióticos de amplio espectro en contra de gram positivos y gram negativos, como: clamidia, micoplasma, riquetsias y algunos protozoarios. Como ejemplos de estos fármacos están: tetraciclina, doxiciclina, micociclina y oxitetraciclina.

La resistencia a éstos agentes aparece por medio de tres mecanismos llamados:

- Eflujo del antibiótico
- Protección del ribosoma
- Modificación del antibiótico

El eflujo del fármaco ocurre a través de una proteína de exporte que pertenece a la mayor facilitator superfamily (MFS), éstas proteínas están asociadas a membrana y están codificadas en los genes *tet*. El exporte de tetraciclinas del interior de la célula, reduce la concentración del fármaco y por lo tanto protege al ribosoma. Los genes para proteínas de eflujo en gram negativos están ampliamente distribuidos y se encuentran asociados a plásmidos, la mayoría de los cuales son conjugativos.

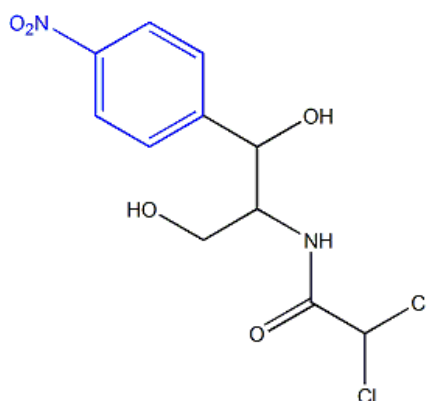
La protección del ribosoma se lleva a cabo con proteínas que protegen al ribosoma de la acción de las tetraciclinas (29). Las proteínas de protección a ribosomas son citoplasmáticas y se unen al ribosoma causando un cambio conformacional en éste la cual previene la unión de las tetraciclinas al ribosoma, sin alterar la síntesis de proteínas (24).

Muchas bacterias patógenas y comensales son ahora resistentes a las tetraciclinas al albergar genes de resistencia *tet*, de los cuales se conocen más de 30 tipos diferentes, se ha demostrado que su origen se deriva de

microorganismos productores de tetraciclinas, en donde confieren resistencia a los antibióticos que el mismo microorganismo produce (27), (24).

Cloranfenicol mecanismo de acción y resistencia

El cloranfenicol (fórmula 7-1) es un antibiótico en el amplio sentido, debido a9 que fue aislado del microorganismo *Streptomyces venezuelae* en 1947 y su introducción en la clínica fue en los años 50s, su estructura molecular es simple, actualmente se produce industrialmente mediante síntesis química.



Cloranfenicol

El antibiótico tiene la peculiaridad, entre los compuestos naturales, de que contiene una fracción nitrobenzeno y proviene del ácido dicloroacético (26).

Su mecanismo de acción se basa en inhibir la síntesis de proteínas en las bacterias, acción que es reversible, por lo tanto se le considera un agente bacteriostático. El cloranfenicol se une a la subunidad 50S ribosomal e inhibe a la peptidil transferasa en la síntesis de proteínas. Sin embargo esto no explica completamente la inhibición de la síntesis de proteínas, los detalles de la inhibición aún no se conocen.

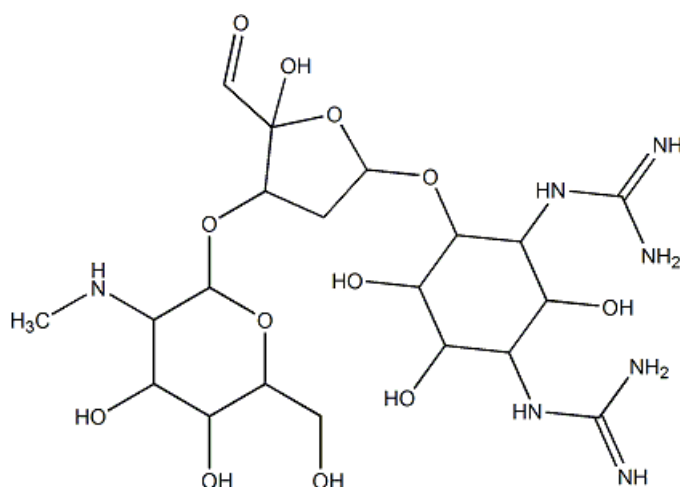
El cloranfenicol fue uno de los primeros antibióticos de amplio espectro, con efecto sobre gram positivos y gram negativo, también tiene la habilidad de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que significa que este fármaco puede ser utilizado eficientemente para el tratamiento de meningitis, su uso principal es dirigido a la administración tópica, ótica y oftálmica, debido a los temidos efectos adversos, como discrasias sanguíneas. En infecciones severas como

meningitis o fiebre tifoidea, donde el riesgo de la enfermedad y el riesgo de los efectos adversos se encuentran en balance, el cloranfenicol resulta muy valioso como agente antibacteriano (24).

Resistencia a Cloranfenicol

La resistencia a cloranfenicol ocurre en dos formas. Una donde la bacteria resiste concentraciones altas de cloranfenicol, esta resistencia se debe a una disminución de la permeabilidad y es debida a mutaciones espontáneas. El segundo tipo de resistencia es el más importante clínicamente y está dada por la inactivación o modificación del antibiótico debida a la acetilación de sus grupos hidroxilos por las enzimas cloranfenicol acetiltransferasas (30), éstas enzimas están codificadas en los genes *cat*, las que transfieren el grupo acetyl de la acetyl coenzima A a los dos grupos hidroxilos de la molécula de cloranfenicol, dejando como producto diacetyl cloranfenicol el cual carece de la propiedad de unión al ribosoma bacteriano. Éstos genes se encuentran tanto en bacterias gram positivas como negativas (24). Algunas veces la resistencia puede deberse a disminución de la permeabilidad de la membrana o a bombas de eflujo en microorganismos gram negativos (31).

Aminoglucósidos mecanismo de acción y resistencia



Estreptomicina

Los aminoglucósidos son productos naturales o derivados semisintéticos de compuestos producidos por diversos actinomicetos del suelo (26), estos incluyen un grupo de fármacos que se caracterizan por la presencia de un anillo aminociclitol unido a aminoazúcares en su estructura y tienen un amplio espectro de actividad.

La estreptomicina es el primer ejemplo de este grupo de antibióticos bactericidas, aislado de *Streptomyces griseus*, y fue el primer agente antibacteriano que pudo ser utilizado en el tratamiento de la tuberculosis.

Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de proteínas en las bacterias, se unen fuertemente al ribosoma bacteriano, una molécula por ribosoma. La interacción tiene lugar en el péptido S12 (S de small), uno de los 20 péptidos que junto con el RNA conforman la subunidad menor, no se unen directamente al péptido S12, pero éste de alguna manera dirige la unión del aminoglucósido al ribosoma. Lo que implica el hecho de que una mutación puntual en el péptido S12 deriva en resistencia. Podemos mencionar cuatro aminoglucósidos utilizados en la clínica: tobramicina, gentamicina, amikacina y netilmicina, los cuales poseen un mecanismo antibacteriano similar y para los cuales el mecanismo de resistencia es similar (27).

Resistencia a los aminoglucósidos

Las bacterias pueden ser resistentes a los aminoglucósidos debido a la falta de penetración intracelular del antibiótico, la inactivación del fármaco por las enzimas bacterianas o la escasa afinidad del fármaco por el ribosoma bacteriano (26).

La forma más simple de resistencia a la estreptomicina es debida a una mutación puntual en el péptido S12 de la subunidad menor del ribosoma bacteriano.

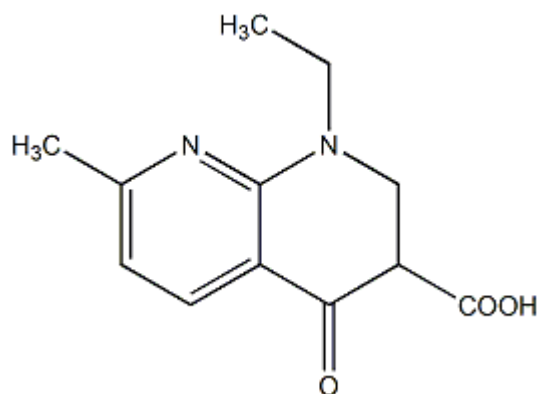
La alta resistencia a aminoglucósidos en el contexto clínico está mediada por transferencia horizontal de genes que codifican para enzimas inactivadoras del fármaco (27).

La mayoría de estos genes están asociados a bacterias gram negativas. Dependiendo del tipo de modificación que causan, éstas se clasifican en: aminoglucósido acetiltransferasas (AAC), aminoglucósido adeniltransferasa o aminoglucósido nucleotidiltransferasa (ANT), y aminoglucósido fosfotransferasas (APH) (32).

Los aminoglucósidos modificados pierden la capacidad de unión con el ribosoma y por lo tanto no inhiben la síntesis de proteínas.

Las enzimas forforiladoras, adelinadoras y acetiladoras conforman grupos con múltiples miembros no relacionados, con diferentes especificidades en los sustratos para diferentes aminoglucósidos. Una extensiva resistencia cruzada se deriva de estas condiciones. En este contexto se enmarca la presencia de aislados de *E. coli* que poseen enzimas acetiladoras de aminoglucósidos, en las cuales la especificidad de sustratos ha cambiado mutacionalmente para incluir sustratos no relacionados con los aminoglucósidos como el ciprofloxacino, el cual es una quinolona. Por lo tanto estos aislados exhiben resistencia a quinolonas y a aminoglucósidos (27).

Quinolonas mecanismo de acción y resistencia



Ácido nalidíxico

La primer quinolona con actividad antibacteriana fue el ácido nalidíxico, en cual fue descubierto en 1962 durante el proceso de síntesis y purificación de la cloroquina (un antimalárico). Después de éste muchos compuestos se han sintetizado, como uno de los más importantes están las fluoroquinolonas (ciprofloxacina, moxifloxacina, levofloxacina, etc.), las cuales contienen una

sustitución de flúor en la posición 6 de la molécula de quinolona, la cual mejora la actividad en contra de gram positivos y gram negativos, así como bacterias anaerobias. El mecanismo de acción de estos agentes antibacteriales se debe a la inhibición de las enzimas bacterianas DNA girasa (topoisomerasa II bacteriana) y topoisomerasa IV.

Estas enzimas bacterianas esenciales alteran la topología de doble hélice del DNA de doble cadena en la célula (27), (26).

Resistencia a quinolonas

La resistencia a quinolonas aparece en tres formas. La más común es debida a mutaciones espontáneas que modifican las estructuras de las enzimas blanco: la girasa y la topoisomerasa IV, este tipo de mutaciones pueden hacer que la afinidad de la enzima a las quinolonas decrezca. El segundo tipo de resistencia se debe a bombas de eflujo, en donde la bacteria ha adquirido un mecanismo en el cual mediante inversión de energía puede expulsar al agente antibacteriano de su interior. Y el tercer mecanismo de resistencia, el cual no se previa existiera está codificado en plásmidos.

Resistencia mutacional

Se pueden presentar mutaciones espontáneas en los genes que codifican tanto a la girasa como a la topoisomerasa IV en una frecuencia aproximada de 10^{-9} a 10^{-10} por generación, esto puede ser considerado como una muy baja probabilidad de que aparezcan, sin embargo, han aparecido. Las bacterias mutacionalmente resistentes muestran uno o varios cambios en los aminoácidos de entre la posición 67 a la 106. Ciertos patógenos como *Campylobacter jejuni*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* tienen treonina en vez de serina en la posición 83, lo que causa un decremento en la susceptibilidad a quinolonas por parte de estas bacterias. (27).

Las enzimas blanco son más comúnmente alteradas en los dominios cercanos al sitio activo de la enzima, en algunos casos reduce la afinidad de unión del fármaco. En organismos gram negativos, la DNA girasa parece ser

el principal blanco para las quinolonas. En bacterias gram positivas, la topoisomerasa IV o DNA girasa es el principal blanco, dependiendo de la fluoroquinolona en consideración.

En casi todas las instancias, algunas sustituciones aminoacídicas dentro de la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR-quinolone resistance determining region) donde cambia un grupo hidroxilo por un residuo voluminoso hidrofóbico.

Mutaciones en el gen *gyrA* induce cambios en el sitio de unión, la conformación, la carga, los cuales pueden ser importantes para la interacción quinolona-DNA girasa (33).

Resistencia debida a bombas de eflujo

Algunas proteínas en la membrana bacteriana son bombas de eflujo, las cuales tienen la capacidad de expulsar toxinas u otras sustancias en contra del gradiente de concentración, con un costo energético de por medio. Estas proteínas pueden conferir resistencia a quinolonas. La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* puede ser mencionada como un ejemplo que posee este mecanismo de resistencia, ya que produce en abundancia proteínas de eflujo, denominadas proteínas Mex, la sobreproducción se debe a mutaciones en los genes reguladores, lo que confiere resistencia a diversos agentes antibacteriales, entre ellos las quinolonas (34).

Resistencia a quinolonas transferible en plásmidos

Desde el punto de vista microbiológico la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos se consideraba imposible, debido a que se trataba de antibacterianos sintéticos, a los que nunca se había enfrentado el mundo bacteriológico, por lo que nunca se pensó que estas moléculas pudiesen ser sustratos de enzimas modificadoras o degradadoras, sin embargo, para finales de los años 90s se encontraron genes en plásmidos los cuales conferían resistencia a quinolonas.

El gen en cuestión es denominado *qnr* el cual expresa un péptido de 218 aminoácidos, el cual es capaz de proteger a la DNA girasa de la acción de las quinolonas al unirse a la enzima y por lo tanto desplazar al fármaco de su unión con la enzima, por lo tanto se produce una competencia entre la proteína y la quinolona, la proteína está constituida por repeticiones de 5 aminoácidos que posee una forma de espiral, con similitud a la estructura del DNA, con sentido positivo y un diámetro comparable con el del DNA. Estudios *in silico* con modelos virtuales de proteínas similares a *qnr* mostraron que la proteína se une precisamente en el centro activo de la girasa, lo que forma un complejo proteína-proteína, excluyendo tanto al DNA como a las quinolonas, cabe mencionar aquí que las quinolonas se unen al complejo girasa-DNA, no a la girasa sola. Otros estudios *in vitro* mostraron que la proteína *qnr* inhibe la función de la girasa, lo que muy probablemente da lugar a una disminución de la tasa de crecimiento bacteriano, pero supondría una ventaja en contraste de ser asesinada por la acción de la quinolona.

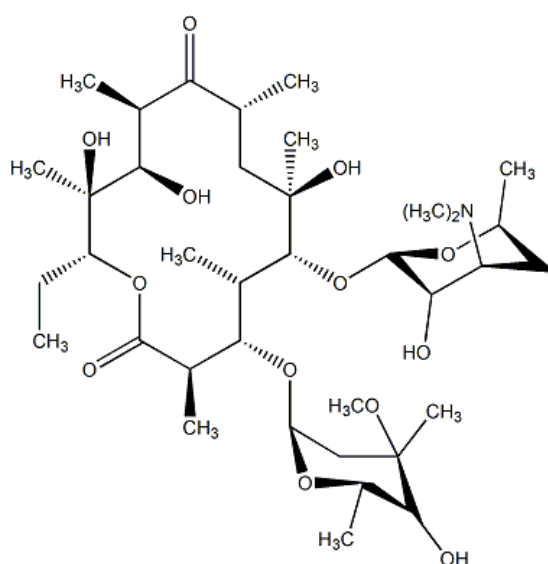
Durante el proceso de caracterización de la proteína expresada por el gen *qnr* se han encontrado más proteínas con una función y estructura similar, como es el caso de la proteína *qnrS*, la cual muestra un 59% de identidad en su secuencia aminoacídica comparada con *qnrA*, también es el caso de *qnrB* la cual fue aislada de *Klebsiella pneumoniae* y comparte un 40% de identidad con *qnrA*. (27).

Antibióticos del grupo MSL (Macrólidos, Lincosamidas y Streptograminas) mecanismo de acción y resistencia

Los macrólidos, lincosamidas y streptograminas son tres grupos de antibióticos que se han clasificado en un mismo grupo, a pesar de que son muy diferentes estructuralmente, todos tienen mecanismos de acción similares y se enfrentan con el mismo tipo de resistencia. Los MSL son inhibidores de la síntesis de proteínas bacterianas (26).

Macrólidos

La eritromicina es un buen ejemplo del grupo de los macrólidos, se descubrió en 1952 a partir de *Streptomyces erythreus*, su estructura química es compleja y está caracterizada por un gran anillo lactona al cual se unen dos moléculas de azúcar mediante enlaces glucosídicos, uno de estos azúcares es una amino azúcar. La eritromicina inhibe selectivamente el desarrollo bacteriano al unirse a sus ribosomas, en los cuales inhibe reversiblemente la síntesis de proteínas. La eritromicina inhibe la síntesis de proteínas al interferir con la unión del aminoacil-tRNA con el ribosoma, lo que impide la elongación del péptido (24).



Eritromicina

La eritromicina es activa a un amplio rango de bacterias gram positivas y en algunas bacterias gram negativas incluyendo *Helicobacter pylori*.

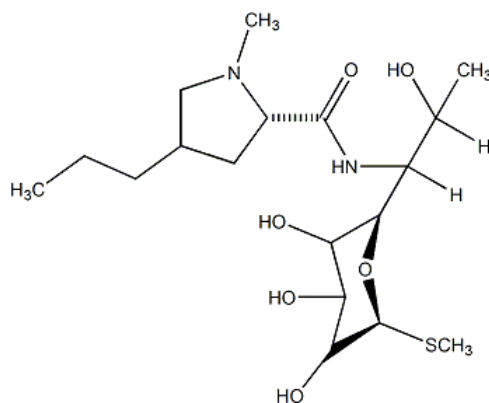
Son cinco los macrólidos que se utilizan con mayor frecuencia en el contexto clínico: eritromicina, roxitromicina, claritromicina, azitromicina y telitromicina, de los cuales cuatro son derivados semisintéticos de la eritromicina, con las mismas propiedades microbiológicas que la eritromicina, el mecanismo de acción es el mismo para los cinco, lo que significa que se presenta resistencia cruzada entre ellos (24).

Resistencia a macrólidos

La resistencia a macrólidos suele ser consecuencia de alguno de los cuatro mecanismos siguientes:

- Salida del fármaco por algún mecanismo de bombeo activo, codificado por *msrA*, *mefA* o *mefE*.
- Protección ribosómica por la producción inducible o constitutiva de las enzimas metilasas, mediada por la expresión de *ermA*, *ermB* y *ermC* que modifican el punto ribosómico de acción y disminuyen la unión con el fármaco.
- La hidrólisis de macrólidos por esterasas producidos por enterobacterias.
- Mutaciones cromosómicas que alteran la proteína ribosómica 50S (presente en *B. subtilis*, especies de *Campylobacter*, micobacterias y cocos gram positivos) (26).

Lincosamidas



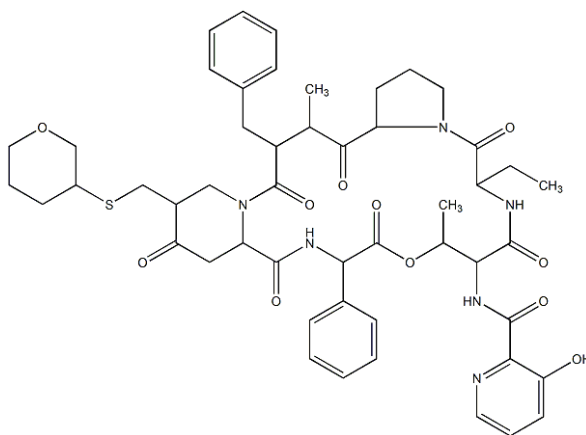
Lincomicina

La lincomicina es un producto de *Streptomyces lincolnensis*, posee una estructura química simple con un aminoazúcar en un enlace amida de un heterociclo de cinco miembros, el cual contiene nitrógeno en el anillo, por lo tanto su estructura difiere bastante de los macrólidos, sin embargo su mecanismo de acción antibacteriana es muy similar.

Resistencia a lincosamidas

La resistencia a lincomicina está mediada por la N-metilación de la adenina A-2058, al igual que los macrólidos, lo que indica una unión similar con el ribosoma y por lo tanto resistencia cruzada con los macrólidos (24).

Estreptograminas



Quinupristina

Las estreptograminas tienen su origen en bacterias del suelo como *Streptomyces graminofaciens*, son similares en la estructura química, el mecanismo de acción y espectro antibacteriano. Estas aparecen en pares de dos formas A y B las cuales tienen diferentes estructuras, estas dos formas actúan sinérgicamente para la acción antibacteriana al unirse a la partícula 50S del ribosoma lo que ocasiona inhibición irreversible de la síntesis proteica bacteriana.

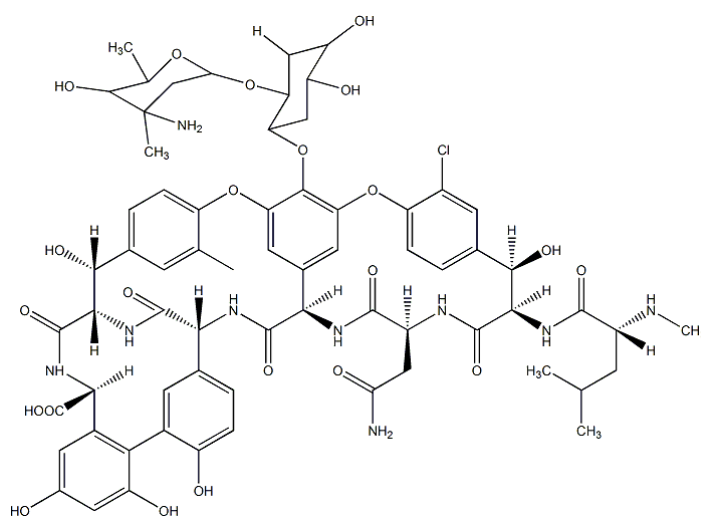
Un ejemplo claro de estreptograminas lo encontramos en la asociación quinupristina/dalfopristina, que es una asociación de quinupristina, una estreptogramina B, y dalfopristina, una estreptogramina A, en una proporción 30:70. La quinupristina/dalfopristina es activa contra cocos gram positivos, incluidas cepas de *S. pneumoniae*, y hemolíticas α y β de estreptococos, *E. faecium* (pero no *E. faecalis*) y cepas de estafilococos coagulasa positivo y negativo (26).

A pesar de que existen grandes diferencias estructurales entre las estreptograminas, las lincosamidas y los macrólidos, estos se unen de manera

similar al ribosoma bacteriano para inhibir la síntesis proteica. La similitud antibacteriana también se puede demostrar por el hecho de que la dimetilación de la adenina A-2058 en el RNA 23S media la resistencia en contra de éstos tres grupos de antibióticos.

El mecanismo común de resistencia en los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas, la metilación o dimetilación del RNA, significa que hay resistencia cruzada entre los miembros del grupo MLS (26) (24).

Glicopéptidos mecanismo de acción y resistencia



Vancomicina

Los glicopéptidos comprenden antibióticos peptídicos de interés clínico como vancomicina y teicoplanina. Son inhibidores de la síntesis de la pared celular, debido a la unión con D-alanina-D-alanina de los precursores del peptidoglicano, por lo tanto impide el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicano, así que son altamente efectivos en contra de microorganismos gram positivos, sin embargo no todos los microorganismos gram positivos son susceptibles a los glicopéptidos (26).

Resistencia a glicopéptidos

Un alto nivel de resistencia a vancomicina está codificado en el cluster genético *vanA*, con el cual se produce una nueva ligasa D-ala-D-ala que

reconstruye las cadenas del peptidoglicano y este nuevo tipo posee una mucho menor afinidad por los glicopéptidos (35), también hay otras proteínas en este cluster genético que son necesarias para la resistencia, incluyendo VanH y VanX, existe también otros clusters como VanB el cual confiere moderados niveles de resistencia a vancomicina pero con susceptibilidad a teicoplanina.

Los glicopéptidos interfieren con la síntesis de la pared bacteriana, al igual que los betalactámicos, pero éstos dos grupos antibacterianos no están relacionados en términos de su estructura y procedencia.

La resistencia de los cocos gram positivos a los glicopéptidos (usualmente se presenta resistencia cruzada entre vancomicina, teicoplanina e incluso ovoparcina) se debe a una serie complicada de reacciones enzimáticas, derivando en una sustitución en el final del dipéptido de una D-ala a un residuo de D-lactato. Por lo tanto el glicopéptido no reconoce su blanco debido a que éste ha cambiado a D-ala-D-lactato.

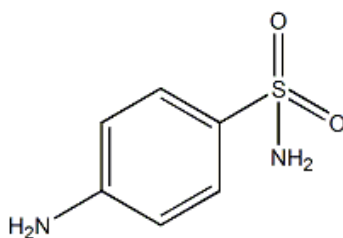
La afinidad por la D-ala-D-lactato es 1000 veces más baja que con el dipéptido D-ala-D-ala. La resistencia a vancomicina es representada por siete genes que se encuentran codificados en un transposón, lo cual le permite transferirse de bacteria en bacteria. Tres de estos genes codifican enzimas, una de estas es una deshidrogenasa la cual convierte piruvato a lactato, otra enzima sintetiza D-ala-D-lactato, el cual en vez del dipéptido normal D-ala-D-ala, se incorpora al final del péptido impidiendo la capacidad de unión con el glicopéptido, la tercera enzima es una peptidasa, la cual degrada al dipéptido normal D-ala-D-ala y evita que haya competencia entre este y el D-ala-D-lactato.

