



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS EN
CEPAS DE *Citrobacter* spp. DE ORIGEN CLÍNICO Y ALIMENTARIO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

ENRIQUE HERNÁNDEZ ALONSO

ASESORES:

DIRECTOR DE TESIS: D. C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

ASESOR INTERNO: M. C. ALEJANDRO RUÍZ TAGLE



PUEBLA, PUE.

JULIO 2014

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	iv
ÍNDICE DE GRÁFICAS Y DIAGRAMAS	v
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	vi
AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS.....	vii
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	viii
LEISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.	1
MARCO TEÓRICO	2
1. Características generales de las enterobacterias.	2
1.1 Enterobacterias patógenas.	2
1.2 Enterobacterias Oportunistas.....	3
2. <i>Citrobacter spp.</i>	3
2.1 Características generales del genero <i>Citrobacter spp.</i>	4
2.3 Infecciones causadas por <i>Citrobacter spp.</i>	5
3. Antibióticos β -lactámicos.	5
3.1 Clasificación de los antibióticos β -lactámicos.	6
3.2 Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos.	7
4. Resistencia bacteriana.....	9
5. β -lactamasas.	10
5.1 β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).	10
5.1.1 BLEE TEM.....	13
5.1.2 BLEE SHV.....	14
5.1.3 BLEE OXA.....	15
5.1.4 BLEE CTX-M.....	16
5.1.5 BLEE AmpC.	17
5.1.6 Otras BLEE.	18
6. Epidemiología y diseminación de BLEE	20
MARCO DE REFERENCIA	22

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
JUSTIFICACIÓN	25
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
METODOLOGÍA.	27
7. Universo de estudio.....	27
8. Tamaño de muestra.	27
9. Tipo de estudio.	27
10. Criterios de inclusión.....	27
11. Criterios de exclusión.....	28
12. Obtención de Muestras.	29
13. Confirmación de cepas.	29
14. Determinación de sensibilidad a antibióticos.	30
15. Selección de cepas para amplificación de genes.	32
16. Amplificación de genes BLEE.	32
17. Templado para la amplificación.....	34
18. Condiciones para las PCR's.....	35
19. Visualización de los productos de PCR.	37
20. Purificación de los productos de PCR.....	37
21. Secuenciación de los genes amplificados.	38
22. Análisis de las secuencias.	38
RESULTADOS	39
23. Muestras y cepas de <i>Citrobacter</i>	39
24. Perfil de susceptibilidad de las cepas de <i>Citrobacter</i> spp.	42
25. Amplificación de genes de resistencia.	46
26. Secuenciación de genes que codifican para BLEE.	52
27. BLEE CTX-M.	52
28. BLEE SHV.	54
29. BLEE TEM.	56
30. Análisis de las secuencias obtenidas.....	57
DISCUSIÓN.....	58

CONCLUSIONES	62
PERSPECTIVAS.....	63
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXO 1.	71
1. Medios de cultivo y pruebas bioquímicas.	71
ANEXO 2	76
1. Soluciones y reactivos.	76
ANEXO 3	78
1. Purificación de los productos de PCR.....	78
ANEXO 4	79
1. Requerimientos para mandar a secuenciar.	79

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla	Figura	Título	Página
1		Clasificación de las β -lactamasas, según Bush-Jacob y Madeiros.	12
	1	Anillo β -lactámico.	5
2		Antibióticos evaluados en el antibiograma para las cepas <i>Citrobacter spp.</i>	31
	2	Estructura química de los antibióticos β -lactámicos.	6
3		Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes BLEE.	33
	3	Mecanismo de acción de los β -lactámicos	8
4		Componentes utilizados en la PCR.	35
	4	Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1. Enzimas modificadoras, 2. Bombas de expulsión, 3. Cierre de porinas y 4. Proteínas unidoras de penicilinas. Proteínas de unión a penicilina (PUP).	9
5		Condiciones para la amplificación de genes codificantes de BLEE.	36
	5	Sustitución de aminoácidos en los derivados de β -lactamasas tipo SHV.	15
6		Lugar de origen y cepas.	39
	6	Pruebas bioquímicas características del genero <i>Citrobacter spp.</i>	40
7		Pruebas bioquímicas para las cepas de <i>Citrobacter spp.</i>	40
	7	Amplificación del gen <i>bla</i> _{CTX-M}	49
8		Datos de las cepas aisladas de <i>Citrobacter spp.</i>	41
	8	Amplificación del gen <i>bla</i> _{CTX-M-1}	50
9		Perfil de susceptibilidad por el método de Kirby-Baier.	43
	9	Amplificación del gen <i>bla</i> _{TEM}	50
10		Perfil de susceptibilidad por el método de Kirby-Baier.	47
	10	Amplificación del gen <i>bla</i> _{SHV}	51
11		Amplificados positivos para genes que codifican para BLEE.	48
12		Variantes de los genes secuenciados codificantes para BLEE.	57