Sulfonamidas y Trimetropim, mecanismo de acción y resistencia

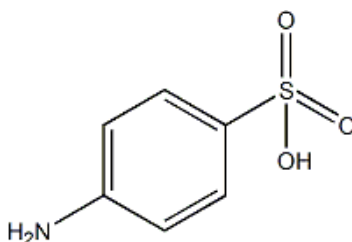
Sulfonamidas

Las sulfonamidas inhiben la formación del ácido fólico, una coenzima importante de todas las células vivas, las células de los mamíferos, no poseen esa secuencia de reacciones enzimáticas necesarias para la síntesis de ácido fólico.

Específicamente, las sulfonamidas interfieren con la formación bacteriana de ácido fólico, por su similitud estructural con el intermediario ácido *p*-aminobenzoico.



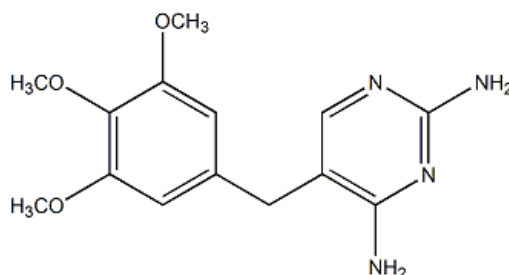
Sulfonamida



Ácido amino p-benzoico

Las sulfonamidas se mencionan generalmente en forma plural debido a que comprenden docenas de derivados (modificaciones en el grupo amino y en el residuo sulfon), todos los cuales son idénticos en su efecto antibacteriano, pero han sido sintetizados por razones farmacocinéticas (27).

Trimetopim



El trimetopim está relacionado con las sulfonamidas en el sentido en que interfiere con el metabolismo de los folatos. Con su estructura 2,4-diaminopirimidina, es un análogo del ácido fólico e inhibe competitivamente la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato por la enzima dihidrofolato reductasa.

La inhibición de la dihidrofolato reductasa da lugar a la pérdida de tetrahydrofolato, la cual es una importante coenzima, por ejemplo, en la síntesis bacteriana de DNA-thymina.

Debido a que las sulfonamidas y el trimetropim atacan pasos sucesivos en una misma vía enzimática, hay un efecto sinérgico que se ha explotado en la combinación de los fármacos co-trimoxazole, el cual contiene trimetropim en combinación con la sulfonamida sulfametoxazol.

Resistencia a sulfonamidas y trimetropim

La resistencia a las sulfonamidas es comúnmente mediada por una enzima alternativa de la dihidropteroato sintasa (DHPS). La resistencia a sulfonamidas en bacilos gram negativos se debe a la adquisición de dos genes *sul1* y *sul2*, que codifican para unas enzimas alternativas dihidropteroato sintasa que no son inhibidas por el fármaco (36).

El trimetropim es un análogo del ácido dihidrofólico, un componente esencial en la síntesis de aminoácidos y nucleótidos, el cual inhibe competitivamente a la enzima dihidrofolato reductasa. La resistencia a trimetropim es causada por un variado número de mecanismos

- Sobreproducción de la enzima DHFR por parte del hospedero
 - Mutaciones en el gen de la DHFR
 - Adquisición del gen *dhfr* que codifica a una enzima DHFR resistente a trimetropim, el cual es el mecanismo de resistencia predominante en los aislados clínicos.
-

Transferencia horizontal de genes de resistencia

Las bacterias patógenas pueden adquirir genes que medien la resistencia a antibióticos y estos se pueden propagar entre las bacterias a través de algunos mecanismos de transporte de genes.

La resistencia a diferentes agentes antibacterianos se puede propagar horizontalmente entre bacteria y bacteria de la misma especie, e incluso promiscuamente, en el sentido de que puede tomar lugar entre bacterias de diferentes especies. Esta propiedad de resistencia se encuentra en el genoma bacteriano, por lo tanto la transferencia de la resistencia debe de incluir transferencia de ADN entre las bacterias.

Resistencia transferible mediante conjugación

Este es el proceso más común de transferencia de información entre las bacterias.

La transferencia de resistencia antibiótica puede denominarse también resistencia contagiosa, en una bacteria susceptible a un antibiótico que es infectada con genes de resistencia. El mecanismo de conjugación tiene la habilidad de transferir distintos genes de resistencia al mismo tiempo, multiresistencia contagiosa. En este caso el material genético puede ser transferido entre las bacterias a través del contacto célula-célula, esto se observó en experimentos con *E. coli* en 1946. Estos descubrimientos dieron lugar al descubrimiento del factor F (F de fertilidad), el cual resultó ser un elemento genético extracromosomal con la habilidad de transferirse de una bacteria a otra a través del contacto celular, a este factor también se le encontró ser capaz de transferir genes cromosómicos. El factor F es una molécula de ADN circular extracromosomal al que hoy en día se le denomina plásmido.

Este fenómeno de transferencia denominado conjugación se lleva a cabo por medio de una estructura proteínica en forma de dedo, llamado pili, el cual está localizado en la superficie de la bacteria. El pilus puede establecer contacto con otra bacteria y a través de ésta transferir al plásmido.

Resistencia mutacional

La resistencia debida a mutaciones en contra de diferentes agentes antimicrobianos se da a lugar al haber un cambio en la estructura blanco del

antibiótico. Es importante recalcar que estas mutaciones son espontáneas y en ningún modo son dirigidas por el agente antibacteriano. Estas son causadas por errores en la replicación o por cambios en el ADN causados por agentes externos como la radioactividad. Las mutaciones espontáneas pueden dar lugar a una baja sensibilidad a un agente antimicrobiano y estas pueden ser rápidamente seleccionadas por dominancia en presencia de ese agente microbiano en particular, y esta propiedad puede ser transferida a sus parientes de manera vertical dándole ventajas evolutivas.

Plásmidos de resistencia a agentes antibacterianos

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosomales en forma de moléculas de DNA circular, las cuales se replican independientemente del cromosoma, pero en congruencia con su replicación. Varían dramáticamente en tamaño, desde unos cuantos cientos de pares de bases hasta medio millón de pares de bases o más. La transferencia o diseminación de los genes de resistencia por los plásmidos depende de la habilidad de conjugación de éstos plásmidos, esto es la habilidad de transferir una copia de sí mismo desde una bacteria hospedera a una bacteria receptora. La conjugación depende del contacto entre células bacterianas a través de un pili, halando el donador y el receptor juntos para llevar a cabo el contacto célula-célula. Los plásmidos pequeños se pueden también transferir de célula a célula junto con los plásmidos conjugativos más grandes. A este fenómeno se le conoce como movilización, lo que significa que los plásmidos pequeños son transferidos a través del mismo canal que se utilizó para transferir a los plásmidos más grandes.

Transposones

Por la localización de los plásmidos móviles, los genes de resistencia tienen acceso total a vehículos para su propagación en las poblaciones bacterianas. La localización de los genes de resistencia en los plásmidos es en cambio, dependiente del ser acarreados por transposones que los puedan llevar a los plásmidos mediante recombinación. Los transposones son

elementos genéticos extracromosomales, en contraste con los plásmidos éstos no poseen la habilidad de replicarse por sí mismos. Los transposones tienen la habilidad de poderse mover entre plásmido y plásmido, entre un plásmido y el cromosoma o entre el cromosoma y un plásmido, y a partir de estos acarrear genes de resistencia a antibióticos. Estos comprenden otro nivel de esparcimiento de resistencia a antibióticos.

Estos fragmentos de ADN muestran movilidad espontánea dentro del genoma, denotan secuencias de inserción (ISs), la movilidad de estas secuencias de inserción parece estar conectada con secuencias nucleotídicas específicas a sus extremos. Los tamaños de estos extremos pueden ser hasta varias decenas de nucleótidos y sus secuencias son palindrómicas (inversamente repetidas). La secuencia es en un extremo idéntica a la otra del otro extremo pero en dirección opuesta. Los fragmentos IS móviles también contienen genes que expresan una endonucleasa específica, la cual en este contexto se denomina transposasa y está involucrada en el proceso de movilidad, éstas tienen un amplio rango de funciones y entre estos también pueden acarrear genes que expresan resistencia a antibióticos. Estos genes de resistencia se tornan movibles junto con el fragmento IS, y a esta entidad genética se le denomina Tn por “transposón”.

Integrones

Los integrones pueden acarrear también múltiples genes de resistencia, estos no tienen movilidad por sí mismos, son estacionarios y generalmente se encuentran incorporados dentro de transposones. El integrón, por lo tanto, puede dar movilidad a los genes de resistencia, los cuales albergan cassettes movibles, lo que los convierte en una plataforma de ingeniería genética natural.

CAPÍTULO 2. Justificación

Los métodos para realizar el diagnóstico y la elección del tratamiento de la sepsis neonatal, representan un obstáculo en el éxito terapéutico. La identificación del agente patógeno causal por los medios de cultivo convencionales demora alrededor de 72 a 96 horas, requiriendo 24 horas adicionales para el análisis de sensibilidad a antibióticos, siendo un proceso muy demorado en el momento en que la vida del neonato depende de acciones inmediatas y precisas.

Debido a la importancia de estos casos y al impacto que representan a nivel mundial, es necesario mejorar las estrategias de identificación de los mismos para dar un tratamiento oportuno y certero.

El uso de nuevas técnicas moleculares como en el caso particular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pueden ser usadas para la identificación de microorganismos así como de genes de resistencia a antibióticos, las ventajas que este método supone incluyen: sensibilidad, especificidad, eficiencia, fidelidad y un periodo de tiempo menor para la obtención de los resultados, comparado con los métodos convencionales.

El presente trabajo pretende desarrollar una plataforma de PCR para la identificación de genes de resistencia a antibióticos en bacterias causales de sepsis neonatal, con lo cual se pretende acortar en gran medida el tiempo necesario para la identificación del agente causal, así como la obtención del antibiograma. Lo cual representaría una gran mejoría para el diagnóstico y tratamiento oportuno de la sepsis neonatal, que se traduciría en una disminución de la tasa de mortalidad neonatal debido a estos casos.

CAPÍTULO 3. Hipótesis

El diseño de una plataforma de PCR en tiempo real permitirá identificar los genes de resistencia con mayor especificidad, sensibilidad y más rápidamente que los métodos convencionales de laboratorio.

CAPÍTULO 4. Objetivos

Objetivo general

Conformar una plataforma de diagnóstico molecular basada en la técnica de PCR en tiempo real que de forma específica identifique a cualquier miembro de las superfamilias de genes que confieren resistencia a antibióticos de los 10 principales microorganismos causales de sepsis neonatal.

Objetivos específicos

1. Obtener e identificar con pruebas bioquímicas automatizadas las 10 principales cepas bacterianas causales de sepsis neonatal en pacientes del Hospital Regional “1º de Octubre”, ISSSTE.
2. Analizar mediante antibiograma convencional el patrón de multirresistencia de los 10 principales agentes infecciosos causales de sepsis neonatal.
3. Analizar el patrón de genes no convencionales responsables de la resistencia ambiental a antibióticos presentes en los microorganismos causales de sepsis neonatal.
4. Determinar la especificidad del antibiograma molecular en las 10 principales especies de bacterias causales de sepsis neonatal.
5. Determinar la capacidad de la tecnología de antibiograma molecular para detectar genes de resistencia a antibióticos en bacterias de origen ambiental, contaminantes de vegetales y biofilms.
6. Verificar la especificidad del antibiograma molecular de los amplicones de genes que confieren resistencia a antibióticos mediante secuenciación.
7. Determinar el límite de detección del antibiograma molecular de los genes en cada una de las familias que confieren resistencia a antibióticos.

8. Establecer la plataforma de PCR en tiempo real con SYBER GREEN para la identificación del antibiograma molecular y del resistoma a antibióticos.
9. Determinar la capacidad de la plataforma de PCR en tiempo real para detectar genes de resistencias en microorganismos anaeróbicos "*Clostridium difficile*" y en levaduras "*Candida albicans*".
10. Realizar el ensayo piloto del antibiograma molecular en 20 muestras clínicas provenientes de pacientes diagnosticados con sepsis neonatal.

CAPÍTULO 5 Material y Métodos

Muestras biológicas

Las muestras se obtuvieron en el área de Bacteriología del Laboratorio Clínico del "Hospital Regional 1º de Octubre", ISSSTE, las cepas purificadas se obtuvieron de diversas fuentes, entre ellas; hemocultivo, cultivo de líquido cefaloraquídeo, cultivo de punta de sonda, cultivo de biopsia, urocultivo, cultivo faríngeo, cultivo de expectoración, coprocultivo, cultivo vaginal y uretral. Se seleccionaron únicamente cepas puras que expresaban fenotipo de resistencia.

Cultivo y aislamiento

Para favorecer el crecimiento cepas bacterianas clínicamente significativas aisladas de pacientes con sospecha de proceso infeccioso, se utilizaron diversos medios de cultivo de enriquecimiento y diferenciales, tales como; agar sangre, chocolate, Thayer-Martin, sal y manitol, MaConkey, Salmonella-Shigella, CHROM agares para *Candida* y para la identificación de *Staphylococcus aureus*. Se tomó una muestra del sitio de sospecha de infección o secreción, éste se inoculó en los diferentes medios de cultivo, posteriormente con un asa bacteriológica esterilizada en mechero bunsen al rojo vivo, el inóculo se esparció mediante estría cruzada, para facilitar la recuperación de las colonias aisladas. Todos estos medios se incubaron a 37º C por al menos 20 horas, para algunos de los cuales se requirieron condiciones

anaerobias, las cuales se obtuvieron en jarras de anaerobiosis herméticas utilizando una vela para generar las condiciones anaerobias mediante combustión.

Identificación bioquímica

Una vez aisladas las cepas, se realizó tinción Gram para la clasificación de las bacterias dentro de los grupos Gram negativos y positivos, posteriormente se procedió la identificación utilizando el sistema semiautomatizado **VITEK 2X**, el cual analiza el perfil bioquímico mediante reacciones colorimétricas en tarjetas que son inoculadas con una suspensión homogénea de colonias morfológicamente similares, las que fueron tomadas con un asa bacteriológica estéril a un tubo con 3mL de solución salina hasta llegar a una densidad equivalente a un patrón McFarland de 2.70 a 3.30 (correspondiente a 8.1×10^8 - 9.9×10^8 UFC/mL) el cual se midió en un nefelómetro DensiCHEK™. Las tarjetas poseen diversos pozos, cada uno con un sustrato prueba individual, en los cuales se analizan las actividades metabólicas y el desarrollo de los microorganismos en presencia de sustancias inhibitoras, mediante las que se puede llegar a la identificación de los microorganismos. El sistema utiliza 3 tipos de tarjetas reactivas, para la identificación de diferentes clases de microorganismos.

GN 21341 – Bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores.

Para la valoración de:

Alanina - Fenilalanina - Prolina - Arilamidasa (0.0384 mg), Adonitol 0.1875 mg, L - Pirrolidonil - Arilamidasa (0.018 mg), L - Arabitol (0.3 mg), D - celobiosa (0.3 mg), Beta - galactosidasa (0.036 mg), Producción de H₂S (0.0024 mg), Beta - N - Acetil - Glucosaminidasa (0.0408 mg), Glutamil Arilamidasa pNA (0.0324 mg), D - Glucosa (0.3 mg), Gamma - Glutamil - Transferasa (0.0228 mg), Fermentación de glucosa (0.45 mg), Beta - Glucosidasa (0.036 mg), D - Maltosa (0.3 mg), D - Manitol (0.1875 mg), D - Manosa (0.3 mg), Beta - Xilosidasa (0.0324 mg), Beta - Alanina arilamidasa pNA (0.0174 mg), L - Prolina - Arilamidasa (0.0234 mg), Lipasa (0.0192 mg), Palatinosa (0.3 mg),

Tirosina Arilamidasa 0.0276 mg), ureasa (0.15 mg), D - Sorbitol (0.1875 mg), Sacarosa (0.3 mg), D - Tagatosa (0.3 mg), D - Trealosa (0.3 mg), Citrato de sodio (0.054 mg), Malonato (0.15 mg), 5 - ceto - D - gluconato (0.3 mg), Alcalinización de L - Lactato (0.15 mg), Alfa - Glucosidasa (0.036 mg), Alcalinización de Succinato (0.15 mg), Beta - N - Acetil - Galactosaminidasa (0.0306 mg), Alfa - Galactosidasa (0.036 mg), Fosfatasa (0.0504 mg), Glicina Arilamidasa (0.012 mg), Ornitina descarboxilasa (0.3 mg), Lisina descarboxilasa (0.15 mg), Base descarboxilasa, Asimilación de L - Histidina (0.087 mg), Courmarato (0.126 mg), Beta - Glucuronidasa (0.0378 mg), Resistencia O/129 (0.0105 mg), Glu - Gly - Arg - Arilamidasa (0.0576 mg), Ellman (0.03 mg) y Asimilación de L - Lactato (0.186 mg).

GP 22226 – Cocos y bacilos no formadores de esporas Gram positivos.

Para la valoración de:

D - Amigdalina (0.1875 mg), Fosfatidilinositol Fosfolipasa C (0.015 mg), D - Xilosa, Arginina dehidrolasa 1 (0.111 mg), Beta - Galactosidasa (0.036 mg), Alfa - Glucosidasa (0.036 mg), Alanina - Fenilalanina - Prolina - Arilamidasa (0.0384 mg), Ciclodextrina (0.3 mg), L - Aspartato Arilamidasa (0.024 mg), Beta - Galactopiranosidasa (0.00204 mg), Alfa - Manosidasa (0.036 mg), Fosfatasa (0.0504 mg), Leucina Arilamidasa (0.0234 mg), L - Prolina - Arilamidasa (0.0234 mg), Beta - Glucuronidasa (0.0018 mg), Alfa - Galactosidasa (0.036 mg), L - Pirrolidonil - Arilamidasa (0.018 mg), Beta - Glucuronidasa (0.0378 mg), Alanina Arilamidasa (0.0216 mg), Tirosina Arilamidasa (0.0276 mg), D - Sorbitol (0.1875 mg), Ureasa (0.15 mg), Resistencia a Polimixina B (0.00093 mg), D - Galactosa (0.03 mg), D - Ribosa (0.3 mg), Alcalinización de L - Lactato (0.15 mg), Lactosa (0.96 mg), N - Acetil - D - Glucosamina (0.3 mg), D - maltosa (0.3 mg), Resistencia a Bacitracina (0.0006 mg), Resistencia a Novobiocina (0.000075 mg), Crecimiento en NaCl 6.5% (1.68 mg), D - Manitol (0.1875 mg), D - Manosa (0.3 mg), Metil - B - D - Glucopiranosido (0.3 mg), Pululan (0.3 mg), D - Rafinosa (0.3 mg), Resistencia O/129 (0.0084 mg), Salicina (0.3 mg), Sacarosa (0.3 mg), D - Trealosa (0.3 mg), Arginina dihidrolasa 2 (0.27 mg) y Resistencia a optoquina (0.000399 mg).

YST 414967 – Levaduras y organismos levaduriformes.

Para la valoración de:

L - Lisina - Arilamidasa (0.0228 mg), Asimilación de L - Malato (0.15 mg), Leucina Arilamidasa (0.0234 mg), Arginina (0.15 mg), Asimilación de Eritritol (0.3 mg), Asimilación de Glicerol (0.16 mg), Tirosina Arilamidasa (0.0276 mg), Beta - N- Acetil - Glucosaminidasa (0.0408 mg), Asimilación de Arbutin (0.3 mg), Asimilación de amygdalin (0.3 mg), Asimilación de D - Galactosa (0.3 mg), Asimilación de Gentobiosa (0.3 mg), Asimilación de D - Glucosa (0.3 mg), Asimilación de Lactosa (0.96 mg), Asimilación de Metil - A - D - Glucopiranosido (0.3 mg), Asimilación de D - Celobiosa (0.3 mg), Gamma - glutamil - transferasa (0.0228 mg), Asimilación de D - Maltosa (0.3 mg), Asimilación de D - Rafinosa (0.3 mg), PNP - N - Acetil - BD - galactosaminidasa 1 (0.0306 mg), Asimilación de D - Manosa (0.3 mg), Asimilación de D - Melibiosa (0.3 mg), Asimilación de D - Melocitosa (0.3 mg), Asimilación de D - Sorbitol (0.1875 mg), Asimilación de Sacarosa (0.3 mg), Ureasa (0.15 mg), Alfa - Glucosidasa (0.036 mg), Asimilación de D - Turanosa (0.3 mg), Asimilación de D - Trealosa (0.3 mg), Asimilación de Nitrato (0.03 mg), Asimilación de L - Arabinosa (0.3 mg), Asimilación de D - Galacturonato (0.15 mg), Hidrólisis de esculina (0.225 mg), Asimilación de L - Glutamato (0.15 mg), Asimilación de D - Xilosa (0.3 mg), Asimilación de DL - Lactato (0.15 mg), Asimilación de acetato (0.15 mg), Asimilación de citrato de sodio (0.15 mg), Asimilación de glucuronato (0.15 mg), Asimilación de L - Prolina (0.15 mg), Asimilación de 2 - Ceto - D - Gluconato (0.15 mg), Asimilación de N - Acetil - Glucosamina (0.15 mg), Asimilación de D - Gluconato (0.15 mg).

El sistema **VITEK 2X** de Biomerieux, llega a la identificación de los microorganismos a través de una metodología basada en las características de los datos y el conocimiento acerca del microorganismo y las reacciones que se analizan

Pruebas de sensibilidad a antibióticos

La detección fenotípica de sensibilidad a antibióticos *in vitro*, se realizó utilizando el sistema **VITEK 2X**, utilizando las tarjetas **AST-GP67** para

sensibilidad a los microorganismos gram positivos: *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, y *Streptococcus agalactiae*, para los cuales se evalúa la sensibilidad a los siguientes antibióticos: ampicilina (6 µg/mL), benzilpenicilina (0.125, 0.25, 1, 2, 8 y 64 µg/mL), cefoxitina (6 µg/mL), ciprofloxacina (1, 2 y 4 µg/mL), clindamicina (0.5, 1 y 2 µg/mL), eritromicina (0.25, 0.5 y 2 µg/mL), gentamicina (8, 16 y 64 µg/mL), gentamicina con alto nivel de sinergia (500 µg/mL), resistencia inducible a clindamicina (clindamicina 0.5 µg/mL y clindamicina/eritromicina 0.25/0.5 µg/mL), levofloxacino (0.25, 2, 8 µg/mL), linezolid (0.5, 1 y 2 µg/mL), moxifloxacino (0.25, 2 y 8 µg/mL), nitrofurantoína (16, 32 y 64 µg/mL), oxaciclina (0.5, 1 y 2 µg/mL), quinupristín/dalfopristín (0.25, 0.5 y 2 µg/mL), rifampicina (0.25, 0.5 y 2 µg/mL), estreptomicina de alto nivel de sinergia (1000 µg/mL), tetraciclina 0.5, 1 y 2 µg/mL, tigeciclina 0.25, 0.5, 1 µg/mL, trimetropim/sulfametoxazol (2/38, 8/152, 16/304 µg/mL) y vancomicina (1, 2, 4, 8 y 16 µg/mL); y la tarjeta **AST-GN70** para los bacilos gramnegativos aerobios clínicamente significativos, para los cuales se evalúa la sensibilidad a: amikacina (8, 16 y 64 µg/mL), ampicilina (4, 8 y 32 µg/mL), ampicilina/sulbactam (4/2, 16/8, 32/16 µg/mL), aztreonam (2, 8 y 32 µg/mL), cefazolina (4, 16 y 64 µg/mL), cefepime (2, 8, 16 y 32 µg/mL), ceftriaxona (1, 2, 8 y 32 µg/mL), ciprofloxacino (0.5, 2 y 4 µg/mL), ertapenem (0.5, 1 y 6 µg/mL), gentamicina (4, 16 y 32 µg/mL), meropenem (0.5, 2, 6 y 12 µg/mL), nitrofurantoína (16, 32 y 64 µg/mL), piperacilina/tazobactam (2/4, 8/4, 24/4, 32/4, 32/8, 48/8 µg/mL), tigeciclina (0.75, 2 y 4 µg/mL), tobramicina (8, 16 y 64 µg/mL), trimetropim/sulfametoxazol (1/19, 4/76 y 16/304 µg/mL), así como la presencia de β-lactamasas de espectro extendido al evaluar la resistencia a cefepime (1 µg/mL), cefotaxima (0.5 µg/mL), ceftazidima (0.5 µg/mL), cefepime/clavulanato (1/10 µg/mL), cefotaxima/clavulanato (0.5/4 µg/mL) y ceftazidima/clavulanato 0.5/4 µg/mL).

Para la prueba de sensibilidad a antibióticos, se utilizó la suspensión de bacterias a un patrón McFarland de 2.70 a 3.30 preparada para la prueba de identificación, el equipo **VITEK 2X** realiza automáticamente la dilución e inocular las tarjetas para la valoración de la sensibilidad a antibióticos.

Cultivo genérico

Las colonias con fenotipo de resistencia aisladas, se subcultivaron inoculando una colonia en un tubo falcon con 10mL de medio de cultivo líquido Luria Bertani al 25% y posteriormente se incubó en un agitador Series Innova a 37° C, 240rpm por al menos 20 horas.

Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó utilizando una modificación del método reportado por el Dr. Francisco Martínez Pérez en la revista Antonie van Leeuwenhoek en 2010, en el cual utilizó la resina Chelex 100 sodium de SIGMA y un microondas para la extracción del DNA bacteriano total. Para mejorar la eficiencia del método, se hicieron algunas modificaciones a la técnica para optimizar el rendimiento de extracción.

El protocolo de extracción que se utilizó, fue el siguiente:

Las bacterias cultivadas en medio de cultivo líquido Luria Bertani se centrifugaron en una Hettich Zentrifugen Rotina 380 a 5000rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante, el botón formado se resuspendió en 500µL de buffer TES (10mM Tris Base, pH 7.5 – 1mM EDTA, pH 8 – 0.5% SDS), se pasó el contenido a un tubo eppendorf el cual contenía 30 mg de resina chelex, se homogeneizó durante 2 segundos en un Vortex-Genie 2 y se incubó a ebullición durante 5 min, posteriormente se dejó enfriar hasta llegar a 60° C y se adicionaron 20µg de Rnasa A y se incubó durante 7 min, posteriormente se calentó durante 10 segundos en un microondas Panasonic Sensor 1250W concave reflection a potencia 6 y se adicionaron 150 µg de Proteinasa K, se mezcló durante 2 segundos en vórtex y se incubó durante 7 min a temperatura ambiente, se centrifugó 12,000 x g durante 5 min a 4° C, se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo, se le adicionarón 300 µL de acetato de sodio 3 M y 500 µL de etanol al 95%, posteriormente se centrifugó a 12,000g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante y se hicieron dos lavados con 500µL de etanol al 70% centrifugando a 12,000 x g

por 5 minutos, se dejó secar el botón de DNA al aire, una vez seco se resuspendió en 50µL de agua GBM.

Espectrofotometría digital

La cuantificación del DNA se realizó por espectrofotometría digital utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 1000 u 8000 (Thermo Scientific Inc.) obteniendo los valores de absorbancia a 230nm, 260nm y 280nm de longitud de onda, la concentración del DNA se calculó mediante la siguiente ecuación ($[DNA] = (Densidad\ óptica\ 260\ nm)(50)(Factor\ de\ dilución)$) reportándonos la concentración en ng/µL, La pureza del DNA se evaluó mediante la relación 260nm/280nm, solo el material que presento una $R_{260/280} > 1.8$ y < 2.05 se consideró para su análisis por PCR, las muestras que no presentaron estos valores de pureza fueron reprecipitadas y posteriormente se reevaluó su relación 260 nm/280 nm, las muestras fueron almacenadas a -80° C hasta su utilización.

Integridad del DNA

La integridad del DNA fue evaluada por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% preteñido con bromuro de etidio, se utilizó buffer TAE 1X (Tris – EDTA – ácido acético, pH 8) para generar la diferencia de potencial a 80 volts durante 40 minutos, en una cámara para electroforesis electromagnética HORIZON 58 (Whatman). El tamaño del DNA extraído se estimó por comparación directa con corrimiento electroforético de un marcador de peso molecular para DNA de 1 Kb (Invitrogen).

Fotodocumentación

Para la visualización del patrón de corrimiento electroforético de las diferentes familias de genes evaluadas por medio de PCR de punto final se utilizó Bromuro de Etidio (Base intercalar), La excitación del Bromuro de Etidio se realizó en un Transiluminador Kodak Gel Logic 2200 Imaging System,

utilizando luz ultravioleta a un rango de 200 - 400nm de longitud de onda, la imagen fue guardada en los formatos (*.bip y *.jpg) para su posterior análisis.

PCR punto final

El escrutinio de los genes de resistencia a antibióticos se hizo mediante Reacción en cadena de la polimerasa por punto final, utilizando oligonucleótidos tanto específicos como degenerados para su amplificación. Sólo se utilizaron cepas que fenotípicamente exhibían un perfil de resistencia.

Los protocolos de termociclado se realizaron en los equipos: Gene Amp PCR System 9700 Gold de Applied Biosystems, Gene Amp PCR System 9700 Platinum de Applied Biosystems, Veriti 96 Well Thermal Cycler de Applied Biosystems o Pro Flex PCR System de Applied Biosystems.

Las reacciones de PCR punto final fueron conformadas en un volumen final de 25µL, utilizando 2.5µL de PCR Buffer 10X, 0.75µL de MgCl₂ (50 mM) 0.5µL de dNTP mix (10 mM), 0.25 U de Taq Platinum DNA polimerasa (5 U/µL), 1µL de la mezcla de oligos Fw-Rw (10 µM), 2µL de DNA genómico (2 ng/µL) y se completó el volumen final con agua GBM, posteriormente la reacción fue sometida al protocolo de termociclado presentado en la Tabla 2.

Tabla 2. Protocolo de termociclado para PCR punto final.

Ciclos	Proceso	T° C	Tiempo
1	Desnaturalización	94	5 min
45	Desnaturalización	94	30 s
	Alineamiento	56	30 s
	Extensión	72	20 s
1	Extensión final	72	5 min
-	Mantenimiento	4	∞

Secuenciación masiva

La secuenciación de las cepas se hizo utilizando la tecnología de secuenciación masiva Next Generation Sequencing en el equipo MiSeq de Illumina, bajo las especificaciones del fabricante.

Fabricación de las librerías

Las librerías se formaron utilizando el kit Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (FC-131-1096) de Illumina para 24 librerías de genomas pequeños, amplicones y plásmidos.

Fragmentación y marcaje del DNA

En una placa nueva de 96 pozos se añadieron 10µL de Tagment DNA Buffer (1 pozo por cada muestra), se añadió 5µL de DNA problema a la concentración de 0.2ng/µL (1ng total) a cada pozo, posteriormente se adicionaron 5µL de Amplicon Tagment Mix, homogeneizando con la pipeta, se cubrió la placa con film y se centrifugó a 280 x g durante 1 min. Posteriormente se incubó en el termociclador a 55° C durante 5 minutos, después bajando la temperatura a 10° C, posteriormente se retiró el film y se neutralizó añadiendo 5µL de Neutralize Tagment Buffer a cada pozo, homogeneizando la mezcla con la pipeta, después volvió a cubrir con film y se centrifugó a 280 x g durante 1 min y se incubó a temperatura ambiente por 5 min.

Amplificación por PCR

Para el marcaje del DNA con los índices se hizo una reacción de PCR con un número de ciclos limitados, en donde se seleccionó un par de índices diferentes para cada muestra, se añadieron 15µL de Nextera PCR Mastermix y 5µL de cada uno de los índices homogeneizando con la pipeta, se cubrió la placa con film y se centrifugó 280 x g durante 1 minuto y se prosiguió con el siguiente protocolo de termociclado:

Tabla 3. Protocolo de termociclado para amplificación en la secuenciación masiva.

		tubos	
Ciclos	Proceso	Tº C	Tiempo
1	Desnaturalización	72	3 min
12	Desnaturalización	95	30 s
	Alineamiento	55	30 s
	Extensión	72	30 s
1	Extensión final	72	5 min
-	Mantenimiento	10	∞

Limpieza del producto de PCR

Se centrifugó la placa a 280 x g durante 1 minuto y se transfirió el producto a una nueva placa y se añadieron 30µL de Ampure XP Beads a cada pozo y se homogeneizó con la pipeta, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y transcurrido ese tiempo se colocó en una placa magnética durante 2 minutos hasta que el sobrenadante quedó claro, con la pipeta se descartó el sobrenadante estando aún en la placa magnética, después se retiró de la placa magnética y se lavaron las perlas con etanol al 80%, se colocó nuevamente sobre la placa magnética durante 30 segundos y se descartó el sobrenadante, se dejó secar al aire durante 15 minutos, nuevamente se retiró la placa de la placa magnética y se añadieron 52.5µL de Buffer de resuspensión a cada pozo, se incubó a temperatura ambiente por 2 min y se volvió a colocar en la placa magnética hasta que el sobrenadante se aclaró, posteriormente se transfirió el sobrenadante a una nueva placa

Normalización de la librería

Para asegurarse que la cantidad de librería de cada muestra era la misma antes de formar el pool, se transfirieron 20µL del sobrenadante a una nueva placa y se añadieron 45µL de la combinación LNA1 (Library Normalization Additives 1) y LNB1 (Library Normalization Beads 1) y se selló la placa con film y se colocó en una mezcladora a 1,800 rpm durante 30 minutos, posteriormente se colocó la placa en una placa magnética durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante, se retiró de la placa magnética y se añadieron 45µL de LNW1 (Library Normalization Wash 1) a cada pozo, se cubrió con film y se mezcló a 1,800rpm durante 5 minutos, se retiró de la placa magnética y se añadieron 30µL de NaOH 0.1N, se selló la placa con film y se mezcló a 1,800rpm durante 5min posteriormente se añadieron 30µL de LNS1 (Library Normalization Storage Buffer 1) y se volvió a colocar en la placa magnética, se retiró el sobrenadante a una nueva placa, la cual se selló con film y se centrifugó 1000 x g durante 1 minuto.

Formación del pool de librerías para la secuenciación con MiSeq

Se transfirieron 5µL de cada librería a un tubo para PCR, de la mezcla se tomaron 24 µL y se le añadieron 576µL de buffer de hibridación, se incubó a 96° C por 2 minutos, se mezcló y se colocó en un baño de hielo durante 5 minutos, posteriormente el pool de librerías se cargó en el cartucho MiSeq dentro del reservorio para muestras y se procedió a hacer la secuenciación, alineamiento y ensamble de NOVO utilizando el software SPAdes Genome Assembler de la plataforma de Illumina. Teniendo el ensamble de los genomas se realizaron diversos análisis bioinformáticos como metagenómica utilizando el software Kraken metagenomics también de la plataforma Illumina.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS

Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron 28 pares de oligonucleótidos para la identificación de genes que codifican β -lactamasas poco comunes y que confieren resistencia a fármacos B-lactámicos.

Tabla 4. Diseño de oligonucleótidos para la búsqueda de genes que codifican B-lactamasas poco comunes.

Gen	Flanq.		Oligonucleótidos	Long.	Tm	ΔTm	%GC	Amplicón (pb)
blaA	1	358 - 377 Fw	5' GCCAAGCATCTATGCAAGGG	3'	20	61.95	55%	149
		485 - 507 Rw	5' GGCTGACATGATTGACTTTAGGC	3'	23	62.31	47%	
	2	373 - 392 Fw	5' GCGATCTCATCCGCTATTTCG	3'	20	61.27	55%	99
		452 - 472 Rw	5' GTTGTGCTGCTGACTGRAGC	3'	21	62.27	52%	
	3	198 - 218 Fw	5' CGCACCAACAATAACGTGGTC	3'	21	62.87	52%	105
		282 - 303 Rw	5' CCGTAAACAGCCGTTCACTCTG	3'	22	62.56	50%	
	4	254 - 273 Fw	5' CGWTGTGCTCSACGTTCAAG	3'	20	62.14	55%	152 - 158
		392 - 408 Rw	5' GGTCATSCCGGTGTCSA	3'	17	62.22	64%	
blaB	1	308 - 330 Fw	5' CCGGAGGCTTGAATATTTTGGT	3'	23	61.15	43%	199
		485 - 506 Rw	5' ACCAYACMACCACCATTATCTGC	3'	22	60.67	45%	
	2	20 - 40 Fw	5' GGCACTTGTCTTGTCTCTTGG	3'	21	62.52	52%	144
		144 - 164 Rw	5' CGCATTAGCTGCGTATTTGGT	3'	21	62.16	47%	
	3	378 - 401 Fw	5' GGCAATATATCAACATGGCAGC	3'	24	61.61	41%	229
		584 - 606 Rw	5' GGCTGACCATCTTATATCCCA	3'	23	62.13	47%	
	4	114 - 136 Fw	5' GGCACTAACACATTATCGTTGG	3'	23	60.69	43%	135
		229 - 249 Rw	5' GCGTATGGCTCACAAGATGG	3'	21	62.17	52%	
	5	124 - 145 Fw	5' GCGATGGCAAGTACAAGTAAGG	3'	22	62.07	50%	122
		224 - 245 Rw	5' GGGCTGTAAGCAACTAAGTCAG	3'	22	61.44	50%	
	6	298 - 317 Fw	5' CCCATGCGGAAGAATTGAGC	3'	20	62.21	55%	181
		456 - 479 Rw	5' CCGTCCACCTAATTCAATGTTCTC	3'	24	61.98	45%	
	7	148 - 167 Fw	5' GGGACGTCGAAGAAGTACC	3'	20	62.97	60%	172
		302 - 320 Rw	5' CTCATCACGAAGCCGTGTG	3'	19	61.55	57%	
	8	108 - 127 Fw	5' GGGCACATCGTCTAAACCG	3'	20	61.91	55%	143
		232 - 251 Rw	5' GGGCATGTCATCACTAACC	3'	20	61.01	55%	
blaBEL	único	91 - 111 Fw	5' CGACAATCAAGCCAAGATCG	3'	21	63	52%	182
		252 - 273 Rw	5' CGGAATCGTAATGAAGCTTGCG	3'	22	62.97	50%	
blaGIM	único	544 - 565 Fw	5' GGGAAAGCTTAGGTTACGTAGG	3'	22	62.37	54%	100
		624 - 644 Rw	5' CGGAACGACCATTTGAATGGG	3'	21	62.37	52%	
blaGOB	1	293 - 315 Fw	5' GGCGCATTATGATCATACAGGTG	3'	23	62.23	47%	122
		391 - 415 Rw	5' CCCATTTCAATCGGATTTACCGC	3'	25	62.86	44%	
	2	69 - 92 Fw	5' CCTGARAAATATGCCYAAAGAAATGG	3'	24	60.97	41%	116
		163 - 186 Rw	5' GCCTTGTGTCGTCACAATAAGG	3'	24	60.01	45%	
blaLEN	único	37 - 59 Fw	5' CGCTTGAGCAGATTAAACAAAGC	3'	23	61.72	43%	145
		163 - 182 Rw	5' GCACAGCAGCACTTTAAAGG	3'	20	60.51	50%	
blaOKP	único	119 - 141 Fw	5' GGGCTATGTTGAAATGGATCTGG	3'	23	61.84	47%	187
		286 - 306 Rw	5' GGGAGTAGTCCACCAGATCCT	3'	21	62.69	57%	
blaSPM	único	156 - 175 Fw	5' GGGTAGCGCAAACGCTTATGG	3'	20	62.19	55%	158
		294 - 314 Rw	5' CGCAACTGCTTTGTCAGATCG	3'	21	62.91	54%	
blaBEL	único	91 - 111 Fw	5' CGACAATCAAGCCAAGATCG	3'	21	63	52%	182
		252 - 273 Rw	5' CGGAATCGTAATGAAGCTTGCG	3'	22	62.97	50%	
blaCARB	único	158 - 179 Fw	5' GGGATTACAATGGCAATCAGCG	3'	22	62.73	50%	147
		283 - 305 Rw	5' GGRGAATAGGTCACAAGATCTGC	3'	23	61.01	52%	
blaGES	único	466 - 488 Fw	5' GCGACCTCAGAGATACAACCTACG	3'	23	62.89	52%	125
		572 - 591 Rw	5' CCGTTTGTTCCGATCAGC	3'	20	62.4	55%	
blaOXY	único	434 - 452 Fw	5' CGGACCGGAAAAAGTSACC	3'	19	61.43	57%	219
		629 - 648 Rw	5' GGTGGRGTGCTTTTARCC	3'	20	62.51	55%	
		242 - 263 Fw	5' GGTRTTAAACAGAGCGAAAGC	3'	22	61.1	45%	
	1	386 - 407 Rw	5' CSGTATTGCTGCTATAYTGACAG	3'	22	61.42	50%	152
		71 - 90 Fw	5' CGGTTCAATTATGGGCCAGTG	3'	20	61.59	55%	
blaPER	2	177 - 195 Rw	5' GCCGCGATARAGGGTTTGC	3'	19	62.87	57%	126
		557 - 579 Fw	5' GCCTTGTTATGGAATGGATGGT	3'	23	61.72	43%	
		737 - 758 Rw	5' CCGAATCCTTGACAAATACCGC	3'	22	62.39	50%	
	2	626 - 648 Fw	5' GGCTTGTATGGAAGTGGATGG	3'	23	62.27	47%	114
		720 - 740 Rw	5' GGCTTGATACCCGAAGTACC	3'	21	60.97	52%	
blaVEB	único	355 - 377 Fw	5' CCCTAATGGAACAACCTTGACGA	3'	23	61.33	43%	177
		491 - 512 Rw	5' GTGCATTGTCTTCGTTTGCT	3'	22	61.3	40%	

Búsqueda de los controles positivos por PCR punto final

Se realizó la búsqueda de los genes que confieren resistencia a las 11 familias de antibióticos para los cuales se ha diseñado la plataforma de PCR, se analizaron 133 cepas de 20 especies bacterianas, 7 de las cuales pertenecen al grupo de los 10 principales agentes infecciosos responsables del 99% de los microorganismos causales de sepsis neonatal, mismos en los que se demostró previamente expresaban fenotipo de resistencia.

β -lactamasas

Para β -lactamasas, se analizaron 44 cepas pertenecientes a la especies *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* encontrándose 13 de los 14 genes en cuestión y con la siguiente proporción: *blaVIM* (4.55%), *blaSHV* (25%), *blaTEM* (11.36%), *blaIMP* (20.45%), *blaCTX* (40.91%), *blaCMV* (9.09%), *blaDHA* (13.64%), *blaP* (18.18%), *blaCFX* (2.27%), *blaBIL* (22.73%), *blaKPC* (31.82%), *blaOXA* (18.18%), *blaROB* (11.36%), *blaLAP* (0%), cabe destacar que cada una de las cepas analizadas poseía más de un gen de resistencia a fármacos β -lactámicos.

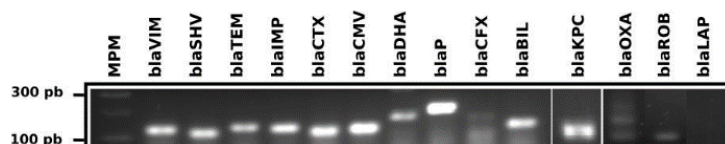


Figura 1. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a B-lactamasas.

Tabla 5. Cepas analizadas en la búsqueda de genes de resistencia a B-lactamasas.

Cepas analizadas	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
<i>Enterococcus durans</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	6
<i>Enterococcus faecium</i>	7
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1

Tabla 6. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a fármacos B-lactámicos.

		B-Lactamasas																				
Peso Molecular esperado		114	133	106	141	213	182	193	126	117	116	83	226	200	160	200	147	117	204	177	126	128
Gen		BlaOXA	BlaVIM	Bla SHV		BlaTEM	BlaIMP		BlaROB	BlaKPC	BlaCTX			BlaCMV		BlaDHA			BlaP	BlaCFX	BlaLAP	BlaBIL
Oligonucleótido No.				1	2		1	2			1	2	3	1	2	1	2	3				
Cepa	Acinetobacter baumannii	+			+	140			+					+								+
	Enterococcus durans					140						+										
	Enterococcus faecalis																					
	Enterococcus faecalis					120						+										
	Enterococcus faecalis					120							+									
	Enterococcus faecalis	+	+			140								+								+
	Enterococcus faecalis	+			+	140				+												
	Enterococcus faecalis	+			+	140	+			+												
	Enterococcus faecium									+												
	Enterococcus faecium				+																	
	Enterococcus faecium	+				+																
	Enterococcus faecium				+		+															+
	Enterococcus faecium				+	180	+			+		+					+		+			
	Enterococcus faecium					140	+												+			+
	Enterococcus faecium					150							+									
	Enterococcus gallinarum				+	120	+															
	Klebsiella oxytoca					+				+												
	Klebsiella pneumoniae			+	+	120								+								
	Klebsiella pneumoniae	+			+	140																+
	Pseudomonas aeruginosa					120																
	Pseudomonas aeruginosa			+		140				+			+									
	Pseudomonas aeruginosa					140	+						+									
	Pseudomonas aeruginosa																					
	Pseudomonas aeruginosa					140					+		+		+		+					
	Pseudomonas aeruginosa				+	140	+	+		+												+
	Staphylococcus aureus					+														+		
	Staphylococcus aureus					120				+										+		+
	Staphylococcus aureus					120				+												
	Staphylococcus aureus					120																
	Staphylococcus aureus																					+
	Staphylococcus aureus					140				+			+									
	Staphylococcus aureus					110				+			+									
	Staphylococcus epidermidis														+	+						
	Staphylococcus epidermidis					+							+							+		
	Staphylococcus epidermidis					+					+	+	+									
Staphylococcus epidermidis		+			150					+		+							+			
Staphylococcus epidermidis					150					+		+										
Staphylococcus epidermidis					150					+						+					+	
Staphylococcus epidermidis	+				140																	
Staphylococcus haemolyticus	+				120		+		+			+		+			+	+	+		+	
Staphylococcus haemolyticus					140					+		+							+			
Staphylococcus haemolyticus					150																	
Staphylococcus haemolyticus					150														+	+		
Staphylococcus saprohviticus					120		+					+						+	+			

Tabla 7. Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a β -lactámicos.

Genes	<i>BlaOXA</i>	<i>BlaVIM</i>	<i>BlaSHV</i>	<i>BlaTEM</i>	<i>BlaIMP</i>	<i>BlaROB</i>	<i>BlaKPC</i>	<i>BlaCTX</i>	<i>BlaCMV</i>	<i>BlaDHA</i>	<i>BlaP</i>	<i>BlaCFX</i>	<i>BlaLAP</i>	<i>BlaBIL</i>	TOTAL
No. Positivos	8	2	11	5	9	5	14	18	4	6	8	1	-	10	44

Estreptograminas

En la búsqueda de genes de resistencia a estreptograminas se analizaron 6 cepas de *Enterococcus faecalis* que exhibían fenotipo de resistencia a los mismos. Se encontraron los 3 genes en cuestión con una proporción del 33%. Cabe destacar que hubo cepas que presentaron más de una banda de peso molecular esperado para diferentes reacciones en la detección de genes de resistencia a estreptograminas.

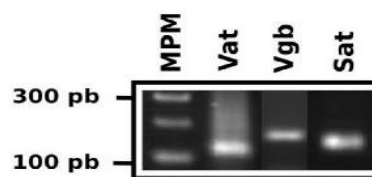


Figura 2. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a *Estreptogramin*

Tabla 8. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a fármacos Estreptograminas

Estreptograminas																		
Peso Molecular esperado		102	104	115	146	191	197	139	146	104	159	110	133	111	186	106	142	130
Gen		Vat				Vgb								Sat				
Oligonucleótido No.		1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5
Cepa	<i>Enterococcus faecalis</i>		+						+		+							
	<i>Enterococcus faecalis</i>		+						+		+							
	<i>Enterococcus faecalis</i>													+				
	<i>Enterococcus faecalis</i>																	
	<i>Enterococcus faecalis</i>																	
	<i>Enterococcus faecalis</i>													+				

Tabla 9. Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a Estreptograminas

Genes	Vat	Vgb	Sat
No. Positivos	2	2	2

Quinolonas

Para el caso de quinolonas, se analizaron 26 cepas pertenecientes a las especies *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* todas las cuales exhibían fenotipo de resistencia a los mismos fármacos, encontrándose los representantes de 11 genes que son responsables de ésta resistencia en la proporción que a continuación se enuncia: *QnrA* (7.69%), *QnrB* (3.85%), *QnrC* (7.69%), *QnrD* (15.38%), *QnrS1* (11.54%), *QnrS2* (11.54%), *Grl* (19.23%), *GyrA* (53.85%), *GyrB* (50%), *ParC* (50%) y *Gep* (30.77%). Las cepas analizadas presentaron más de una banda de peso molecular esperado para diferentes reacciones en la detección de genes de resistencia a quinolonas.

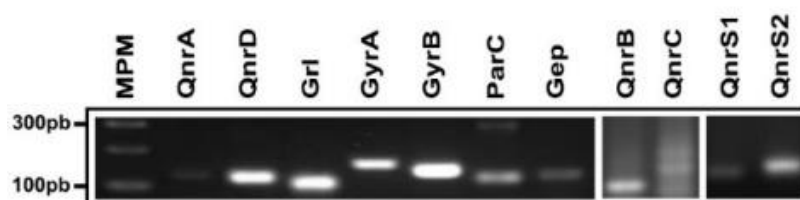


Figura 3. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Quinolonas.

Tabla 10. Cepas analizadas en la búsqueda de genes de resistencia a Quinolonas.

Cepas analizadas	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
<i>Enterococcus durans</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	5
<i>Enterococcus faecium</i>	2
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4
<i>Streptococcus agalactie</i>	1

Tabla 11. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a Quinolonas.

		Quinolonas																								
Peso Molecular esperado		214	83	120	121	110	120	158	102	105	151	107	174	202	227	132	149	112	153	144	127	152	165	106	116	
Gen		Qnr						Grl		GyrA			GyrB			ParC						Gep				
Oligonucleótido No.		A	B	C	D	S1	S2	A	B	1	2	3	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	1	2	
Cepa	Acinetobacter baumannii				+	+					+															
	Enterococcus durans						+																			
	Enterococcus faecalis			+													+									
	Enterococcus faecalis				+												+								+	
	Enterococcus faecalis									+	+														+	
	Enterococcus faecalis									+	+														+	
	Enterococcus faecalis																								+	
	Enterococcus faecium											+						+	+	+				+	+	
	Enterococcus faecium												+						+						+	+
	Enterococcus gallinarum												+													+
	Klebsiella pneumoniae	+										+		+				+		+						
	Klebsiella pneumoniae								+			+											+			
	Pseudomonas aeruginosa																	+								
	Pseudomonas aeruginosa																	+								+
	Pseudomonas aeruginosa					+	+				+	+						+	+				+			
	Pseudomonas aeruginosa																	+							+	
	Staphylococcus aureus		+							+		+						+	+	+			+	+		
	Staphylococcus aureus								+	+														+		
	Staphylococcus aureus								+	+	+													+		
	Staphylococcus epidermidis									+		+	+					+	+	+						
	Staphylococcus epidermidis							+																		
	Staphylococcus haemolyticus	+				+						+				+			+	+			+			
	Staphylococcus haemolyticus																		+							
	Staphylococcus haemolyticus							+										+					+	+		
	Staphylococcus haemolyticus				+										+								+	+		
Strentococcus agalactie						+						+			+							+	+			

Tabla 12. Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a Quinolonas.