ÍNDICE DE GRÁFICAS Y DIAGRAMAS

Diagrama	Gráfica	Título	Página
1		Diagrama general de trabajo	28
	1	Origen de aislamiento de las cepas de <i>Citrobacter</i> spp., clínicas y de portadores.	42
2		Ratificación de cepas de <i>Citrobacter</i> .	29
	2	Origen de los aislamientos de <i>Citrobacter</i> spp de alimentos.	42
3		Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos.	31
	3	Perfil de susceptibilidad de la cepas de <i>Citrobacter</i> spp., de alimentos, clínicos y de portadores.	44
4		Obtención del templado para la amplificación.	35
	4	Perfil de resistencia a los β -lactámicos evaluados en las 14 cepas de <i>Citrobacter</i> spp.	45
5		Procedimiento para la PCR.	36
	5	Perfil de resistencia a los β -lactámicos evaluados en las cepas de origen alimentario, clínico y de portadores.	46
	6	Porcentaje de amplificación mediante PCR de genes codificantes para BLEE en las 7 cepas seleccionadas.	49

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su matrícula para realizar mis estudios profesionales siendo para mí una segunda casa donde halle los conocimientos y experiencia necesaria para ser una persona de provecho siendo parte de la generación 2009-2014.
- A la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por haberme brindado la oportunidad de realizar una de mis más grandes metas en la vida: la licenciatura en Químico Farmacobiólogo.
- Al Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas por brindarme en la oportunidad de realizar esta tesis encontrando todo el apoyo necesario en este lugar.
- Al Hospital para el Niño Poblano por donar cepas que se incluyeron en esta tesis, mediante la colaboración de la M. C. a quien agradezco la confianza y la disponibilidad para realizar dicha donación.
- A la VIEP por darme la oportunidad de realizar estancias en el LMHyC así como las becas recibidas durante estas estancias las cuales fueron el comienzo de este proyecto que hoy se ve consolidado.
- Al departamento de microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas por dar seguimiento a la presentación de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

- A mi directora de tesis la D. C. Rosa del Carmen Rocha Gracia por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por la confianza y el apoyo pero sobre todo por el tiempo dedicado a este proyecto y la calidad de persona que lo caracteriza.
- El más grande agradecimiento al M.C. Gerardo Cortés Cortés quien sobrellevo esta tesis con gran entusiasmo y dedicación, por estar cuando lo necesitaba, por ayudarme en todo el proceso para realizar esta tesis, por aceptarme como pupilo cuando llegue al laboratorio y mostrarme que hay personas únicas en el ámbito académico y tú eres una de ellas, por aclarar mi mar de dudas y saber guiarme en esta tesis. Pero sobre todo por ser una gran persona y estar siempre de buen humor además de la amistad que siempre me brindaste, por todo esto muchas gracias.
- A la D. C. Patricia Lozano Zaráin por ser un apoyo incondicional en el laboratorio así como el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis además de estar siempre disponible para la aclaración de cualquier duda.
- A mi asesor interno de la facultad, al M. C. Alejandro Ruiz Tagle por estar siempre disponible en la revisión de esta tesis así como los consejos y ayuda que me brindo.
- A la M. C. Alma López García, por el apoyo, consejos y la gran disponibilidad para la revisión de esta tesis.
- A la M. C. Laura Martínez Pérez, por los consejos en clase y las innumerables cosas que directa o indirectamente me dejaba revisar para la tesis además del tiempo y dedicación a la misma.
- A todos mis maestros de la FCQ por brindarme los conocimientos que tengo que sin duda fueron de gran utilidad para realizar mi tesis además de ser el pilar de una buena formación académica, a los maestros José Ángel, Paty, Martha, Laura, Enrique, José Luis, Ma. Del Rocio, Maricela, Esther (por mencionar algunos), etc., a todos ellos y a los que me dieron alguna clase.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- **A mis padres**

Isabel y Filogonio

Por su apoyo y amor incondicional. Esta tesis es, el resultado de un largo camino que sin ustedes no hubiera sido posible.

- **A mis hermanos**

Citlali, Adrián y Gustavo

Por su apoyo, cariño, travesuras, golpes, regaños, peleas y toda una vida llena de satisfacciones y experiencias inolvidables que sin su compañía no se que sería de mi.

- **A mis amigos**

A mis amigas entrañables Zuly y Clau, por su apoyo y cariño incondicional además de las múltiples experiencias que hemos vivido juntos, por los buenos y malos momentos, por las incontables veces que reímos juntos pero sobretodo por formar parte de mi vida, saben que las quiero y las estimo mucho.