Genes	QnrA	QnrB	QnrC	QnrD	QnrS1	QnrS2	Grl	GyrA	GyrB	ParC	Gep
No. Positivos	2	1	2	4	3	3	5	14	13	13	8

Vancomicinas

En el caso de vancomicina se analizaron 13 cepas de la especie *Enterococcus* que presentaban resistencia a vancomicina. Se encontraron los 5 genes buscados en la siguiente proporción: *VanA* (61.5%), *VanB* (7.6%), *VanC* (7.6%), *VanD* (7.6%) y *VanE* (15.4%).

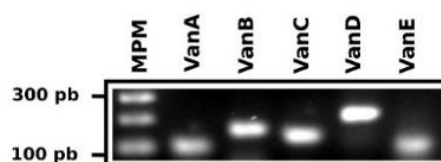


Figura 4. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Vancomicinas.

Tabla 13. Cepas analizadas en la búsqueda de genes de resistencia a Vancomicinas.

Cepas analizadas	
<i>Enterococcus durans</i>	1
<i>Enterococcus faecium</i>	10
<i>Enterococcus gallinarum</i>	2

Tabla 14. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a Vancomicinas.

		Vancomicinas												
Peso Molecular esperado		137	190	114	124	96	154	132	117	180	146	153	157	171
Gen		VanA					VanB		VanC	VanD		VanE		
Oligonucleótido No.		1	2	3	4	5	1	2		1	2	1	2	3
Cepa	<i>Enterococcus durans</i>												+	
	<i>Enterococcus faecium</i>	+				+								
	<i>Enterococcus faecium</i>		+											
	<i>Enterococcus faecium</i>								+					
	<i>Enterococcus faecium</i>		+											
	<i>Enterococcus faecium</i>					+								
	<i>Enterococcus faecium</i>											+		
	<i>Enterococcus faecium</i>	+		+		+								
	<i>Enterococcus faecium</i>						+							
	<i>Enterococcus faecium</i>		+											
	<i>Enterococcus faecium</i>										+			
	<i>Enterococcus gallinarum</i>					+								
	<i>Enterococcus gallinarum</i>					+								

Tabla 15 Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a Vancomicinas.

Genes	<i>VanA</i>	<i>VanB</i>	<i>VanC</i>	<i>VanD</i>	<i>VanE</i>
No. Positivos	8	1	1	1	2

Aminoglucósidos

Para aminoglucósidos se examinaron 26 cepas de las especies *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* las cuales exhibían resistencia a diferentes fármacos pertenecientes al grupo de aminoglucósidos. Se encontraron 8 de los 9 genes buscados, en la siguiente proporción: *CcrA* (96.15%), *CcrB* (3.85%), *Aph3L* (69.23%), *AacC* (0%), *RmtA* (7.69%), *RmtB* (15.38%), *RmtC* (11.54%) y *RmtD* (15.38%). 15 de estas 18 cepas presentaron más de un gen de resistencia a aminoglucósidos. Todas las cepas analizadas presentaron más de una banda de peso molecular esperado para diferentes reacciones en la detección de genes de resistencia a aminoglucósidos.

Tabla 16. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Aminoglucósidos.

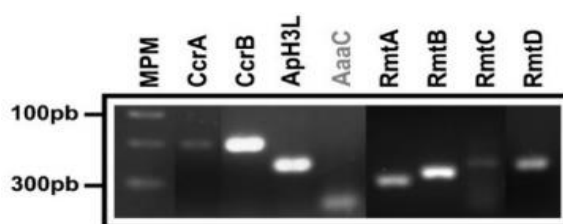


Tabla 17. Cepas analizadas en la búsqueda de genes de resistencia a Aminoglucósidos.

Cepas analizadas	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
<i>Enterococcus durans</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	8
<i>Enterococcus faecium</i>	3
<i>Enterococcus gallinarum</i>	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3

Tabla 18. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a Aminoglucósidos.

		Aminoglucósidos																
Peso Molecular esperado		129	194	100	198	134	207	169	111	92	140	124	117	179	143	174	122	
Gen		CcrA					CcrB		Aph3L			AacC	RmtA	RmtB	RmtC		RmtD	
Oligonucleótido No.		1	2	3	4	5	1	2	1	2	3				1	2		
Cepa	<i>Acinetobacter baumannii</i>									+				+				
	<i>Enterococcus durans</i>		+		+	+			+	+								
	<i>Enterococcus faecalis</i>		+		+				+	+							+	
	<i>Enterococcus faecalis</i>		+	+	+													
	<i>Enterococcus faecalis</i>		+														+	
	<i>Enterococcus faecalis</i>				+	+					+							
	<i>Enterococcus faecalis</i>		+		+					+								
	<i>Enterococcus faecalis</i>		+		+					+								
	<i>Enterococcus faecalis</i>				+					+								
	<i>Enterococcus faecalis</i>			+	+	+			+	+								
	<i>Enterococcus faecium</i>		+		+				+	+				+				
	<i>Enterococcus faecium</i>		+		+													
	<i>Enterococcus faecium</i>		+		+	+			+									
	<i>Enterococcus gallinarum</i>		+		+				+	+			+				+	
	<i>Enterococcus gallinarum</i>		+		+													
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		+		+	+								+				
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		+	+	+	+					+	+						
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		+		+													+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		+		+	+					+							
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		+	+	+	+					+							
	<i>Staphylococcus aureus</i>		+		+				+	+							+	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>				+		+	+	+	+				+	+			
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		+		+	+			+	+							+	
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>				+	+			+	+	+							
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		+		+								+	+				
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>			+		+												

Tabla 19. Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a fármacos Aminoglucósidos.

Genes	<i>CcrA</i>	<i>CcrB</i>	<i>Aph3L</i>	<i>AacC</i>	<i>RmtA</i>	<i>RmtB</i>	<i>RmtC</i>	<i>RmtD</i>
No. Positivos	25	1	18	-	2	4	3	4

Tetraciclinas

En la búsqueda de genes de resistencia a tetraciclinas se analizaron 11 cepas de las especies *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, los cuales presentaban resistencia a tetraciclina, encontrándose 5 de los 6 genes buscados, en la siguiente proporción: *TetA* (89.47%), *TetB* (47.37%), *TetC* (52.63%), *TetD* (47.37%), *TetE* (0%) y *TetM* (84.21%). Todas las cepas analizadas presentaron más de una banda de peso molecular esperado para diferentes reacciones en la detección de genes de resistencia a tetraciclinas.

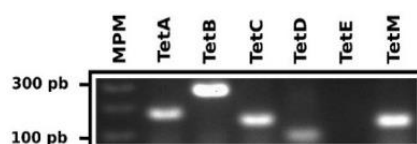


Figura 5. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Tetraciclinas.

Tabla 20 Cepas analizadas en la búsqueda de genes de resistencia a Tetraciclinas.

Cepas analizadas	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	6
<i>Enterococcus faecium</i>	2
<i>Enterococcus gallinarum</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1

Tabla 21. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a Tetraciclinas.

		Tetraciclinas																					
Peso Molecular esperado		93	94	175	158	122	119	281	87	153	140	116	150	168	103	84	243	183	97	136	157	237	
Gen		TetA						TetB			TetC				TetD				TetE	TetM			
Oligonucleótido No.		1	2	3	4	5	6	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	4		1	2	3	
Cepa	<i>Acinetobacter baumannii</i>		+			+		+	+											+			
	<i>Enterococcus faecalis</i>		+						+		+					+				+	+	+	
	<i>Enterococcus faecalis</i>										+				+						+	+	
	<i>Enterococcus faecalis</i>							+	+											+	+		
	<i>Enterococcus faecalis</i>							+	+								+						
	<i>Enterococcus faecalis</i>																			+	+		
	<i>Enterococcus faecalis</i>	+						+												+	+		
	<i>Enterococcus faecium</i>	+									+					+	+			+	+		
	<i>Enterococcus faecium</i>	+									+									+	+		
	<i>Enterococcus gallinarum</i>		+						+		+	+								+	+		
	<i>Enterococcus gallinarum</i>	+							+		+						+			+	+		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		+	+										+	+		+			+	+	+	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>										+												
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				+											+	+						
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+						+		+	+									+		
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+					+													+	+	
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>												+			+					+	+	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>																				+	+		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+							+								+				+	+		

Tabla 22. Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a Tetraciclinas.

Genes	TetA	TetB	TetC	TetD	TetE	TetM
No. Positivos	17	9	10	9	1	16

Macrólidos

En la búsqueda de genes de resistencia a macrólidos se analizaron 16 cepas de las especies *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, los cuales presentaban resistencia macrólidos, encontrándose 6 de los 8 genes buscados, en la siguiente proporción: *AmeF* (81.25%), *MefA* (0%), *MefB* (18.75%), *ErmA* (87.5%), *ErmB* (87.5%), *ErmT* (0%), *Ere* (6.25%) y *Msr* (43.75%). 15 de las 16 cepas analizadas presentaron más de una banda de peso molecular esperado para diferentes reacciones en la detección de genes de resistencia a macrólidos.

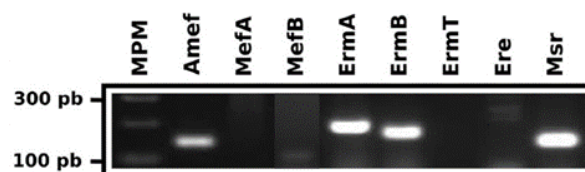


Figura 6, Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Macrólidos.

Tabla 23. Cepas analizadas en la búsqueda de genes de resistencia a Macrólidos.

Cepas analizadas	
<i>Enterococcus faecalis</i>	5
<i>Enterococcus faecium</i>	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1

Tabla 24. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a Macrólidos.

Macrólidos																				
Peso Molecular esperado		143	124	142	180	107	197	195	112	185	161	157	142	144	112	90	108	106	103	127
Gen		AmeF	MefA			MefB	ErmA				ErmB			ErmT	Ere			Msr		
Olugonucleótido No.			1	2	3		1	2	3	4	1	2	3		1	2	3	1	2	3
Cepa	<i>Enterococcus faecalis</i>	+				+				+	+	+								
	<i>Enterococcus faecalis</i>									+	+	+						+		
	<i>Enterococcus faecalis</i>	+								+	+	+								
	<i>Enterococcus faecalis</i>	+					+			+	+	+								
	<i>Enterococcus faecalis</i>	+					+			+	+	+								
	<i>Enterococcus faecium</i>	+				+				+	+	+								
	<i>Enterococcus faecium</i>	+								+	+	+								
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+				+	+	+	+	+	+	+								
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+					+	+	+	+	+	+				+			+	+
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+					+			+	+	+							+	+
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>										+	+	+						+	+
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>																			+
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+							+	+	+	+	+							
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+									+	+	+						+	
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+						+	+		+	+	+						+	
<i>Streptococcus agalactie</i>	+																			

Tabla 25. Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a Macrólidos.

Genes	AmeF	MefA	MefB	ErmA	ErmB	ErmT	Ere	Msr
No. Positivos	13	-	3	14	14	-	1	7

Sulfonamidas y Trimetropim

En la búsqueda de genes de resistencia a sulfonamidas y trimetropim, se analizaron 5 cepas de las especies *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, los cuales presentaban resistencia fenotípica a la combinación de trimetropim con sulfametoxazol, se encontraron en su totalidad los genes buscados para sulfonamidas en la siguiente proporción *Sul1* (100%), *Sul2* (100%) y *Sul3* (60%), el total de las cepas analizadas presentaron más de una banda de peso molecular esperado para diferentes reacciones en la detección de genes de resistencia a sulfonamidas. En el caso de trimetropim sólo en el 20% de las cepas analizadas se encontró la banda de peso molecular esperado, para la búsqueda del gen de resistencia a trimetropim.

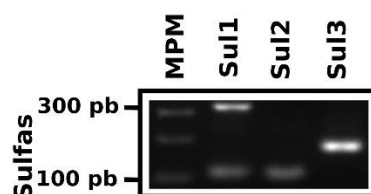


Figura 7. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Sulfonamidas.

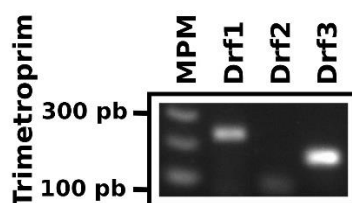


Figura 8. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Trimetropim.

Tabla 26 Cepas analizadas en la búsqueda de genes de resistencia a Sulfonamidas y trimetropim.

Cepas analizadas	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1

Tabla 27. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a Sulfonamidas.

Sulfonamidas								
Peso Molecular esperado		111	122	164	109	170	130	177
Gen		Sul1			Sul2			Sul3
Olugonucleótido No.		1	2	3	1	2	3	
Cepa	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+		+	+	+	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+		+	+	+	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+		+	+	+
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+		+	+	+	

Tabla 28. Resumen de resultados en la búsqueda de genes de resistencia a Sulfonamidas.

Genes	Sul1	Sul2	Sul3
No. Positivos	5	5	3

Tabla 29. Resultados de las reacciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de resistencia a Trimetropim.

		Trimetropim		
Peso Molecular esperado		207	61	163
Gen		Dfr		
Oligonucleótido No.		1	2	3
Cepa	<i>Acinetobacter baumannii</i>			
	<i>Enterococcus faecalis</i>			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+		+
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			

Meticilina

Para la búsqueda de los genes que confieren resistencia a meticilina, se realizó un pool conformado con la extracción de DNA total de 100 cepas bacterianas, con el cual se obtuvieron las bandas del peso molecular esperado, sin embargo, no se puede determinar el origen puntual de cada una de ellas.

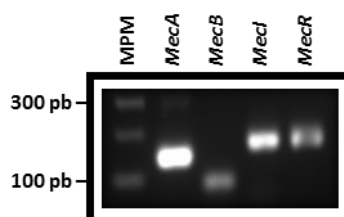


Figura 9. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Meticilinas.

Cloranfenicol

Para la búsqueda de los genes que confieren resistencia a cloranfenicol, se realizó un pool conformado con la extracción de DNA total de 100 cepas bacterianas, con el cual se obtuvieron las bandas del peso molecular esperado, sin embargo, no se puede determinar el origen puntual de cada una de ellas.

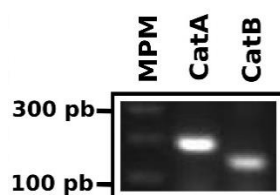


Figura 10. Corrimiento electroforético con las bandas de peso molecular esperado para los genes de resistencia a Cloranfenicol.

Diseño de la plataforma múltiplex de PCR punto final para el antibiograma molecular

Se configuró una placa de 96 pozos, para la identificación de genes de resistencia a antibióticos mediante PCR punto final, en la cual se pueden evaluar simultáneamente 137 pares de oligos en 41 reacciones, con lo cual se pueden evaluar dos muestras en una sola placa, en una única corrida de punto final. Se puso a prueba el diseño múltiplex a partir de una muestra obtenida de la pantalla celular de un profesional médico del Hospital Regional “1° de Octubre”, en el cual se encontraron 7 genes de resistencia a diferentes antibióticos; *blaBIL*, *blaSHV*, que confieren resistencia a fármacos B-lactámicos; *TetB-2* que confiere resistencia a tetraciclinas; *CcrA-1* que confiere resistencia a aminoglucósidos, *Sul2* que confiere resistencia a sulfonamidas, *ErmB-1* que da resistencia a macrólidos, y *Vgb-6* que confiere resistencia a estreptograminas. Tabla 30 Configuración de placa para evaluación de genes de resistencia a antibióticos en PCR punto final.

Tabla 31. Diseño de la plataforma múltiplex PCR punto final.

		1		2		3		4		5		6	
		7		8		9		10		11		12	
A	B-lactamasas y *Trimetopán	OXA	114	TetA-1	93	VanA-3	114	MefB	107	Vat-1	102	QnrB	83
		VIM	133	TetC-2	116	VanA-1	137	MefA-2	142	Sat-1	111	ParC-1	112
		P	204	TetC-1	140	VanE-1	153	ErmA-1	197	Sat-4	142	GyrB-4	132
				TetC-4	168	VanD-1	180			Vgb-2	197	ParC-6	165
												GyrB-2	202
B		SHV1	106	TetA-2	94	VanA-5	96	Ere-2	90	Vat-2	104	GrlB	102
		BIL	128	TetA-6	119	VanA-4	124	ErmA-3	112	Vat-3	115	QnrC	120
		IMP2	193	TetC-3	150	VanE-2	157	ErmB-3	142	Vat-4	146	GrlA	158
				TetA-3	175	VanA-2	190	ErmA-2	195			QnrA	214
C		KPC	117	TetB-2	87	VanC	117	Ere-3	108	Vgb-5	104	GyrA-1	105
		SHV2	141	TetA-5	122	VanD-2	146	ErmT	144	Sat-5	130	QnrD	121
	*Dfr1	207	TetB-3	153	VanE-3	171			Vgb-4	146	ParC-3	144	
			TetB-1	281							GyrB-3	227	
D	DHA3	117	TetD-1	103	CatB-5	93	Ere-1	112	Sat-3	106	Gep1	106	
	DHA2	147	TetM	136	CatB2	146	ErmB-1	161	Vgb-8	133	QnrS-2	120	
	CFX	177	TetA-4	158	Sul3	177			Vgb-6	159	ParC-5	152	
	DHA1	200	TetD-4	183									
E	ROB	126	CcrA-1	129	Sul2-1	109	Msr-1	106	Vgb-7	110	ParC-4	127	
	IMP1	182	CcrB-2	169	CatB-7	163	Msr-3	127	Vgb-3	139	GyrB-5	149	
	CTX3	226	CcrB-1	207	CatB-6	182	ErmB-2	157	Sat-2	186			
F	LAP	126	RmtA	117	Sul1-1	111	Msr-2	103					
	CMV2	160	CcrA-5	134	Sul1-3	164	MefA-1	124					
	CMV1	200	RmtB	179	CatB-2	189							
			CcrA-4	198									
G	Metecilinas	MecA-2	75	AacC	124	Sul1-2	122	Emm-4	118				
		MecB-3	113	Aph3L-3	140	Sul2-2	170	Emm-2	130				
		MecA-1	141	CcrA-2	194	CatB-3	190	Emm-3	186				
		MecA-3	154					Emm-1	279				
MecI		172											
H		MecR-1	86	RmtC-2	174	CatB-8	136						
		MecB-2	113	RmtD	122	CatB-4	176						
		MecB-1	140	RmtC-1	143	CatB-1	191						
		MecR-2	171										

Secuenciación masiva

Se realizaron dos eventos de secuenciación, en los cuales se secuenciaron de 15 cepas que exhibían fenotipo de resistencia a diferentes grupos de antibióticos, las cuales fueron previamente caracterizadas por métodos bioquímicos semiautomatizados. Se realizó una secuenciación masiva en el equipo MiSeq utilizando la tecnología de illumina.

Ensamble de novo Shotgun y análisis metagenómico

Se llevó a cabo un ensamble de *novo* de las secuencias obtenidas mediante el software SPAdes Genome Assembler de la plataforma BaseSpace. Utilizando el software Prokka (para organismos procariotas), de la plataforma BaseSpace de Illumina, pudimos conocer el número de secuencias codificantes (CDS), tamaño del ensamble en número de bases y el total de contigs obtenidos del ensamble de las secuencias.

Las secuencias obtenidas se sometieron a un análisis metagenómico Shotgun utilizando el software Kraken metagenomics de la plataforma BaseSpace, esto con para corroborar los resultados obtenidos por métodos microbiológicos clásicos.

Tabla 32. Comparativa entre la identificación por métodos bioquímicos y análisis metagenómico, número de secuencias codificantes (CDS), número de contigs obtenidos del ensamble de novo y tamaño total del ensamble.

No.	Identificación bioquímica	Análisis metagenómico	CDS	No. Contigs	Tamaño de ensamble (bases)
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,596	8,889	5,681,210
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	3,094	310	3,220,284
3	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,338	431	2,598,520
4	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,830	290	2,980,204
5	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	3,287	342	3,382,848
6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	3,611	306	3,911,858
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,047	824	7,539,620
8	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	3,172	298	3,262,969
9	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,545	607	5,940,733
10	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	4,545	1,484	4,982,176
11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,071	583	5,479,173
12	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter colcoaceticus</i>	3,301	508	3,659,167
13	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	no clasificada	2,934	478	3,237,338
14	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	4,388	526	4,727,803
15	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,945	914	6,483,045

Análisis metagenómico

Cepa 1. Identificada metagenómicamente como *Pseudomonas aeruginosa*.

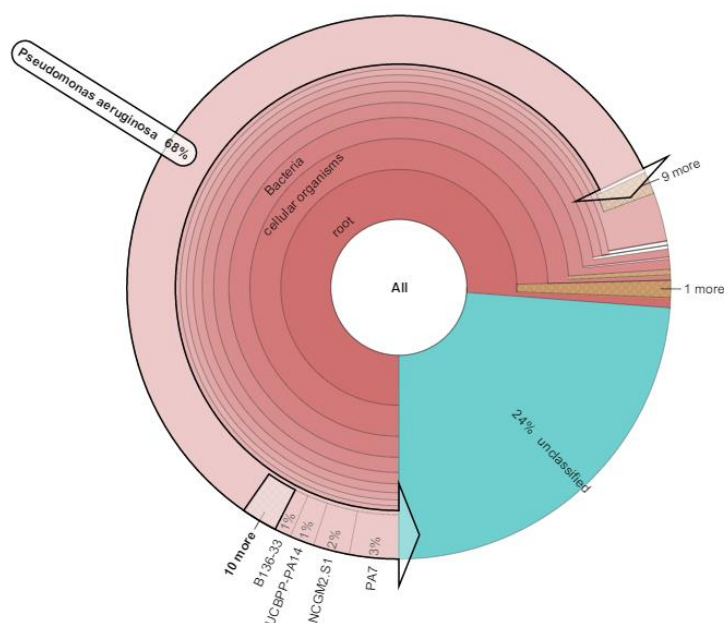


Figura 11. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 1, identificada como *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 33. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 1, identificada como *Pseudomonas aeruginosa*.

Información de la muestra		
Total de lecturas	Lecturas clasificadas	% de lecturas clasificadas
241,072	183,689	76.20%
Estadística de la clasificación		
Nivel Taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico	Porcentaje de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Dominio	182,241	75.60%
Phylum	179,018	74.26%
Clase	177,491	73.63%
Orden	178,775	74.16%
Familia	178,735	74.14%
Género	176,087	73.04%
Especie	170,381	70.68%

Cepa 2. Identificada metagenómicamente como *Enterococcus faecalis*.

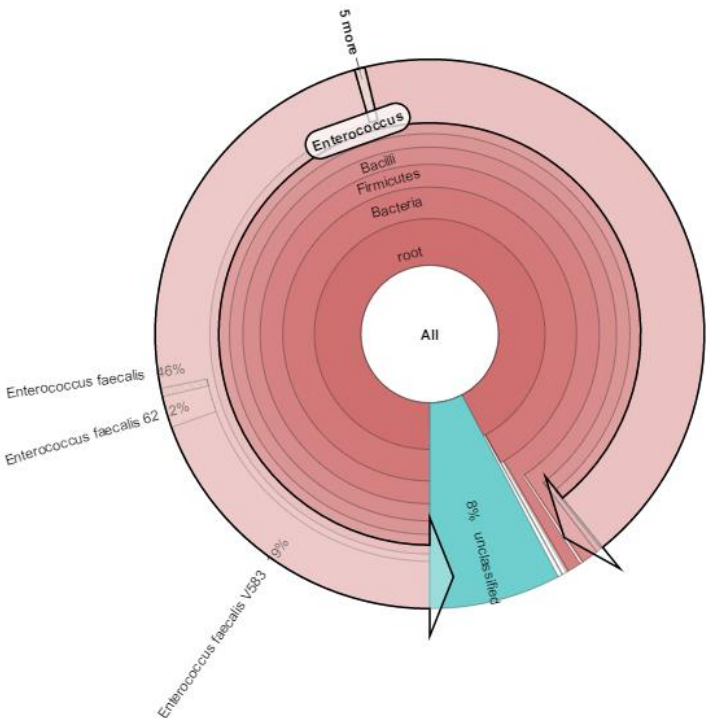


Figura 12. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 2, identificada como *Enterococcus faecalis*.

Tabla 34. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 2, identificada como *Enterococcus faecalis*.

Información de la muestra		
Total de lecturas	Lecturas clasificadas	% de lecturas clasificadas
1,358,967	1,253,604	92.25%
Estadística de la clasificación		
Nivel Taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico	Porcentaje de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Dominio	1,250,226	92.00%
Phylum	1,246,339	91.71%
Clase	1,235,203	90.89%
Orden	1,222,476	89.96%
Familia	1,217,814	89.61%
Género	1,216,104	89.49%
Especie	631,376	46.46%

Cepa 3. Identificada metagenómicamente como *Staphylococcus epidermidis*.

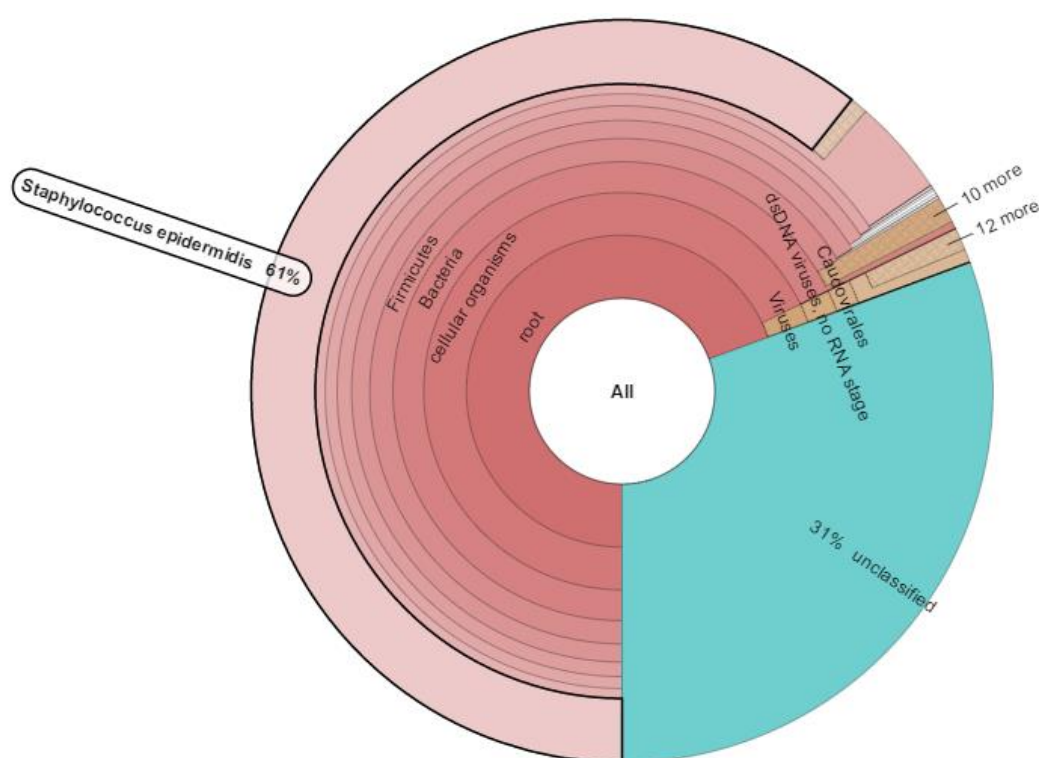


Figura 13. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 3, identificada como *Staphylococcus epidermidis*.

Tabla 35. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 3, identificada como *Staphylococcus epidermidis*.

Información de la muestra		
Total de lecturas	Lecturas clasificadas	% de lecturas clasificadas
241,072	183,689	76.20%
Estadística de la clasificación		
Nivel Taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico	Porcentaje de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
<i>Dominio</i>	637,123	69.34%
<i>Phylum</i>	619,812	67.46%
<i>Clase</i>	618,605	67.33%
<i>Orden</i>	631,769	68.76%
<i>Familia</i>	630,508	68.76%
<i>Género</i>	615,030	66.94%
<i>Especie</i>	584,629	63.63%

Cepa 4. Identificada metagenómicamente como *Enterococcus faecalis*.

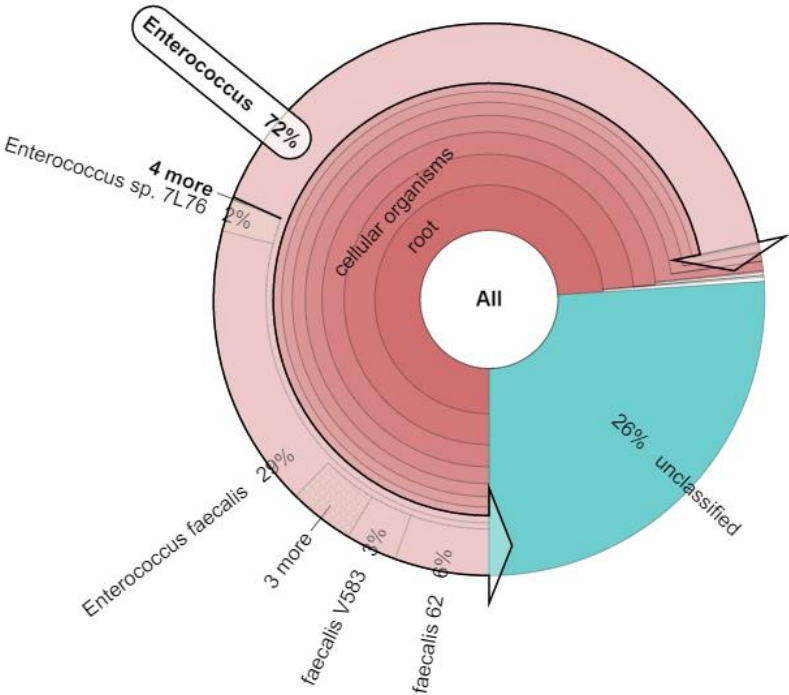


Figura 14. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 4, identificada como *Enterococcus faecalis*.

Tabla 36. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 4, identificada como *Enterococcus faecalis*.

Información de la muestra		
Total de lecturas	Lecturas clasificadas	% de lecturas clasificadas
690,633	510,743	73.95%
Estadística de la clasificación		
Nivel Taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico	Porcentaje de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Dominio	508,998	73.70%
Phylum	507,176	73.44%
Clase	503,364	72.88%
Orden	500,629	72.49%
Familia	497,257	72.00%
Género	496,211	71.85%
Especie	215,749	31.24%

Cepa 5. Identificada metagenómicamente como *Enterococcus faecalis*.

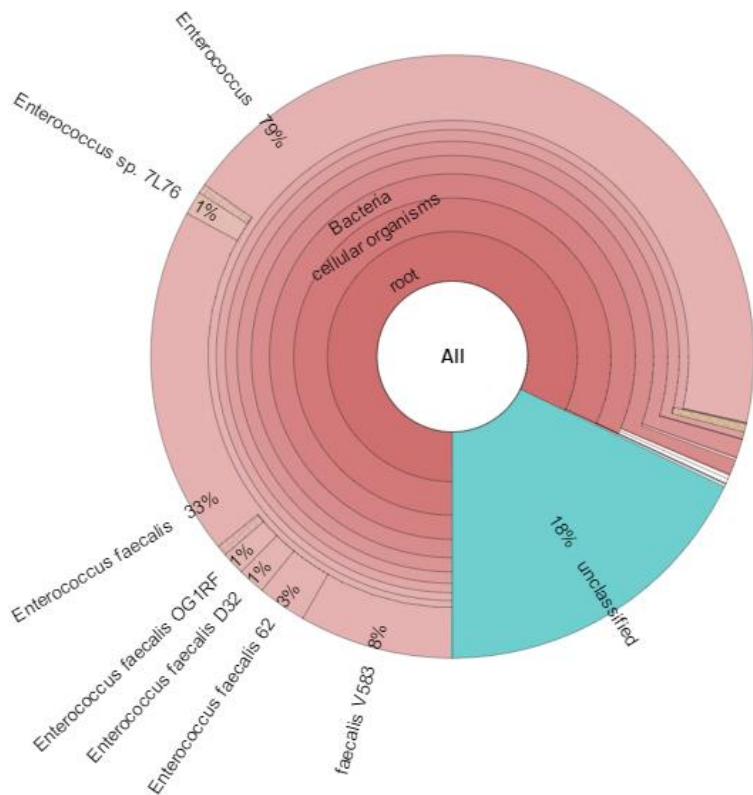
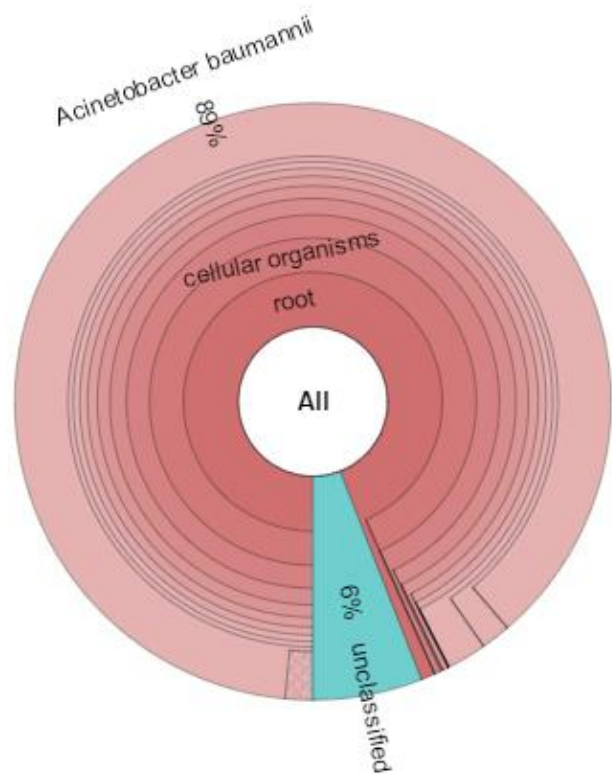


Figura 15. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 5, identificada como *Enterococcus faecalis*.

Tabla 37. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 5, identificada como *Enterococcus faecalis*.

Información de la muestra		
Total de lecturas	Lecturas clasificadas	% de lecturas clasificadas
1,233,259	1,012,560	82.10%
Estadística de la clasificación		
Nivel Taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico	Porcentaje de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
<i>Dominio</i>	1,010,926	81.97%
<i>Phylum</i>	1,007,034	81.66%
<i>Clase</i>	996,883	80.83%
<i>Orden</i>	985,231	79.89%
<i>Familia</i>	980,063	79.47%
<i>Género</i>	978,863	79.37%
<i>Especie</i>	437,050	35.44%

Cepa 6. Identificada metagenómicamente como *Acinetobacter baumannii* complex.



*Figura 16. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 6, identificada como *Acinetobacter baumannii* complex.*

*Tabla 38. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 6, identificada como *Acinetobacter baumannii* complex.*

Información de la muestra		
Total de lecturas	Lecturas clasificadas	% de lecturas clasificadas
2,129,852	2,003,348	94.06%
Estadística de la clasificación		
Nivel Taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico	Porcentaje de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
<i>Dominio</i>	1,987,917	93.34%
<i>Phylum</i>	1,979,260	92.93%
<i>Clase</i>	1,977,126	92.83%
<i>Orden</i>	1,971,655	92.57%
<i>Familia</i>	1,971,517	92.57%
<i>Género</i>	1,969,817	92.49%
<i>Especie</i>	1,891,094	88.79%

Cepa 7. Identificada metagenómicamente como *Pseudomonas aeruginosa*.

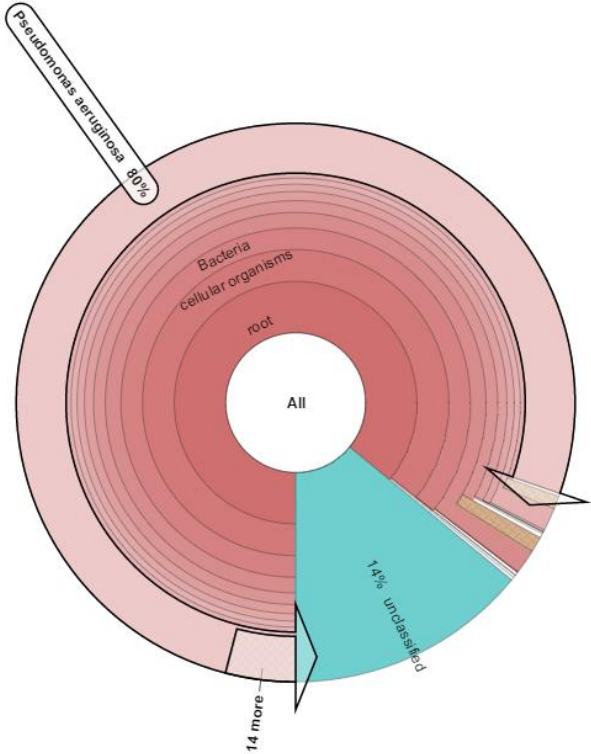


Figura 17. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 7, identificada como *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 39. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 7, identificada como *Pseudomonas aeruginosa*.

Información de la muestra		
Total de lecturas	Lecturas clasificadas	% de lecturas clasificadas
779,055	669,536	85.94%
Estadística de la clasificación		
Nivel Taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico	Porcentaje de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Dominio	668,114	85.76%
Phylum	665,225	85.39%
Clase	654,129	83.96%
Orden	652,879	83.80%
Familia	651,565	83.64%
Género	649,870	83.42%
Especie	639,202	82.05%

Cepa 8. Identificada metagenómicamente como *Enterococcus faecalis*.

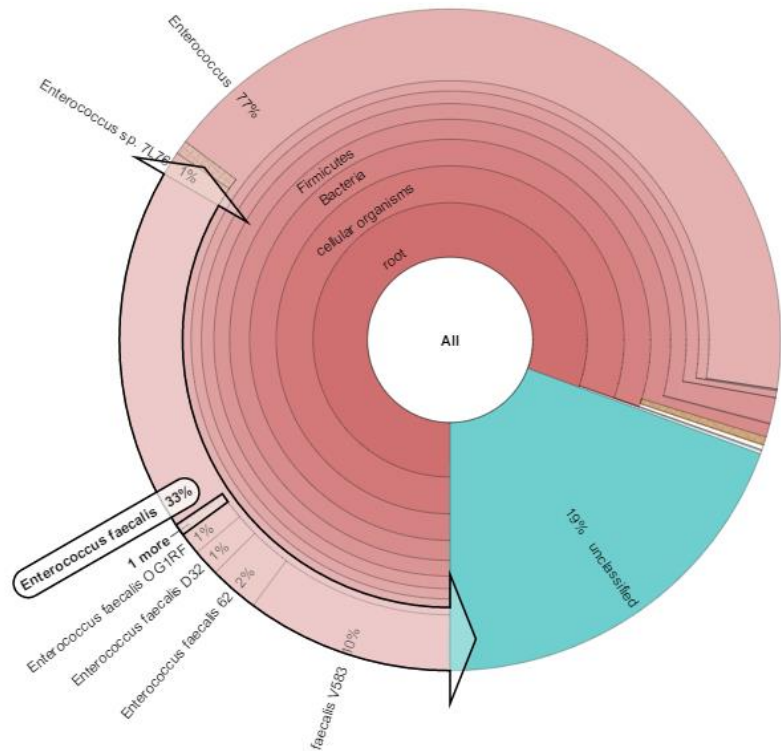


Figura 18. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 8, identificada como *Enterococcus faecalis*.

Tabla 40. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 8, identificada como *Enterococcus faecalis*.

Información de la muestra		
Total de lecturas	Lecturas clasificadas	% de lecturas clasificadas
744,676	600,214	80.60%
Estadística de la clasificación		
Nivel Taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico	Porcentaje de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Dominio	599,236	80.47%
Phylum	596,798	80.14%
Clase	591,911	79.49%
Orden	583,095	78.30%
Familia	580,483	77.95%
Género	579,604	77.83%
Especie	265,877	35.70%

Cepa 9. Identificada metagenómicamente como *Klebsiella pneumoniae*.

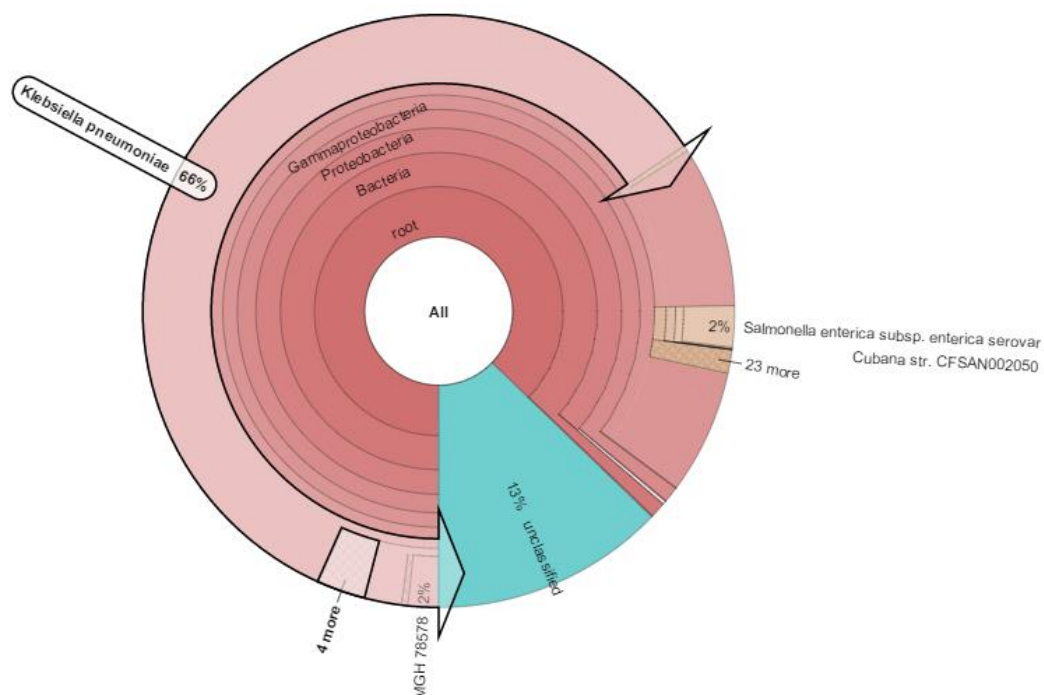


Figura 19. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 9, identificada como *Klebsiella pneumoniae*.

Tabla 41. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 9, identificada como *Klebsiella pneumoniae*.

Información de la muestra		
Total de lecturas	Lecturas clasificadas	% de lecturas clasificadas
898,806	783,761	87.20%
Estadística de la clasificación		
Nivel Taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico	Porcentaje de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Dominio	783,187	87.14%
Phylum	775,564	86.29%
Clase	773,994	86.11%
Orden	766,332	85.26%
Familia	766,196	85.25%
Género	705,084	78.45%
Especie	625,607	69.60%

Cepa 10. Identificada metagenómicamente como Escherichia coli.

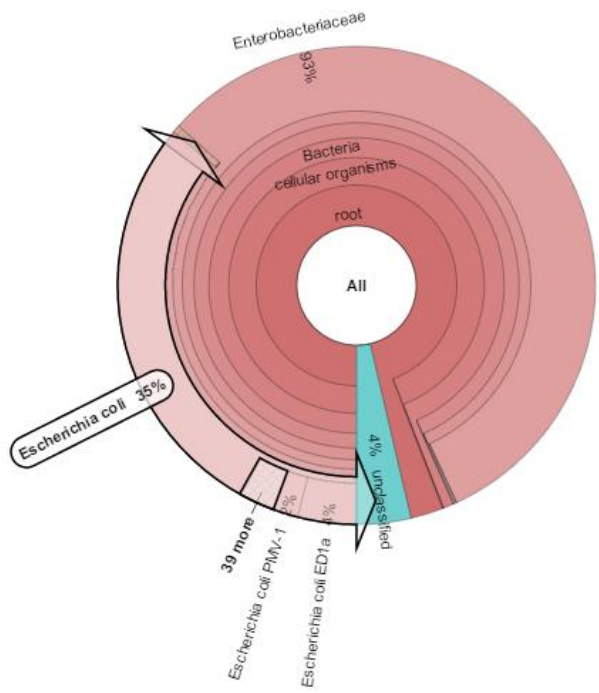


Figura 20. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 10, identificada como *Escherichia coli*.

Tabla 42. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 10, identificada como *Escherichia coli*.

Información de la muestra		
Total de lecturas	Lecturas clasificadas	% de lecturas clasificadas
4,714,939	4,541,943	96.33%
Estadística de la clasificación		
Nivel Taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico	Porcentaje de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Dominio	4,438,740	94.14%
Phylum	4,401,268	93.35%
Clase	4,397,652	93.27%
Orden	4,394,905	93.21%
Familia	4,395,029	93.21%
Género	1,730,480	36.70%
Especie	1,685,267	35.74%

Cepa 11. Identificada metagenómicamente como *Klebsiella pneumoniae*.

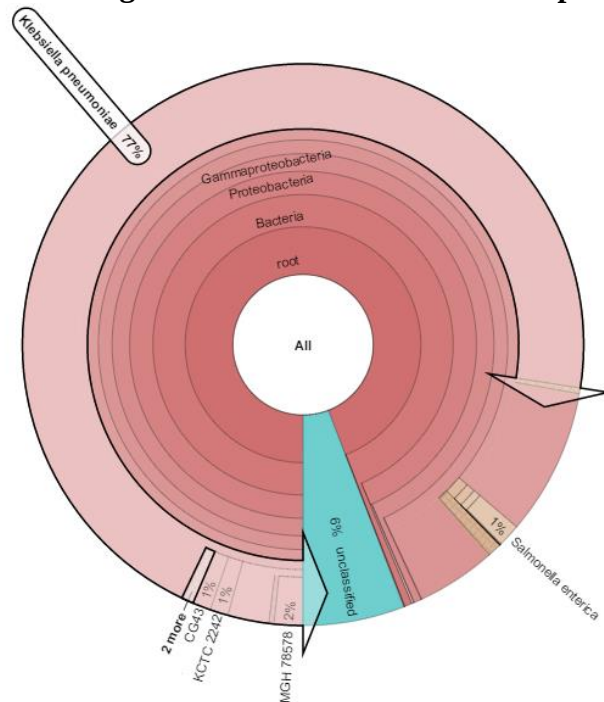


Figura 21. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 11, identificada como *Klebsiella pneumoniae*.

Tabla 43. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 11, identificada como *Klebsiella pneumoniae*.

Información de la muestra		
Total de lecturas	Lecturas clasificadas	% de lecturas clasificadas
1,523,821	1,434,672	94.15%
Estadística de la clasificación		
Nivel Taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico	Porcentaje de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Dominio	1,434,058	94.11%
Phylum	1,427,130	93.65%
Clase	1,425,587	93.55%
Orden	1,419,060	93.13%
Familia	1,419,175	93.13%
Género	1,348,898	88.52%
Especie	1,219,856	80.05%

Cepa 12. Identificada metagenómicamente como *Acinetobacter colcoaceticus*.

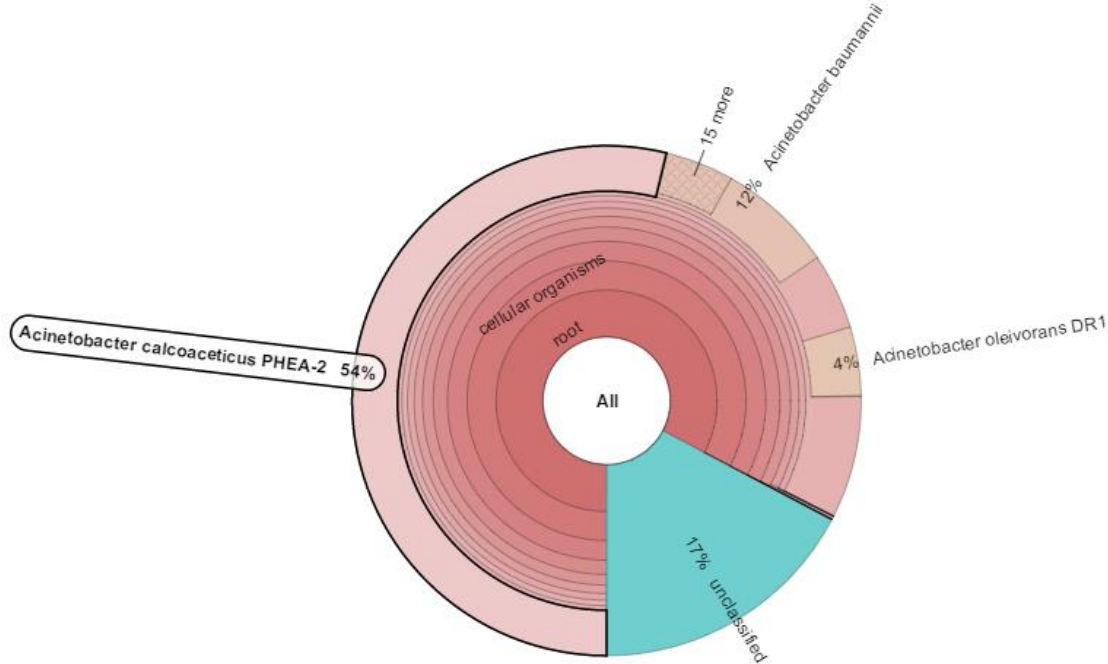


Figura 22. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 12, identificada como *Acinetobacter colcoaceticus*.

Tabla 44. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 12, identificada como *Acinetobacter colcoaceticus*.

Información de la muestra		
Total de lecturas	Lecturas clasificadas	% de lecturas clasificadas
2,197,947	1,818,286	82.73%
Estadística de la clasificación		
Nivel Taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico	Porcentaje de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Dominio	1,818,152	82.72%
Phylum	1,817,753	82.70%
Clase	1,816,997	82.67%
Orden	1,814,722	82.56%
Familia	1,814,761	82.57%
Género	1,814,302	82.55%
Especie	1,538,550	70.00%

Cepa 13. Identificada metagenómicamente como no clasificada.

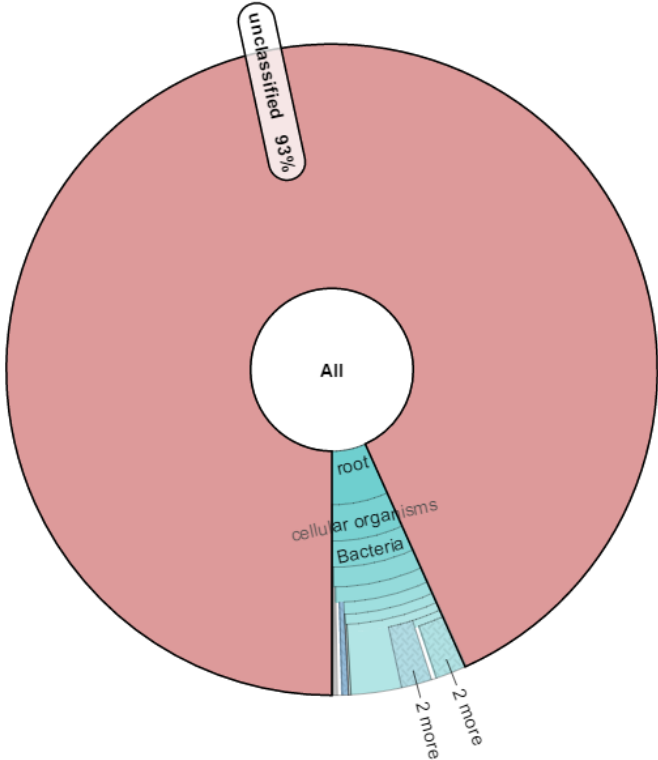


Figura 23. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 13, no identificada.

Tabla 45. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 13, no identificada.

Información de la muestra		
Total de lecturas	Lecturas clasificadas	% de lecturas clasificadas
2,043,437	138,497	6.78%
Estadística de la clasificación		
Nivel Taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico	Porcentaje de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Dominio	138,437	6.77%
Phylum	136,995	6.70%
Clase	135,237	6.62%
Orden	130,482	6.39%
Familia	129,973	6.36%
Género	127,360	6.23%
Especie	70,860	3.47%

Cepa 14. Identificada metagenómicamente como *Enterobacter cloacae*.

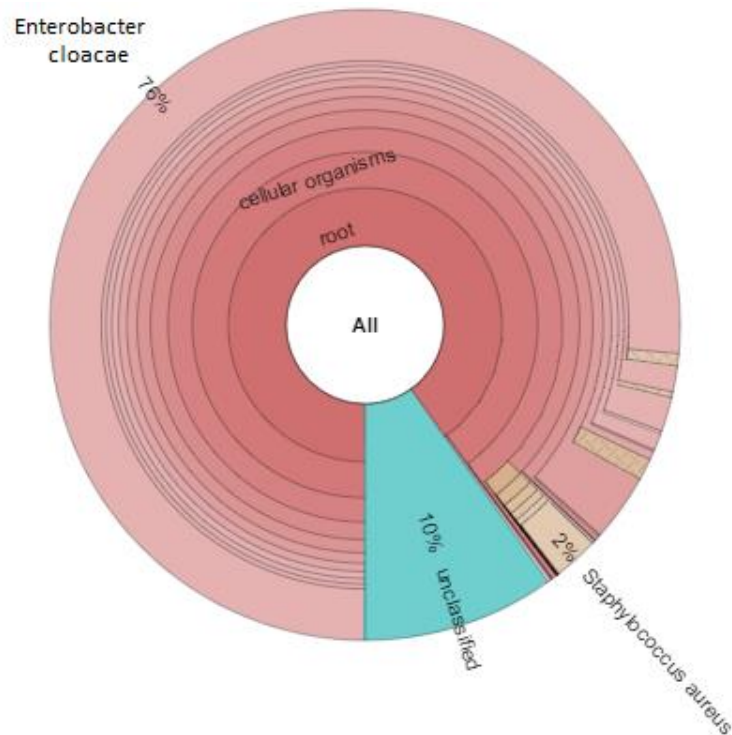


Figura 24. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 14, identificada como *Enterobacter cloacae*.

Tabla 46. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 14, identificada como *Enterobacter cloacae*.

Información de la muestra		
Total de lecturas	Lecturas clasificadas	% de lecturas clasificadas
1,331,424	1,200,101	90.14%
Estadística de la clasificación		
Nivel Taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico	Porcentaje de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Dominio	1,198,484	90.02%
Phylum	1,193,110	89.61%
Clase	1,190,902	89.45%
Orden	1,188,531	89.27%
Familia	1,188,519	89.27%
Género	1,141,985	85.77%
Especie	1,123,080	84.35%

Cepa 15. Identificada metagenómicamente como *Pseudomonas aeruginosa*.

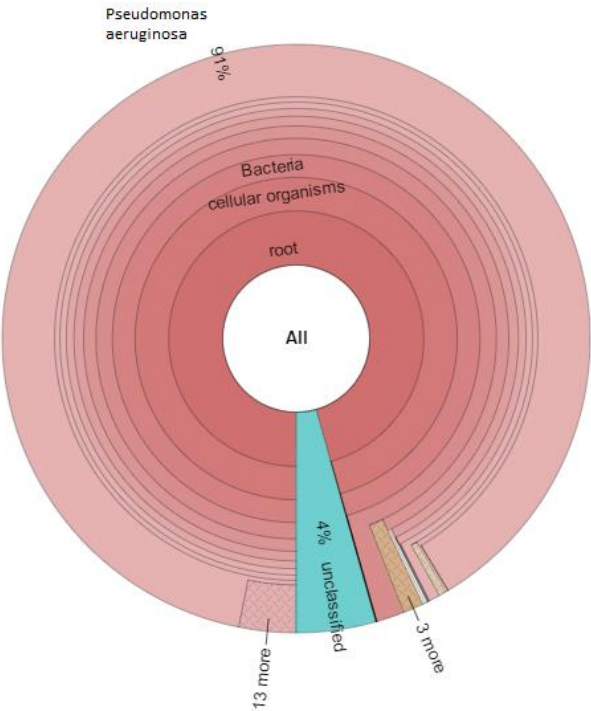


Figura 25. Esquema porcentual taxonómico del análisis metagenómico para la cepa 15, identificada como *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 47. Reporte estadístico del análisis metagenómico realizado en la cepa 15, identificada como *Pseudomonas aeruginosa*.

Información de la muestra		
Total de lecturas	Lecturas clasificadas	% de lecturas clasificadas
3,848,555	3,680,364	95.63%
Estadística de la clasificación		
Nivel Taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico	Porcentaje de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Dominio	3,679,637	95.61%
Phylum	3,678,453	95.58%
Clase	3,619,438	94.05%
Orden	3,609,215	93.78%
Familia	3,603,190	93.62%
Género	3,600,628	93.56%
Especie	3,572,513	92.83%

Análisis bioinformático de los datos obtenidos por secuenciación masiva

A partir de la secuenciación de 15 cepas con fenotipo de resistencias, se obtuvieron 63,704 secuencias codificantes en 67.086 Mb, dentro de lo cual se ha analizado alrededor del 20% de esta información.

Se encontró el gen *blaSHV-2* que confieren resistencia a B-lactámicos en la cepa no. 9 identificada metagenómicamente como *Klebsiella pneumoniae*, este gen había sido identificado anteriormente en la misma cepa, mediante PCR punto final. En la fig. 26 se puede apreciar las banda que visualmente corresponde con el peso molecular esperado de 141 pb., en el análisis bioinformático se encontraron las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos *forward* y *reverse* obteniéndose una región de 139 bases, tomando la secuencia y utilizando la herramienta de alineamiento y búsqueda de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI) se encontró la coincidencia del amplicón obtenido, con el gen buscado que codifica para una B-lactamasa, en este caso la BlaSHV (Fig. 27).

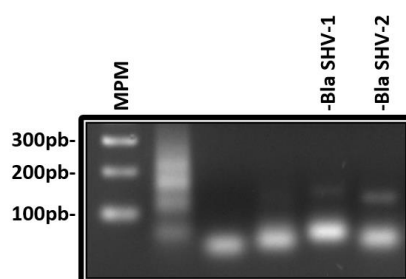


Figura 26. Patrón de corrimiento electroforético donde se observa las bandas correspondiente al gen *blaSHV-1* en la cepa secuenciada no. 9, identificada metagenómicamente como *Klebsiella pneumoniae*.

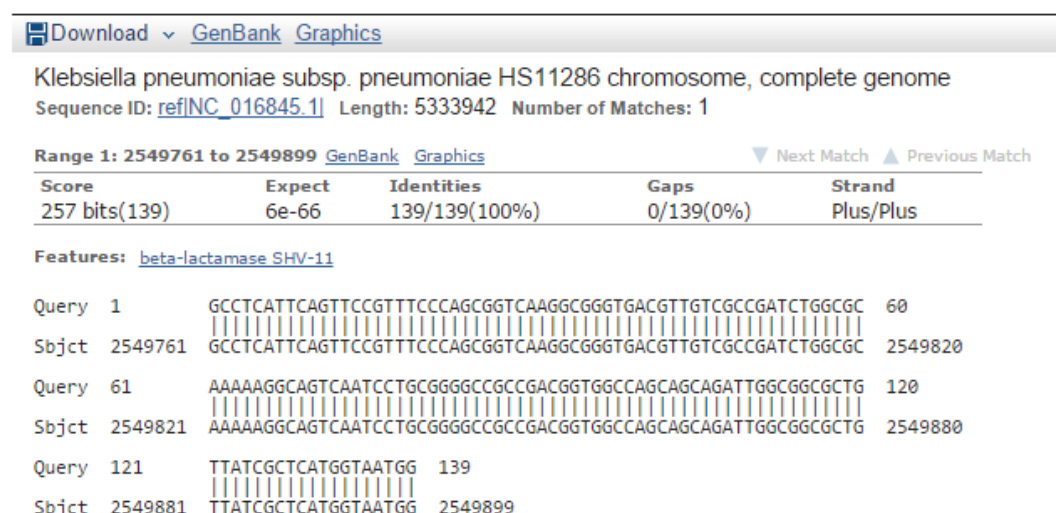


Figura 27. Captura de pantalla del análisis bioinformático para el gen *BlaSHV* en la cepa no.9 identificada como *Klebsiella pneumoniae*.

En las secuencias de la cepa no.11 identificada metagenómicamente como *Klebsiella pneumoniae*, se encontró también el gen *blaSHV*, mismo que anteriormente había sido identificado por PCR punto final donde se obtuvo una banda que visualmente corresponde al peso molecular esperado, que en este caso fue de 141 pb., en el análisis bioinformático se encontraron las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos *forward* y *reverse* obteniéndose una región de 139 bases, tomando la secuencia y utilizando la herramienta de alineamiento y búsqueda de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI) se encontró coincidencia del amplicón obtenido, con el gen buscado que codifica para una B-lactamasa, en este caso la *BlaSHV* (Fig. 29).

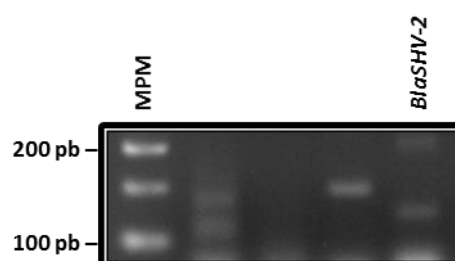


Figura 28. Patrón de corrimiento electroforético donde se observa las bandas correspondiente al gen *blaSHV* en la cepa secuenciada no. 11, identificada metagenómicamente como *Klebsiella pneumoniae*.

Download ▾ GenBank Graphics				
Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286 chromosome, complete genome				
Sequence ID: ref NC_016845.1 Length: 5333942 Number of Matches: 1				
Range 1: 2549761 to 2549899 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
257 bits(139)	6e-66	139/139(100%)	0/139(0%)	Plus/Plus
Features: beta-lactamase SHV-11				
Query 1	GCCTCATTCAAGTTCCGTTTCCAGCGGTCAAGGCGGGTGACGTTGTCGCCGATCTGGCGC	60		
Sbjct 2549761	GCCTCATTCAAGTTCCGTTTCCAGCGGTCAAGGCGGGTGACGTTGTCGCCGATCTGGCGC	2549820		
Query 61	AAAAAGGCAGTCAATCCTGCGGGGCGCCGACGGTGGCCAGCAGCAGATTGGCGGCCTG	120		
Sbjct 2549821	AAAAAGGCAGTCAATCCTGCGGGGCGCCGACGGTGGCCAGCAGCAGATTGGCGGCCTG	2549880		
Query 121	TTATCGCTCATGGTAATGG	139		
Sbjct 2549881	TTATCGCTCATGGTAATGG	2549899		

Figura 29. Captura de pantalla del análisis bioinformático para el gen *BlaSHV* en la cepa no.11 identificada como *Klebsiella pneumoniae*.

En las secuencias de la cepa no.10 identificada bioquímica y metagenómicamente como *Escherichia coli*, se encontró también el gen *gyrA*, mismo que anteriormente había sido identificado por PCR punto final donde se obtuvo una banda que visualmente corresponde al peso molecular esperado, que en este caso fue de 151 pb., en el análisis bioinformático se encontraron las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos *forward* y *reverse* obteniéndose una región de 150 bases, tomando la secuencia y utilizando la herramienta de alineamiento y búsqueda de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI) se encontró coincidencia del amplicón obtenido, con el gen buscado que codifica para una DNA girasa (Fig. 31).

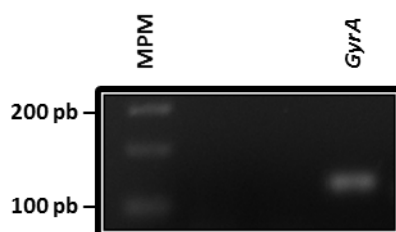


Figura 30. Patrón de corrimiento electroforético donde se observa las bandas correspondiente al gen *gyrA* en la cepa secuenciada no. 10, identificada como *Escherichia coli*.

Download ▾ GenBank Graphics				
Escherichia coli UMN026 chromosome, complete genome				
Sequence ID: ref NC_011751.1 Length: 5202090 Number of Matches: 1				
Range 1: 2637369 to 2637518 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
278 bits(150)	5e-72	150/150(100%)	0/150(0%)	Plus/Plus
Features: DNA gyrase subunit A				
Query 1	GTTCAGCAACACGTTGCAGACCCACTACGTTTTCATCTTCCGAGTACGGATGAGGATCA	60		
Sbjct 2637369	GTTCAGCAACACGTTGCAGACCCACTACGTTTTCATCTTCCGAGTACGGATGAGGATCA	2637428		
Query 61	CGCCCTGGGTGTTACGGCCACGATGCTGATTTCGAAACGCGAGTACGTACCAGCGTAC	120		
Sbjct 2637429	CGCCCTGGGTGTTACGGCCACGATGCTGATTTCGAAACGCGAGTACGTACCAGCGTAC	2637488		
Query 121	CGGCATCGGTGATCATCATGATCTGGTCGC	150		
Sbjct 2637489	CGGCATCGGTGATCATCATGATCTGGTCGC	2637518		

Figura 31. Captura de pantalla del análisis bioinformático para el gen *gyrA* en la cepa secuenciada no.10 identificada como *Escherichia coli*.

En las secuencias de la cepa no.10 identificada bioquímica y metagenómicamente como *Escherichia coli*, se encontró también el gen *ParC*, mismo que anteriormente había sido identificado por PCR punto final donde se obtuvo una banda que visualmente corresponde al peso molecular esperado, que en este caso fue de 112 pb., en el análisis bioinformático se encontraron las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos *forward* y *reverse* obteniéndose una región de 113 bases, tomando la secuencia y utilizando la herramienta de alineamiento y búsqueda de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI) se encontró coincidencia del amplicón obtenido, con el gen buscado que codifica para la subunidad IV de una DNA topoisomerasa (Fig. 33).

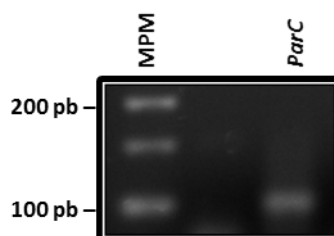


Figura 32. Patrón de corrimiento electroforético donde se observa las bandas correspondiente al gen *ParC* en la cepa secuenciada no. 10, identificada como *Escherichia coli*.

Download ▾ GenBank Graphics				
Escherichia coli O104:H4 str. 2011C-3493 chromosome, complete genome				
Sequence ID: ref NC_018658.1 Length: 5273097 Number of Matches: 1				
Range 1: 786723 to 786835 GenBank Graphics			▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
209 bits(113)	1e-51	113/113(100%)	0/113(0%)	Plus/Minus
Features: DNA topoisomerase IV subunit A				
Query 1	CCGGGAACATCAACATACGGCCTGCCTGAGTGATTGCCAGCAGCATATCGGAAGCATCTT			60
Sbjct 786835	CCGGGAACATCAACATACGGCCTGCCTGAGTGATTGCCAGCAGCATATCGGAAGCATCTT			786776
Query 61	CAATCACCACCGGCGGCATAACATGGGCATTTTCCGGTAAGGTGATCAAAGCC			113
Sbjct 786775	CAATCACCACCGGCGGCATAACATGGGCATTTTCCGGTAAGGTGATCAAAGCC			786723

Figura 33. Captura de pantalla del análisis bioinformático para el gen *ParC* en la cepa no.10 identificada como *Escherichia coli*.

CAPÍTULO 7. Discusión de resultados

Los resultados obtenidos de las cepas con fenotipo de multiresistencia del hospital regional 1º de Octubre y analizadas posteriormente con técnicas de biología molecular para la identificación de los genes de resistencia incluidos en la plataforma de antibiograma molculares podemos observar que el patrón de resistencia genotípico de las bacterias con mayor importancia clínica e identificadas como causantes de sepsis neonatal. A continuación se discute las más importantes.

Genes de resistencia en *Acinetobacter baumannii*

Los genes de resistencia a antibióticos encontrados en las cepas analizadas de *Acinetobacter baumannii* fueron: β -lactamasas (BlaOXA, BlaSHV, BlaROB, BlaCMV y BlaBIL), aminoglucósidos (Aph3L y RmtB), tetraciclinas (TetA, TetB y TetM), quinolonas (QnrD, QnrS y GyrA) y sulfonamidas (Sul1 y Sul2).

La emergente diseminación de especies de *Acinetobacter* resistentes a la mayoría de los agentes antimicrobianos disponibles actualmente, es un tema de gran preocupación. El manejo terapéutico de las infecciones causadas por este patógeno es un reto. Su habilidad para sobrevivir en el medio hospitalario

y su capacidad de permanecer por largos periodos de tiempo sobre las superficies lo posiciona como una causa frecuente de infecciones nosocomiales y epidemias. Este microorganismo causa un amplio rango de infecciones dentro de las que se incluyen: neumonía, bacteremia, meningitis, infecciones del tracto urinario e infecciones de heridas. (37).

Acinetobacter baumannii ha emergido como uno de los patógenos más problemáticos en las instituciones de salud en todo el mundo. Su significancia clínica, especialmente dentro de los últimos 15 años se ha acrecentado por su remarcada actividad para sobre regular o adquirir determinantes de resistencia a antibióticos, convirtiéndolo en uno de los microorganismos más preocupantes en la era antibiótica. (38).

Acinetobacter baumannii no es un microorganismo ubicuo y no se observa con frecuencia en la naturaleza, ni como colonizador de la comunidad (39). Por el contrario, esta bacteria coloniza e infecta pacientes hospitalizados en estado crítico e inmunosuprimidos, siendo común en unidad de cuidados intensivos y unidad de quemados (40).

Mecanismos de resistencia en *Acinetobacter baumannii*

Es impresionante el amplio rango de mecanismos de resistencia en *Acinetobacter baumannii* y la rápida diseminación de cepas resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos, incluyendo carbapenems, ilustra el potencial de este microorganismo a responder rápidamente a la presión de selección.

En el caso de resistencia a β -lactámicos en *Acinetobacter*, el mecanismo de resistencia con mayor prevalencia es la degradación enzimática, llevada a cabo por β -lactamasas. La resistencia inherente a β -lactámicos en este microorganismo es debida a un gen cromosomal que codifica para una AmpC cefalosporinasa, la cual también se conoce como ADCs (del inglés: *Acinetobacter*-derived cephalosporinases). Sin embargo, los carbapenémicos y el cefepime parecen ser estables a la acción de estas enzimas. También se han descrito BLES (Beta lactamasas de espectro extendido) del grupo A en la clasificación de Ambler, sin embargo su presencia es de difícil detección en las pruebas fenotípicas de laboratorio, las cuales se ven opacadas por la presencia de la enzima AmpC (38).

Se han descrito también otras BLES en *Acinetobacter baumannii*, incluyendo TEM, la cual se ha encontrado en Holanda e Italia, en las cepas de *Acinetobacter* analizadas para el presente trabajo, no se evidenció la presencia de esta enzima; SHV se ha encontrado en China y Holanda al igual que en la cepa analizada en este trabajo, con lo que podemos concluir que esa cepa posee resistencia a penicilinas de amplio espectro como ampicilina, tigeciclina y piperacilina (41); y CTX descrita en Japón y Bolivia, que al igual que la enzima TEM no fue evidenciada en la cepa analizada en este trabajo (38).

De las β -lactamasas, aquellas que tienen actividad carbapenemasa son las más preocupantes, debido a que limitan drásticamente el rango de alternativas terapéuticas, en estas se incluyen las serina oxacilinasas (clase D en la clasificación de Ambler, tipo OXA) y las MBLs (Metallo B-lactamasas, clasificación Ambler B). Se considera que la resistencia a carbapenémicos es, en sí misma, suficiente para determinar a un aislado de *Acinetobacter baumannii*, como altamente resistente (42).

La primera enzima identificada del tipo OXA fue en *Acinetobacter baumannii*, la cual fue aislada en el año de 1985 en Escocia y actualmente sigue contribuyendo a la resistencia a Carbapenémicos en esta bacteria (38). Como se puede apreciar en los resultados obtenidos del presente trabajo, esta enzima fue identificada en la cepa analizada de *Acinetobacter baumannii*. Cabe mencionar que debido a la multiplicidad de mecanismos de resistencia a β -lactámicos en *Acinetobacter baumannii*, este tipo de enzimas resulta difícil de determinar por los métodos fenotípicos convencionales, el uso de técnicas novedosas para su identificación, puede cambiar drásticamente el manejo y la implementación de tratamiento para los pacientes afectados por este microorganismo.

A pesar que las MBLs son identificadas en menor medida en *Acinetobacter*, que las carbapenemasas tipo OXA, su actividad hidrolítica es significativamente más potente (de 100 a 1000 veces mayor) (38). Se han identificado cinco grupos de MBL a la fecha: IMP, VIM, SIM, SPM y GIM. Sólo las tres primeras se han encontrado en *Acinetobacter baumannii* (42), en la cepa analizada en este trabajo, no se evidenció la presencia de ninguna de estas enzimas.

Cabe aquí mencionar que la detección de BLES en microorganismos multirresistentes como lo es *Acinetobacter baumannii* es de primordial importancia, con la finalidad de tomar las medidas necesarias para minimizar la diseminación de estos patógenos, así como para coadyuvar en la selección de los fármacos más indicados (41).

En la cepa analizada también se encontraron los genes blaROB, blaCMV y blaBIL. Los cuales codifican a betalactamasas. En el caso de blaROB, una enzima que fue inicialmente identificada en una cepa de *Haemophilus influenzae* resistente a penicilina y el cual posee un patrón de resistencia similar a las enzimas del tipo TEM, que hidroliza penicilinas y cefalosporinas (43); blaCMV y blaBIL, la cual pertenece a las B-lactamasas del grupo C, cefalosporinasas, que debido a que pueden sintetizarse en altos niveles pueden a su vez mediar resistencia tanto a cefalosporinas como a penicilinas (44).

Los aminoglucósidos se han utilizado durante largo tiempo para el tratamiento de las infecciones causadas por *Acinetobacter*, y todavía son una importante alternativa para el tratamiento de las cepas multirresistentes (45). Sin embargo, se han encontrado diversos tipos de enzimas modificadoras de aminoglucósidos en *Acinetobacter baumannii*, acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas y fosfotransferasas, algunas veces pueden encontrarse en combinación (46). En la cepa analizada pudimos encontrar el gen Aph3L, el cual corresponde a una fosfotransferasa, uno de los mecanismos encontrados con mayor prevalencia en las cepas de *Acinetobacter* multirresistentes y el cual produce una resistencia de alto nivel a aminoglucósidos (45).

Se ha descrito también, otro grupo de enzimas las cuales confieren resistencia de alto nivel hacia todos los aminoglucósidos, es el caso de la 16S rRNA metiltransferasas (ArmA, RmtA, B, C y D), (46), los cuales confieren resistencia a todos los aminoglucósidos utilizados en la clínica, incluidos gentamicina, tobramicina y amikacina (39). En el artículo de Gordon y Wareman en el 2010, hace referencia, que los miembros de la familia Rmt no se habían encontrado en *Acinetobacter baumannii*, sin embargo, en nuestro estudio encontramos una banda en PCR punto final del peso molecular esperado para el gen de resistencia RmtB, con lo que concluiríamos que aunado a la presencia del gen Aph3L, los aminoglucósidos quedarían

descartados como opción terapéutica para el tratamiento de esta cepa en particular.

La resistencia a tetraciclinas y sus derivados puede deberse a bombas de eflujo o protección ribosomal. Para el caso particular de la cepa analizada se encontraron los genes TetA y TetB, ambos ya habían sido descritos con anterioridad en las cepas de *Acinetobacter*, estos genes codifican para bombas de eflujo específicas para tetraciclina. Tet A confiere resistencia a tetraciclina, pero no a minociclina, en cambio, TetB, confiere resistencia tanto a tetraciclina y minociclina (39), (46). También se encontró en esta cepa el gen TetM, el cual debe su mecanismo de resistencia a la protección ribosomal, este gen ha sido poco encontrado en *Acinetobacter*, (39), sin embargo, en la cepa analizada fue encontrado. Con la presencia de estos tres genes en la cepa analizada podemos concluir que tampoco las Tetraciclinas serían una buena opción terapéutica para el tratamiento de este microorganismo en particular.

Las quinolonas son agentes bactericidas de amplio espectro y son consideradas alternativas viables para el tratamiento de infecciones causadas por *Acinetobacter baumannii*, sin embargo la resistencia a estos antibióticos continúa incrementando (47).

En la cepa analizada se encontraron genes de resistencia a quinolonas, algunas modificaciones en la DNA girasa a través de modificaciones en el gen *gyrA* confiere resistencia a quinolonas y este mecanismo ya ha sido descrito con anterioridad en *Acinetobacter baumannii* (39), (46).

La resistencia a quinolonas también puede ser mediada por plásmidos que poseen genes *Qnr*, los cuales codifican una proteína de bloques de pentapéptidos repetidos que bloquean el sitio de acción de la ciprofloxacina en la DNA girasa bacteriana y en la topoisomerasa IV (47). En este caso en particular se encontraron dos genes que codifican para proteínas *Qnr*, los cuales fueron *QnrD* y *QnrS*. A pesar de que estas proteínas por sí mismas solo producen un bajo nivel de resistencia, su presencia facilita la selección de una resistencia de mayor nivel por mutaciones (48),

La proteínas *Qnr* fueron descritas inicialmente en *Klebsiella pneumoniae* y no habían sido descritas en *Acinetobacter* anteriormente (47). No es de sorprenderse encontrarlo ahora en una cepa de *Acinetobacter*, debido principalmente a que es un mecanismo que está codificado en plásmidos y

estos están implicados en la transferencia horizontal de genes, en este caso de manera promiscua “entre diferentes especies”. Como se puede apreciar en este caso, la presencia simultánea de otro mecanismo de resistencia debida a mutaciones (*gyrA*) en la misma cepa, evidencia que la resistencia de un microorganismo a un grupo antibiótico se puede deber a diversos mecanismos de resistencia, no relacionados entre sí.

Para el caso de sulfonamidas, la prevalencia de resistencia a trimetopim con sulfametoxazol es alta en diversas regiones geográficas (38). Las sulfonamidas actúan como un análogo estructural del ácido p-amino-benzoico y se unen a la enzima dihidropteroato sintasa, la enzima catalítica en la biosíntesis del ácido fólico, lo que resulta en una inhibición de la formación del ácido dihidrofólico. La resistencia es conferida por la adquisición de enzimas dihidropteroato sintasa alternativas, codificadas en los genes *sul* (49).

Genes de resistencia en *Enterococcus* sp

En este trabajo se encontró que *Enterococcus faecalis* presenta genes de resistencia a antibióticos como son β -lactamasas entre ellas fueron (BlaOXA, BlaIMP, BlakPC, BlaCT, BlaCMV y BlaBIL), estreptograminas (Vat, Vgb y Sat), Quinolonas (Qnr, GyrI, GyrB), aminoglucosidos (CcrA, Aph3L, RmtB y RmtC), tetraciclinas (TetA, TetB, TetC, TetD y TetM), macrólidos (AmeF) y sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*).

Enterococcus faecium presentó los genes de resistencia a beta-lactámicos (BlaOXA, BlasHV, BlaTEM, BlaIMP, BlakPC, BlaCTX, BlaDHa, BlaBIL), aminoglucósidos (CcrA, Aph3L, RmtB), macrólidos (AmeF, MefB, ErmA, ErmB), Vancomicina (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE), tetraciclinas (TetA, TetC, TetD, TetM), quinolonas (GyrA, GyrB, ParC, Gep).

Enterococcus gallinarum se encontraron los genes de resistencia para betalactámicos (BlaSHV, BlaIMP), aminoglucósidos (CcrA, Aph3L, RmtA, RmtD), vancomicina (van A), tetraciclinas (TetA, TetB, TetC, tetM) y quinolonas (GyrA).

Enterococcus ha emergido como importante patógeno nosocomial, otros reportes han estudiado genes de resistencia a antibióticos (Bender et al., 2009), siendo la especie mas frecuente (93.6%) seguido por *E. faecium* (4.4%), el perfil de resistencia antimicrobial fue a ampicilina, vancomicina, teicoplanina,

clorafenicol, nitrofurantoina, eritromicina a tetraciclina, rifampicina, ciprofloacin y quinupristin-dalfopristin, siendo *Enterococcus* el patógeno más frecuente en intra e inter-hospitales (Bender et al., 2009).

Un estudio realizado en Estados Unidos sobre genes de resistencia antimicrobiales en *Enterococcus* y *Staphylococcus* negativos a coagulasa mostraron que los más comunes fueron *E. hirae* (46%), *E. faecium* (27%), *E. gallinarum* (12%), y *E. faecalis* (10%). La resistencia observada fue para tetraciclina (96%), seguida de clindamicina (90%), quinupristina–dalfopristina (62%), penicilina (53%), eritromicina (50%), nitrofurantoina (49%), y claritromicina (48%) (Simjee et al., 2007). Los genes de resistencia VatD y ErmB fueron presentes en enterococos (Sinjee et al.,).

La terapia antimicrobial óptima para infecciones enterococcus requiere del uso de combinaciones sinérgicas de agentes activos a la pared, tales como penicilina o un glicopéptido, aminoglicósidos (Chow, 2000).

El gen de resistencia antimicrobial BlakPC fue el más frecuente encontrado en varias cepas bacterianas, tales como: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. Epidermidis*, *S. Haemolyticus*. En este trabajo no se encontró este gen en *Klebsilla pneumoniae*, pero si ha sido reportado en *Pseudomonas aeruginosa* (BlaCTX y BlaSPM) y *Acinetobacter baumannii* en pacientes (Vala et al., 2014). *Enterococcus faecalis* y *E. Faecium* presenta resistencia a vancomicina, y es adquirida principalmente en los hospitales, además, *E. Gallinarum* y *E. Casseliflavus* son adquiridos en la comunidad (Rubinstein y Keynan, 2013).

Estreptograminas son potentes medicamentos contra numerosos patógenos resistentes, son activas contra muchas bacterias Gram positivas, incluyendo *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus faecium*, de Gram negativas se ha reportado a *Haemophilus*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella* y *Neisseria*. Sin embargo en este trabajo se encontraron cepas de *E. Faecalis* y *E. Faecium* poseen genes de resistencia a estreptograminas.

Las quinolonas son potentes agentes antimicrobiales que actúan sobre enzimas bacterianas como son DNA girasa y topoisomerasa IV. Las mutaciones ocurren en la región determinante a resistencia a quinolonas. En organismos Gram positivos, las mutaciones ocurren más en la topoisomerasa IV que en la DNA girasa (Schmitz et al., 2002). Se ha encontrado mutaciones

más frecuente en GyrA que GyrB, *Escherichia coli* presenta mutaciones en GyrA. Para *Enterococcus Faecalis* y *E. Faecium* se ha reportado cambios de aminoácidos en GyrA, ParC/GrlA, así como para *Streptococcus pneumoniae*, y *Staphylococcus aureus* (Shmitz et al., 2002).

Enterococcus ha adquirido genes de resistencia a aminoglicósidos que codifica enzimas que modifican aminoglicósidos, causando la resistencia. Los genes de resistencia reportados son Aac, Aph, Ant, el cual muestran resistencia a gentamicina, tobramicina, amikacina, kanamicina, dibekacina, estreptomina y Arbekacina (Chow, 2000).

La resistencia a los glucopéptidos en enterococo son dos: 1) resistencia intrínseca: en especies *Enterococcus gallinarum* (gen vanC1), *Enterococcus casseliflavus* (gen vanC2) y *Enterococcus flavescens* (gen vanC3). Se caracterizan por tener baja sensibilidad a vancomicina, los genes son localizados en el cromosoma bacteriano y no son transferibles. 2) resistencia adquirida: se han descrito 8 fenotipos diferentes (VanA, VanB, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM y VanN) mediados por los operones de genes de resistencia vanA, vanB, vanD, vanE, vanG, vanL, vanM y vanN, respectivamente. Los fenotipos VanA y VanB son los más frecuentes, mientras que VanD, VanE, VanG, VanL, VanM y VanN son infrecuentes y no se han detectado hasta la fecha en España (17,25–28 Morosini et al., 2012). En *E. Gallinarum*, tres enzimas son suficientes para resistencia a vancomicina: El gen vanC1 ligasa para producción de D-Ala-D-Ser ligasa, proteína VanXYc para la hidrólisis de D-Ala-D-Ala y para remover de D-Ala de UDP-Mur-Nac-pentapéptido unido en D-Ala y VanT para síntesis de D-serina (13, Patel). VanD es disitinto de VanA y VanB, aunque este asociado con la síntesis del desipéptido D-Ala-D-Lac, no es transferible (16,17, Patel 1999). VanE ha sido descrito en *E. Faecalis* y es asociado con un probable ligasa D-Ala:D-Ser.

El gen de resistencia a tetraciclina tetA es el más encontrado en otras cepas como son *Clostridium perfringens*, el cual es un habitante normal del tracto gastrointestinal, el cual presenta resistencia a varios tipos de antibióticos, el cual se propone que dona los genes a *Enterococcus*. El 68% de enterococos aislados fueron resistentes a tetraciclinas. Los alelos de gen de resistencia únicos (definidos por la secuencia de nucleótidos fueron presentes en múltiple especies. Las cepas mostraron combinaciones de genes de resistencia a

tetraciclinas, los genes encontrados fueron tetM, tetL, TetB, tetC, TetS, tetH, tete, tetA, rumB (Stine et al., 2007).

La prevalencia reportada para los genes de resistencia a macrólidos, como tcrB fue del 14.3% (372/2592). Entre las cepas aisladas fueron *Enterococcus faecium* y *E. Faecalis* (Amachawadi et al., 2015).

La resistencia a sulfonamida se ha reportado en *Psychrobacter*, *Enterococcus* y *Bacillus spp.*, para *Enterococcus* encontraron sul2 y sul3 (Byrne-Bailey et al., 2009). El gen sulf1 es encontrado unido a genes de resistencia en integrones de clase 1 y en plásmidos grandes conjugativos (25, Shin 2015), mientras que sulf2 es usualmente localizado en plásmidos pequeños no conjugativos (21, Shin et al., 2015), plásmidos grandes transmisibles multiresistentes (9, Shin 2015) o a través de elementos de regiones comunes de elemento de inserción (ISCR2) (24, Shin 2015). Esta cepa ha mostrado resistencia con alto nivel para glicopéptidos vanC1 y vanA en Argentina (Togneri et al., 2003).

Genes de resistencia en *Klebsiella sp*

Klebsiella pneumonia se encontraron los genes para β -lactamasas (BlaOXA, BlaSHV, BlaCTX, BlaBIL), aminoglucósidos (CcrA, Aph3L, RmtB), macrólidos (AmeF, MefB, ErmA, ErmB), quinolonas (GrlA, GyrA, GyrB, ParC).

Klebsiella oxytoca se encontraron solo los genes de resistencia β -lactamasas (BlaOXA, BlaTEM, BlaROB).

K. pneumoniae es responsable de infecciones humanas en un 70%, en tractogastrointestinal, piel y nasofaríngeo, causando pneumonias necrozantes, abscesos hepáticos piogénicos. *K. Pneumoniae* ha mostrado resistencia cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (9-11, Pitout et al., 2015). Los mecanismos de resistencia lactamasas-AmpC mediado por plásmidos especialmente (CMY), ESBLs (especialmente CTX-M-15), diferentes carbapenemasas (p.e. OXA-48, VIM, and KPC), 16 rRNA metiltransferasas, quinolonas, estereasas modificando macrólidos y enzimas modificantes de rifampina. El cual se ha estudiado a los genes de MBLs, IMP, VIM, KPC, OXA (Pitout et al., 2015). OXA-48 hidroliza eficientemente las β -lactámicos tales como penicilina y cefalosporinas de amplio espectro (26, Pitout). *Klebsiella pneumoniae*: desarrollo Resistencia a Carbapenemo debido a la adquisición

de blaNDM-1 durante la terapia antimicrobial en infantes con Pneumonia. (Zhu J et al., 2015),

Los estudios han mostrado que *K. Pneumoniae* tiene resistencia a sulf1, sulf2, sulf1+sulf2 y sulf3 (Shin et al., 2015).

Klebsiella oxytoca se ha encontrado en bacteremia en pacientes con enfermedades pancreáticas o biliares. El tracto biliar fue el sitio más común de infección, la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro (kim et al., 2002). Un estudio en septicemia neonatal encontraron que *K. pneumoniae*, 18 (46.2%), *K. aerogenes*, 17 (43.6%), *K. edwardsii*, 3 (7.7%), y *K. oxytoca*, 1(2.5%). Todas las cepas fueron sensibles a ciprofloxacina y ofloxacina, pero resistente a ampicilina (Akindele et al., 1997).

Genes de resistencia en *Staphylococcus* sp

El fenotipo de resistencia a la penicilina mediado por betalactamasas en estafilococo implica resistencia a todas las penicilinas excepto a las isoxazolilpenicilinas: oxacilina, metacilina, cloxacilina y nafcilina. La resistencia a la metacilina se debe a la adquisición del gen *mecA* que codifica la proteína fijadora de penicilina (PBP), que posee baja afinidad por todos los betalactámicos a excepción de cefalosporina ceftarolina y de la carbapenema razupenem. El género *Staphylococcus* posee enzimas inactivadoras de aminoglucósidos como son AAC(6'), APH(2''), APH(3')-III, ANT(4')-(4''), ANT(6), ANT(6) + APH(3'')-III (Morosini et al., 2012).

Staphylococcus aureus se ha reportado que posee resistencia a vancomicina, este es un antibiótico glicopeptídico para el uso de infecciones de bacterias Gram positivas. También se encontró que posee mutaciones en diferentes aminoácidos en GyrA y ParC. Algunas bacterias Gram positivas tienen un segundo mecanismo de resistencia que es a través de exflujo de drogas por la sobreexpresión de bombas de exflujo, por ejemplo fluoroquinolonas, bromuro de etidio, cloranfenicol, tetrafenilfosfonio y rodamina 6G. Se ha reportado que *S. Aureus* adquiere la mutación en el gen *norA* posición 209, cambia adenosina a citosina, el cual transfiere la resistencia para quinolonas (Schmitz et al., 2002)

Las infecciones nosocomiales de Gram positivo en pacientes hematológicos o oncológicos, *S. Aureus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*.

Acitobacter spp ha mostrado tener genes de resistencia a sulf1, sulf2 y sulf1+sulf2 (Shin et al., 2015).

Genes de resistencia en Staphylococcus epidermidis

Los genes de resistencia encontrados en Staphylococcus epidermidis fueron: β -lactamasas (BlaOXA, BlaVIM, BlaTEM, BlaKPC, BlaCTX, BlaCMV, BlaDHA, BlaP y BlaBIL), aminoglucósidos (CcrA, CcrB, Aph3L, RmtB y RmtC), macrólidos (Amef, ErmA, ErmB y Msr), tetraciclinas (TetA y TetM), quinolonas (QnrS, Grl, GyrA, GyrB y ParC) y sulfonamidas (Sul1 y Sul 2).

Tetraciclinas

La tetraciclina y minociclina inhiben la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad 30S ribosomal, evitando la asociación del aminoacil-RNAt con un sitio aceptor. Hay dos mecanismos de resistencia a tetraciclinas que han sido identificados en el caso de Staphylococcus aureus, vía eflujo activo por los genes *tetA(K)* y *tetA(L)*, y por protección ribosomal por *tetA(M)*.

Genes de resistencia en Staphylococcus haemolyticus

Los genes de resistencia encontrados en Staphylococcus haemolyticus fueron: β -lactamasas (BlaOXA, BlaIMP, BlaROB, BlaKPC, BlaCTX, BlaCMV, BlaDHA, BlaP y BlaBIL), aminoglucósidos (CcrA, Aph3L, RmtA y RmtB), macrólidos (Amef, ErmA, ErmB y Msr), tetraciclinas (TetC, TetD y TetM) y quinolonas (QnrA, QnrC, QnrD, QnrS, GyrA, GyrB y ParC).

Genes de resistencia en Staphylococcus aureus

Los genes de resistencia encontrados en Staphylococcus aureus fueron: β -lactamasas (BlaTEM, BlaROB, BlaKPC, BlaCTX, BlaP y BlaBIL), aminoglucósidos (CcrA, Aph3L, y RmtC), macrólidos (Amef, ErmA, ErmB, Ere y Msr), y quinolonas (QnrB, Grl, GyrA, GyrB, ParC y Gep).

Staphylococcus aureus es de las especies más invasivas, causante de infecciones crónicas y agudas. Las especies estafilocócicas son patógenos

oportunistas, que a pesar de ser menos invasivas, ha incrementado su asociación con infecciones graves (50).

Resistencia a B-lactámicos

Staphylococcus aureus ha sido un verdadero reto para la terapia antimicrobiana, esta bacteria tiene una gran habilidad para superar los tratamientos antibióticos a través de la adquisición de determinantes de resistencia, anterior a la era antibiótica la mortalidad por *S. aureus* excedía el 80%, en 1940 con el advenimiento de la penicilina mejoró el pronóstico de las infecciones, ya que más del 94% de las cepas eran sensibles a la penicilina, sin embargo esta situación no perduró, para 1950 el 50% de las cepas eran resistentes a penicilina. En 1959 se introdujo una penicilina semisintética con la finalidad de evadir la acción de las β -lactamasas, sin embargo, muy poco después se reportó una cepa resistente a meticilina.

S. aureus posee dos mecanismos de resistencia a los β -lactámicos, primordialmente: Uno debido a la expresión de B-lactamasas; y el segundo que confiere resistencia a B-lactámicos de alto nivel, debido a la adquisición de genes *Mec* que codifican para una proteína de unión a penicilina alterna (PBP2; Penicillin Binding Protein 2, por sus siglas en inglés). (51), (52). En el caso de las 7 cepas de *Staphylococcus aureus* analizadas en este trabajo y que presentaban fenotipo de resistencia a B-lactámicos, se encontraron los siguientes genes que codifican para diversas B-lactamasas: *BlaTEM*, *BlaROB*, *BlaKPC*, *BlaCTX*, *BlaP* y *BlaBIL*.

En ninguna de estas se encontró algún gen que codificase para la producción de proteínas de unión a penicilinas PBP2, dentro de los genes incluidos en esta plataforma: *MecA*, *MecB*, *MecI* y *MecR*.

Los aminoglucósidos inhiben la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad 30S ribosomal, interrumpiendo la translocación de peptidil-RNAt, pero el mecanismo exacto por el cual estos antibióticos actúan sobre las bacterias no es claro y se ha atribuido al bloqueo de la síntesis de proteínas, a errores en la lectura del RNAm, o a provocar desorganización en la membrana citoplasmática.

El mecanismo de resistencia a aminoglucósidos más ampliamente distribuido es la modificación enzimática del antibiótico, a través de acetiltransferasas,

adenociltransferasas, nucleotidiltransferasas o fosfotransferasas. Una vez modificados estos antibióticos, no se pueden unir a los ribosomas, por lo tanto, no pueden inhibir la síntesis proteica bacteriana (50).

Los macrólidos son antibióticos ampliamente utilizados en las infecciones staphylococicas, y la resistencia a los mismos es también prevalente entre este grupo de microorganismos (53).

Los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas secuestran la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, lo que causa una disociación del peptidil-RNAt durante la elongación. La resistencia cruzada a estos antibióticos está codificada en parte por los genes *erm* (erythromycin ribosome methylation; por sus siglas en inglés) (54).

Los genes *ErmA*, *ErmB* y *ErmC* son determinantes que confieren resistencia al grupo MLS (Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas). Esta resistencia puede ser inducible o constitutiva (53). Este tipo de resistencia se debe a una dimetilación-N6 de un residuo de adenina en la unidad 23S RNAr, lo que ocasiona una reducción de la afinidad del antibiótico (50).

El gen *Msr* fue inicialmente identificado en *S. epidermidis* y confiere resistencia a macrólidos y estreptograminas, a través de bombas de eflujo. (53). En el estudio de Gerard Lina y colaboradores, en el año de 1995 en Francia, donde se buscaron los determinantes de resistencia a macrólidos lincosamidas y estreptograminas mediante PCR se encontró que de las 294 cepas con resistencia fenotípica a MLS (Meticilina, Lincosamida y Estreptograminas) el 88% contenía uno o más genes *Erm*, en los resultados obtenidos en este estudio, las dos cepas analizadas de *Staphylococcus aureus* presentaban tanto los genes *ErmA* y *ErmB*, el mismo resultado se pudo observar en las 2 de las 3 cepas analizadas de *Staphylococcus epidermidis*, ya que una de estas no presentó ningún gen *Erm*, la cepa analizada de *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus saprophyticus* también presentaron simultáneamente los genes *ErmA* y *ErmB*. En el estudio de Gerard Lina y colaboradores, el gen más predominantemente encontrado fue el gen *ErmA*, presente en el 63% de las cepas analizadas de *Staphylococcus aureus*, este gen se encontró en el 18% de las cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativas, y en el caso de *ErmB*. Como se puede ver en una misma cepa se pueden presentar combinaciones de los genes *Erm*, dando como resultado un

fenotipo de resistencia Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas.

En el estudio de Otsula y colaboradores, en el 2007, en donde se buscaron los fenotipos y genotipos de resistencia al grupo MLS en aislados de *Staphylococcus aureus* en Japón, la mayoría de las cepas resistente a eritromicina, a su vez susceptible a clindamicina (incluyendo cepas meticilino resistente y sensible) que tuvieron un fenotipo inducible de resistencia al grupo MLS, se les encontró el gen *erm*, esto se encontró en 97.2% de los 249 aislados; mientras que las 7 cepas restantes, el 2.8% de los aislados albergaban los genes *msr*. En el caso de nuestro estudio, donde se analizaron dos cepas de *S. aureus* con fenotipo de resistencia a macrólidos, se encontró en ambas los genes *ErmA*, *ErmB* y únicamente en una de ellas se encontró el gen *Ere*, cabe mencionar que las dos cepas analizadas eran meticilino sensibles, ya que a ninguna de éstas se le encontró ninguno de los genes que codifican para proteínas de unión a penicilina alternas (PBP2). El artículo de Otsula en 2007, así como el de Gerard Lina en 1999, mencionan que los determinantes de resistencia Erm predominan en cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes, sin embargo, en el caso de las cepas analizadas, se encontraron ambos determinantes, aún en ausencia de la resistencia a metililina.

Otros determinantes que codifican resistencia al grupo MLS en *Staphylococcus* es el gen *Msr*, el cual confiere resistencia a Eritromicina pero a estreptogramina tipo B, no (53).

Otro mecanismo de resistencia al grupo de fármacos MSL, se da a través de los genes *ere*, los cuales producen modificación enzimática del antibiótico, y han sido descritos con anterioridad en *Staphylococcus aureus* (54), estas enzimas hidrolizan en anillo lactona del núcleo macrocíclico (55).

Las quinolonas son antibióticos con espectro de acción sobre gram negativos y se utilizan también para tratar infecciones causadas por pneumococo y staphylococcus. La resistencia de *Staphylococcus aureus* a las quinolonas emergió rápidamente, en cepas resistentes a metililina, motivo por el cual la habilidad de las fluoroquinolonas como agentes antiestafilococos se redujo considerablemente. La resistencia a quinolonas se da como consecuencia de mutaciones cromosomales espontáneas en el sitio blanco de acción en la topoisomerasa IV y la DNA girasa, o debido a bombas de eflujo,

para el caso de las bombas de eflujo, estas pueden aumentar el nivel de resistencia si a la vez se encuentran con otros mecanismos de resistencia debido a mutaciones, sin embargo, por sí solas solo confieren un bajo nivel de resistencia a quinolonas (52).

Genes de resistencia en *Staphylococcus saprophyticus*

Los genes de resistencia encontrados en *Staphylococcus saprophyticus* fueron: β -lactamasas (BlaIMP, BlaCTX, BlaDHA y BlaP), macrólidos (AmeF, ErmA, ErmB y Msr) y tetraciclinas (TetM).

Staphylococcus saprophyticus está singularmente asociado con infecciones del tracto urinario en humanos, principalmente en mujeres jóvenes, es la segunda causa más frecuente después de *E. coli*. Las complicaciones más severas causadas por este microorganismo incluyen pielonefritis, septicemia, nefrolitiasis y endocarditis (56).

En *S. saprophyticus* el principal mecanismo de resistencia a B-lactámicos es la producción de una proteína de unión a penicilina con muy baja afinidad a los B-lactámicos PBP2a, sin embargo también se ha descrito presencia de B-lactamasas en estas cepas. El gen que codifica para PBP2a (*mecA*), con sus genes regulatorios se encuentran en un elemento genético móvil. Las cepas que contienen sólo este gen como mecanismo de resistencia a B-lactámicos son más susceptibles, debido a que no contienen otros determinantes de resistencia. A pesar que la resistencia mediada por *mecA* se encuentra intrínsecamente expresada en la población resistente, el gen podría expresarse en un pequeño porcentaje de estas debido a los resultados impares con las pruebas de detección de resistencia, a este fenómeno se le conoce como “resistencia heterogenea”. (57).

Se ha descrito resistencia a meticilina en especies que no poseen el gen *mecA*, fenómeno que se denomina resistencia en el límite, este fenómeno puede deberse a sobreproducción de B-lactamasas o a la producción de preteínas modificadas de unión a penicilina distintas a las producidas por el gen *mecA* (57).

La importancia de determinar estos casos de susceptibilidad a los B-lactámicos por parte de *S. saprophyticus* es que su incorrecta interpretación podría derivar en un uso innecesario de antibióticos de amplio espectro lo que

contribuiría en la selección de cepas resistentes (57).

En el artículo de Orden-Martínez y colaboradores en 2007, España, donde se hizo un estudio longitudinal retrospectivo de los urocultivos procesados en el Centro de Especialidades Arguelles durante 10 años, encontraron que de 35,136 urocultivos con recuento significativo, se identificaron 331 *S. saprophyticus*, de los cuales 324 fueron aislados de mujeres. De estos un elevado porcentaje (37.7% presentaron resistencia a eritromicina (macrólido), de estos el 96% poseía un fenotipo de resistencia macrólido-estreptogramina, únicamente un 1.5% de estos también fue resistente a clindamicina (lincosamida) (58). En el caso de la cepa de *S. saprophyticus* analizada para este estudio, encontramos los genes Amef, ErmA, ErmB y Msr, como responsables de la resistencia a macrólidos.

Las tetraciclinas son agentes bacteriostáticos con un amplio rango de acción sobre gram positivos y gram negativos. Son altamente efectivos en contra de rickettsias, spiroquetas, leptospira y *treponema pallidum*. La prevalencia de resistencia entre los cocos gram positivos y los bacilos gram negativos es muy alta en muchas partes del mundo y no se recomiendan para estos sin antes hacer las pruebas de susceptibilidad a antibióticos. A pesar de que no se recomienda el uso de las tetraciclinas en niños menores de 8 años, el BNF C 2006 (British National Formulary for Children) lista a la tetraciclinas para uso en niños mayores de 12 años, este grupo antibiótico puede utilizarse en niños solamente cuando otros fármacos tienen altas probabilidades de no ser efectivos y cuando los beneficios claramente superan los riesgos (decoloración de los dientes) (59). En el caso de la cepa analizada de *Staphylococcus saprophyticus* se encontró al gen *TetM* como el responsable del fenotipo de resistencia a tetraciclinas, el cual confiere protección al ribosoma bacteriano e impide la unión del fármaco para que este ejerza su acción antibiótica. El poder evidenciar rápidamente este gen en una cepa que fuese responsable de un caso séptico, nos permitiría descartarlo de las opciones terapéuticas y con ello evitar las reacciones adversas y los efectos colaterales de este grupo antibiótico sobre el paciente.

Genes de resistencia en *Streptococcus agalactiae*

Los genes de resistencia encontrados en *Streptococcus agalactie* fueron: Macrólidos (Ame^f), tetraciclinas (TetA, TetB, TetD y TetM) y quinolonas (QnrS y GyrA).

El *Streptococcus agalactie* es causa significativa de morbilidad y mortalidad en neonatos y también pueden ser causa de infecciones graves en adultos (60), desde los años 70's el estroptococo del grupo B o *Streptococcus agalactie* ha sido considerado como una causa primordial de infecciones perinatales (61).

Este microorganismo es parte de la flora normal del intestino y del tracto genital, con lo cual se encuentra colonizando del 10-40% de las mujeres embarazadas. Por lo cual, en neonatos es causa de sepsis neonatal, neumonía y meningitis. La transmisión materno infantil se da por la ruta ascendente del tracto genital materno hacia el fluido amniótico y es causa de sepsis de inicio temprano, cuando ocurre dentro de los primeros 6 días de nacido y sepsis de inicio tardío cuando ocurre entre los 7 y 90 posteriores al nacimiento (62), (63).

Este microorganismo tiene importantes consecuencias en la salud pública, debido a que puede causar daños neurológicos en recién nacidos (64).

La penicilina y la ampicilina son los antibióticos de elección, siguiendo con las cefalosporinas de primera generación y vancomicina. No se ha reportado Resistencia a penicilina, excepto algunos casos con sensibilidad intermedia o aumento de la concentración mínima inhibitoria a penicilina. Hay tratamientos antibióticos alternativos destinados a pacientes alérgicos, en este caso son los macrólidos y las lincosamidas. La vancomicina se reserva para mujeres alérgicas a penicilina con riesgo de anafilaxis. (62). La cepa analizada en este trabajo no presentó fenotipo de resistencia a β -lactámicos, motivo por el cual no se realizó la búsqueda de genes que codificasen B-lactamasas.

La resistencia a eritromicina (macrólido) se da principalmente por los genes *erm* que codifican modificación ribosomal; o a través de bombas de eflujo mediadas por los genes *mefA* el cual confiere resistencia a 14 ó 15 miembros de entre los macrólidos (62). Al buscar los genes que confiriesen resistencia a macrólidos, se encontró el gen *Ame^f* como el responsable de ese fenotipo.

Se ha reportado que en el ambiente más del 13% de las cepas de

Streptococcus agalactie son resistentes a los macrólidos. La mayoría de estas cepas presenta un fenotipo de resistencia al grupo MLS, principalmente debido la presencia de genes *erm*, otro 2.7% de estas cepas presenta fenotipo de resistencia a macrólidos debido al gen *mefA*, el cual causa expulsión por bombas de eflujo. Estos datos obligan a considerar la susceptibilidad a los macrólidos y las lincosamidas en cada cepa individual antes de la administración de estos antibióticos (65). En el caso particular de los pacientes neonatales comprometidos con una infección con dicho patógeno, el tiempo es limitante y no se puede esperar a la obtención de las pruebas de sensibilidad a antibióticos convencionales para poder implementar un tratamiento.

En artículo hecho por John Y. Bolukaoto en el 2015 en Sudáfrica, donde se buscaron genes de resistencia en *Streptococcus agalactie* aisladas de mujeres embarazadas, se encontró que el 94.5% de un total de 128 cepas aisladas, presentaban un fenotipo de resistencia a tetraciclinas (62). La cepa analizada en este trabajo presentaba fenotipo de resistencia a tetraciclinas y el genotipo recaía en más de un determinante genético, que en este caso fueron los genes TetA, TetB, TetD y TetM.

Los mecanismos de resistencia a tetraciclinas pueden darse a través de dos mecanismos, uno que codifica para mecanismos de eflujo y el siguiente que protege al ribosoma de la acción de las tetraciclinas, caso particular del gen *tetM*. Estos genes de resistencia pueden hallarse en elementos genéticos móviles, que a su vez contienen genes de resistencia a macrólidos (66). Este podría ser el caso de la cepa analizada en este estudio, que posee resistencia tanto a tetraciclinas como a macrólidos.

La presencia de más de un determinante de resistencia a tetraciclinas, podría deberse a un amplio e indiscriminado uso de estos antibióticos en todo el mundo (62).

La incidencia de este microorganismo ha descendido inversamente proporcional al uso de la profilaxis intraparto con penicilina G, este fenómeno podría suponer un aumento en la incidencia de cepas resistentes, sin embargo este fenómeno no se ha suscitado (65), este caso es aislado hablando con respecto del comportamiento que muestran en su mayoría los microorganismos frente a los antibióticos, donde la incidencia de la resistencia tiende a aumentar conforme se incrementa el uso del antibiótico.

La resistencia a las fluoroquinolonas ha emergido en diferentes cepas de *Streptococcus spp.* principalmente debido a mecanismos de eflujo o mutaciones en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (QRDRs; quinolone resistance-determining regions, por sus siglas en inglés), de los genes que codifican a la DNA girasa (*gyrA/gyrB*) y la topoisomerasa IV (*parC/parE*) (67).

Las mutaciones en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (*gyr*) son el principal blanco que medía la resistencia a fluoroquinolonas en bacterias gram negativas, mientras que en las gram positivas el gen *ParC* es el principal blanco, lo que substancialmente incrementa la probabilidad de una segunda mutación en el gen *gyrA*, dando como resultado una resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas (67). En la cepa analizada, observamos en una misma cepa dos mecanismos diferentes de resistencia al mismo grupo antibiótico, el gen *gyrA*, de mutaciones en la DNA girasa, y el gen *QnrS*, que codifica proteínas bloqueantes del sitio de acción de la ciprofloxacina, lo que nos podría sugerir resistencia de alto nivel a estos antibióticos, con lo que nos dejaría descartada la posibilidad de emplear cualquiera de estos antibióticos para el tratamiento de la misma.

Con esto podemos confirmar el apropiado uso de la penicilina como antibiótico de elección en el tratamiento de *Streptococcus agalactie*. Lo preocupante en este caso es el aumento en el reporte de resistencia a macrólidos y lincosamidas (clindamicina) los cuales son fármacos alternativos en el caso de pacientes con hipersensibilidad a la penicilina (62).

La Resistencia antimicrobiana se asocia con el cambio perpetuo y la alta flexibilidad del genoma bacteriano que bajo presión se mueve inexorablemente a mejores mecanismos más perfeccionados.

(51)

La evolución del incremento de la resistencia antimicrobiana en las especies bacterianas se debe a múltiples factores que incluyen la diseminación y muchas veces el uso inapropiado de los antimicrobianos, el uso extensivo de estos como promotores del crecimiento en la cría de animales y en increment regional e internacional de los viajes, lo que origina una relativa facilidad por la cual los microorganismos resistentes pueden atravesar las barreras

geográficas. (52)

Es evidente que la evolución de la multirresistencia es debida a la adquisición de genes de resistencia a antimicrobianos, los cuales se intercambian entre los organismos a través de la transferencia horizontal de genes, sin embargo, las mutaciones cromosomales es la catálisis de un nuevo determinante de resistencia, el cual ha ganado terreno con la introducción constante de antibióticos sintéticos (50).

Estos estudios muestran que existe una multirresistencia a antibioticos con determinantes geneticos compartidos en las cepas estudiadas. El estudio metagenómico mostró una mayor sensibilidad en la identificación de un microorganismo comparado con las pruebas bioquímicas convencionales realizadas por el equipo Vitek, aunados con los errores humanos en el aislamiento de los microorganismo, lo que llevaría a resultados dispares entre la identificación de bacterias Gram negativas o positivas. Por lo que, se propone que en el laboratorio de microbiología que se implemente que se realice una identificación adecuada del microorganismo y su pureza antes de usar el equipo Vitek. Una vez obtenido un correcto aislamiento nos facilitaria su identificación del microorganismo y una correspondencia con los datos obtenidos de la secuenciación y el estudio metagenómico.

Existe un método molecular comercial para la identificación de 3 marcadores de resistencia, el sepsis Seeplex de seegen pero que solo abarca 2 marcadores de resistencia a vancomicina (VanA y van B) y 1 para meticilina (mecA). Por lo que, esta propuesta proporciona un rango más amplio para identificar los genes de resistencia. Sin embargo, existen otros mecanismos de resistencia a antibióticos que no fue considerado en este estudio y que presentan una mayor variabilidad que podrían ser considerados en el futuro. Esta plataforma representa un apoyo para el manejo terapeutico de un paciente, la implementación de un tratamiento en particular es responsabilidad del médico quién considera los casos particulares de cada paciente.

Genes de resistencia en *Pseudomona aeruginosa*

Los genes de resistencia a *Pseudomona aeruginosa* fueron: β -lactamasas (BlaSHV, BlaIMP, BlaKPC, BlaCTX, BlaCMV, BlaDHA, BlaBIL),

aminoglucósidos (CcrA, Aph3L, RmtD), tetraciclina (TetA, TetB, TetC, TetD, TetM), quinolonas (QnrD, QnrS1, GyrA, GyrB, ParC, Gep), sulfonamidas (Sul1, 2 y 3), Trim (Dfr). *Pseudomonas aeruginosa* mostró solamente el gen de resistencia *sul1* (Shin et al., 2015).

Se ha reportado la presencia de genes *ampC* y *mexC* en *P. aeruginosa* en Tehran, Iran, y relación entre la presencia de gen *ampC* y resistencia a β -lactamasas. (Rezaei et al., 2016).

Se ha encontrado una alta Resistencia a tobramicina y amikacina, a través del gen AAC(6')-I y AAC(3)-II que fueron los más común AME y fue inferido a ser codificado en plásmido, mostrando resistencia a aminoglucósidos en *P. aeruginosa* en la India (Shahid et al., 2005). Los antibióticos el cual *P. aeruginosa* fue más sensible fueron amikacina y tetraciclina, pero mostró resistencia a gentamicina, ceftizoxima, carbenicilina, cefalotina y ceftazidima siendo la bacteria más común en pacientes quemados (Estahbanati et al., 2002).

CAPÍTULO 8. Conclusión

Con estos estudios encontramos la correlación del perfil fenotípico de resistencia con el genotípico, donde se encontró por lo menos un determinante genético de resistencia para dicho perfil. De esta forma se logró una plataforma en PCR punto final para la identificación de genes de resistencia a los antibióticos mayormente utilizados en la clínica.

CAPÍTULO 9. Perspectivas

1. Realizar más estudios para mejorar la identificación de los genes de resistencia en bacterias aislada de forma pura.
2. Terminar la secuenciación genómica de los microorganismo y analisis bioinformatico.
3. Escalamiento de la plataforma del antibiograma molecular en pacientes a partir de las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

1. *Managment of neonatal sepsis in term newborns*. **Du Pont-Thibodeau, Geneviève , Joyal, Jean-Sébastien y Lacroix, Jacques**. 67, Montreal, Canada : F1000 Prime REPORTS, 2014, Vol. 6.
2. *Surviving the fist hours in sepsis: getting the basic right (an intensivist's perspective)*. **Daniels, Ron**. 66, Birmingham : Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012.
3. *Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency deparment*. **Gaieski, David F., y otros**. 3, Washington, DC. : Critial Care Medicine, 2010, Vol. 38.
4. *A Systematic Review of the Methods Used to Assess the Association between Appropriate Antibiotic Therapy and Mortality in Bacteremic Patients*. **New York : Clinical Infectious Diseases**, 2007, Vol. 45.
5. *Improving the Diagnosis of Bloodsteam Infections: PCR Coupled with Mass Spectrometry*. **Jordana Lluch, Elena, y otros**. Barcelona, España : BioMed Research International, 2014.
6. **Juárez Juárez, Adalid y González Barrios, Juan Antonio**. Tesis "Diseño de oligonucleótidos para la identificación de genes de resistencia a antibióticos en bacterias multirresistentes causales de sepsis neonatal". México D.F. : s.n., 2014.
7. *Pathophysiology of Sepsis*. **Remick, Daniel G**. 2007, The American Journal pf Pathology, págs. 1435-1444.
8. *Sepsis Neonatal. Nuevas estrategias terapéuticas*. **Orfali, José Luis**. 2004, Revista Pediatría Electrónica, págs. 25-31.
9. *Definitions of bloodstream infection in the newborn*. **Haque, Khalid N**. 2005, Pediatric Critial Care Medicine, págs. 45-49.
10. *Sepsis neonatal*. **Coronell, Wilfrido, y otros**. 2009, Revista de enfermedades infecciosas en pediatría, págs. 57-68.
11. *Protocolo diagnóstico-terapéutico de la sepsis neonatal*. **Coto Cotallo, G.D. y Ibáñez Fernández, A**. 2006, Boletín de la Sociedad de Pediatría de Asturias, Cantabria, Castilla y León, págs. 125-134.
12. *International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics*. **Goldstein , Brahm, Giroir, Brett y Randolph, Adrienne**. 2005, Pediatric Critial Care Medicine.
13. *Neonatal sepsis: epidemiology and management*. **Baltimore, Robert S**. 2003, Therapy in Practice , págs. 723-740.
14. *Hospital-acquired neonatal infections in developing contries*. **Zaidi, Anita K.M., Huskings, Charles W. y Thaver, Durrane**. 2005, The Lancet, págs. 1175-1188.

15. *Neonatal sepsis: an international perspective*. Vergano, S., Sharland, M. y Kazembe, P. 2004, Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition, págs. 220-224.
16. *Neonatal and Perinatal Mortality*. WHO. 2006, WHO Library Cataloguing in Publication Data, pág. 8.
17. *Neonatal sepsis an old problem with new insights*. A. Shah, Birju y F. Padbury, James. 2014, Landes Bioscience, págs. 170-178.
18. *Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate*. S. Gerdes, Jeffrey. 2004, Pediatric Clinics of North America, págs. 939-959.
19. *Neonatal Infectious Diseases: Evaluation of Neonatal Sepsis*. Camacho González, Andrés, W. Sperman, Paul y J. Stoll, Barbara. 2013, Pediatric Clinics of North America, págs. 367-389.
20. *Hindsight judgement on ambiguous episodes of suspected infection in critically ill children: poor consensus amongst experts?* Fisher, Joachim E., Seifarth, Federico G. y Baezinger, Oskar. 2003, European Journal of Pediatrics, págs. 840-843.
21. *Multiple site blood cultures in the initial evaluation for neonatal sepsis during the first week of life*. Wiswell, T. E. y Hachey, W. E. 1991, Pediatric Infectious Disease Journal, págs. 365-369.
22. *Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate*. Gerdes, Jeffrey S. 2004, Pediatric Clinics of North America, págs. 939-959.
23. *Management of neonatal sepsis in term newborns*. Joyal, Jean Sébastien, Du Pont-Thibodeau, Geneviève y Lacroix, Jacques. 2014, F1000 Prime Reports.
24. Sosa, Aníbal de J. *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*. Boston : Springer, 2010.
25. *Penicillin-binding Proteins and the Future of B-Lactam Antibiotics*. Spratt, Brian G. 1983, Journal of General Microbiology, págs. 1247-1260.
26. Goodman, Louis S. y Gilman, Alfred. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. s.l. : Mc. Graw Hill, 2012.
27. Skold, Ola. *Antibiotics and Antibiotic Resistance*. New Jersey : Wiley, 2011.
28. *Function of Outer Membrane of Escherichia coli as a Permeability Barrier to Beta-Lactam Antibiotics*. Zimmermann, Willy y Rosselet, Armel. 1977, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, págs. 369-372.
29. *Tetracycline Resistance Mediated by Ribosomal Protection*. Taylor, Diane E. y Chau, Andrew. 1996, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, págs. 1-5.
30. *Study of Heterogeneity of Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) Genes in Streptococci and Enterococci by Polymerase Chain Reaction: Characterization of a New CAT Determinant*. Trieu-Cout, Patrick, de Céspedes, Gilda y Fairouze, Bentorcha. 1993, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, págs. 2593-2598.
31. *Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria*. Butaye, Patrick, Cloeckert, Axel y Schwarz, Stefan. 2003, International Journal of Antimicrobial Agents, págs. 205-210.

32. *Molecular Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-Modifyin Enzymes*. Shaw, K. J. y Rather, P. N. 1993, Microbiological Reviews, págs. 138-163.
33. *Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance: An Update 1994-1998*. Piddock, Laura J.V. 1998, Drugs, págs. 11-18.
34. *Mechanisms of fluoroquinolone resistance*. Cooper, David C. 1999, Drug Resistance Updates, págs. 38-55.
35. *Resistance to Glycopeptides in Enterococci*. Leclercq, Roland y Courvalin, Patrice. 1997, Clinical Infectious Diseases, págs. 545-556.
36. *Persistence of sulphonamide resistance in Escherichia coli in the UK despite national prescribing restriction*. Enne, Virve I, y otros. 2001, The Lancet, págs. 1325-1328.
37. *Multidrug resistance Acinetobacter*. Manchanda , Vikas, Sanchaita, Sinha y NP, Singh. 2010, Journal of Global Infectious Diseases, págs. 291-304.
38. *Acinetobacter baumannii: Emergence of a Successful Pathogen*. Peleg, Anton Y., Seifert, Harald y Paterson, David L. 2008, Clinical Microbiology Reviews , págs. 538-582.
39. *Acinetobacter baumannii: Emergence of a succesful pathogen*. Peleg, Anton Y., Seifert, Harald y Paterson, David L. 2008, Clinical Microbiology Reviews, págs. 538-582.
40. *Frequent Multidrug-Resistance Acinetobacter baumannii Contamination of Gloves, Gowns, and Hands of Healthcare Workers*. Morgan, Daniel J., Liang, Stephen Y. y Smith, Catherine. 2010, Infection Control & Hospital Epidemiology, págs. 716-721.
41. *Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatmen*. Sibhghatulla, Shaikh, Jamale, Fatima y Shakil, Shazi. 2015, Saudi Journal of Biological Sciences, págs. 90-101.
42. *Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology*. Poirel, L. y Nordmann, P. 2006, Clinical Microbiology Infection , págs. 826-836.
43. *Sequence Analysis and Evolutionary Perspectives of ROB-1 B-Lactamase*. Juteau, Jean Marc y Levesque, Roger C. 1990, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, págs. 1354-1359.
44. *Cloning and Sequence Analysis of blaBIL-1, a Plasmid Mediated Class C B-Lactamase Gene in Escherichia coli BS*. Fosberry, Andrew P., Payne, David J. y Lawlor, Elizabeth J. 1994, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, págs. 1182-1185.
45. *Prevalence of Aminoglycoside Resistance Genes in Acinetobacter baumannii Isolates*. Katayun, Aliakbarzade, Safar, Farajnia y Nik, Asheaf Karimi. 2014, Jundishapur Journal of Microbiology.

46. *Multidrug-resistance Acinetobacter baumannii: mechanisms of virulence and resistance*. Gordon, Nicola C. y Wareham, David W. 2010, International Journal of Antimicrobial Agents, págs. 219-226.
47. *A fluoroquinolone-resistant Acinetobacter baumannii without the quinolone resistance-determining region mutations*. Chopra, Sidharth y Galande, Amit. 2011, Journal of Antimicrobial Chemotherapy .
48. *Mechanisms of Resistance to Quinolones. Supplement Article*. Jacoby, George A. 2005, Clinical Infectious Diseases, págs. S120-S126.
49. *An investigation of drug-resistance Acinetobacter baumannii infections in a comprehensive hospital of East China*. Zhao, Su-ying, Jiang, Dong-yang y Xu, Peng-cheng. 2015, Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.
50. *Genetics of antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus*. Jensen, Slade O., Jensen, Slade O. y Lyon, Bruce R. 2009, Future Medicine, págs. 565-582.
51. *B-lactam resistance in Staphylococcus aureus: the adaptative resistance of plastic genome*. Fuda, C.C.S., Fisher, J.F. y Mobashery, S. 2005, Cellular and Molecular Life Sciences, págs. 2617-2633.
52. *Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus*. Franklin, Lowy. 2003, Science in Medicine, págs. 1265-1273.
53. *Distribution of Genes Encoding Resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins among Staphylococci*. Lina, Gerard, y otros. 1999, American Society for Microbiology, págs. 1062-1066.
54. *Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and genotypes among Staphylococcus aureus clinical isolates in Japan*. Otsuka, T., y otros. 2007, Clinical Microbiology Infection, págs. 325-327.
55. *Prevalence of macrolide-resistance genes in Staphylococcus aureus and Enterococcus faecium isolates from 24 European university hospitals*. Schmitz, Franz Josef, y otros. 2000, Journal of Microbiology Chemotherapy, págs. 891-894.
56. *Who are you - Staphylococcus saprophyticus?* Raz, Raul, Colodner, Raul y Kunin, Calvin M. 2005, Clinical Infectious Diseases, págs. 896-898.
57. *Oxacillin Resistance and Antimicrobial Susceptibility Profile of Staphylococcus saprophyticus and Other Staphylococci Isolated from Patient with Urinary Tract Infection*. Ferreira, Adriano M., y otros. 2012, Chemotherapy, págs. 482-491.
58. *¿Qué estamos aprendiendo de Staphylococcus saprophyticus?* Orden-Martínez, Beatriz, Martínez-Ruiz, Rocío y Millán-Pérez, Rosario. 2008, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, págs. 495-499.
59. *Tetracycline group in children*. WHO. 2008, Second Meeting of the Subcommittee of the Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines.
60. *Molecular Epidemiology of Macrolide Resistance in Neonatal Bloodstream Isolates of Group B Streptococci*. Diekema, Daniel J., Andrews, Janet I. y Huynh, Holly. 2003, Journal of Clinical Microbiology , págs. 2659-2661.

61. *Invasive Disease due to Group B Streptococcus in Pregnant Woman and Neonates from Diverse Populations Groups*. Zaleznik, Dori, y otros. 1999, *Clinical Infectious Diseases* , págs. 276-281.
62. *Antibiotic resistance of Streptococcus agalactiae isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa*. Bolukaoto, John Y., y otros. 2015, *BioMed Central Research Notes*.
63. *Serotype distribution, antimicrobial resistance, and molecular characterization of invasive group B Streptococcus isolates recovered from Chinese neonates*. Wang, Ping, y otros. 2015, *International Journal of Infectious Diseases*, págs. 115-118.
64. *Genetic Features of Streptococcus agalactiae Strains Causing Severe Neonatal Infections, as Revealed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and hylB Gene Analysis*. Rolland, Karine, y otros. 1999, *Journal of Clinical Microbiology*, págs. 1892-1898.
65. *Susceptibility of strains of Streptococcus agalactiae to macrolides and lincosamides patterns and resistance genes*. Aracil, B., y otros. 2002, *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, págs. 745-748.
66. *Macrolide and tetracycline resistance in clinical strains of Streptococcus agalactiae isolated in Tunisia*. Hraoui, M., y otros. 2012, *Journal of Medical Microbiology*, págs. 1109-1113.
67. *Emergence of Fluoroquinolone Resistance in Group B Streptococcus Isolates in Taiwan*. Hsiu-Mei, Wu, y otros. 2008, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* , págs. 1888-1890.
68. Sköld, M.D. *Antibiotics and Antibiotic Resistance*. United States of America : Wiley, 2011.
69. *Antibiotic resistance is ancient*. D'Costa, Vanessa M., y otros. 2011, *Nature*.
70. *Origins and Evolution of Antibiotic Resistance*. Davies, Julian y Davies, Dorothy. 2010, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, págs. 417 - 433.
71. Aníbal, De J. Sosa. *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*. Kampala, Uganda : Springer, 2010.
72. L. Mayers, Douglas, y otros. *Antimicrobial Drug Resistance Volume 1*. Québec, Canadá : Humana Press, 2009.
73. *Neonatal Sepsis An old problem with new insights*. Shah, Birju A. y Padbury, James F. 1, Providence, USA : Virulence, 2014, Vol. 5.