A César, Merci pour tous les moments que nous avons passé ensembles et les moments qui nous manquent. Sono una persona molto speciale per me e so che questo rimarrà. Molto grazie per il vostro supporto.

A Xade, por ser una gran amiga y haberte unido a nuestras experiencias que sin duda marcaron nuestras vidas, por las constantes críticas constructivas y apoyo en todo.

A Héctor por su apoyo directa o indirectamente y todas aquellas nuevas experiencias que hemos vivido desde que te conocimos que sin duda fueron de las más importantes que marcaron nuestra estancia en la universidad.

A Mau, por su apoyo y amistad que me brindo desde el primer año de la universidad.

A Carlos, Lucero, y Eve, por ser buenos amigos.

- **A mis compañeros del laboratorio**

A Elena por ser una gran compañera del laboratorio que siempre estuvo dispuesta a ayudarme desde que llegue, por sus inalcanzables conocimientos y experiencia.

A Tania por ser por brindarme su amistad.

A Caro, Alex, Andrea, Gaby, Aimé, Tatiana, Migue y todos los que han llegado, por ser unos excelentes compañeros y compartir sus conocimientos y disposición para sacar adelante el trabajo, por ser unas excelentes personas y ayudar siempre a los que no tenemos tanta experiencia.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ácido Clavulánico
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMP	Ampicilina
AmpC	β -lactamasa derivada de la contracción “ β -lactamasa que otorga resistencia a Ampicilina con Codificación Cromosomal”
AMC	Amoxicilina con Ácido Clavulánico
AN	Amikacina
ATM	Aztreonam
Bet	Bromuro de Etidio
BHI	Medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón
BLAST	Herramienta básica de búsqueda para alineamientos locales
BLEE	β -Lactamasa de Espectro Extendido
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínicos
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CTX	Cefotaxima
CTX-M	β -lactamasa derivada de la contracción “Cefotaximasa aislada en Munich”
EMB	Medio de cultivo Eosina Azul de Metileno
FEP	Cefepime
Flich	Tv Programa para la visualización de secuencias nucleotídicas
FOX	Cefoxitina
GM	Gentamicina
IPM	Imipenem
LIA	Agar Hierro Lisina
MEM	Meropenem
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
M-H	Medio de cultivo Müller Hinton
MIO	Medio de Movilidad Indol Ornitina
NA	Ácido Nalidíxico
NN	Tobramicina
OXA	β -lactamasa derivada de la contracción de: “ β -lactamasa que otorga resistencia a Oxacilina”
PBP	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCR	β -lactamasa derivada de la contracción “Sulfhidril Variable”
SXT	Trimetoprim con Sulfametoxazol
Te	Tetraciclina
TEM	β -lactamasa derivada de la contracción del nombre griego “Temoniera”
TLA-1	β -lactamasa derivada de la contracción del nombre de la

Traslate tool	cultura "Tlahuica" Programa para realizar el cambio de nucleótidos a aminoácidos
Tris-HCl	Tris - Ácido Clorhídrico
TSA	Medio de cultivo Soya Trypticaseína
TSI	Agar Hierro Triple Azúcar
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos

RESUMEN

En los últimos años se han incrementado la incidencia de las infecciones causadas por microorganismos oportunistas, destacando entre estos las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Dentro de las enterobacterias encontramos 2 tipos, las patógenas y las oportunistas, encontrando en estas últimas a *Citrobacter spp.* como un agente causal de diversas infecciones principalmente en el tracto urinario y meningitis haciendo que las estancias hospitalarias se prolonguen. *Citrobacter spp.*, como otras enterobacterias han desarrollado estrategias para evitar el efecto bactericida de los antibióticos encontrando a las β -lactamasas como el principal mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Estas enzimas son capaces de romper el anillo β -lactámico presente en los antibióticos β -lactámicos, dando lugar a compuestos sin actividad antimicrobiana. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos. En México no existen reportes sobre el estudio de la presencia de BLEE en *Citrobacter spp.*, por lo tanto, la importancia de este trabajo es proveer información acerca de las características de la resistencia en cepas de *Citrobacter spp.*, hacia uno de los grupos de antibióticos ampliamente utilizados en la práctica clínica, los β -lactámicos. En este trabajo se caracterizó el fenotipo y el genotipo de la resistencia mediada por β -lactamasas de Espectro Extendido en cepas de *Citrobacter spp.*, aisladas de muestras clínicas, de portadores y alimentarias. Se trabajó con un total de 14 cepas de *Citrobacter spp.* (5 de origen clínico, 4 de portadores y 5 más de alimentos), recuperadas durante el periodo del 01 de julio al 30 de diciembre de 2013. Se evaluaron un total de 16 antibióticos, entre ellos 10 β -lactámicos, 3 quinolonas, 2 aminoglucósidos y un inhibidor de la síntesis de folatos. Se encontró una resistencia del 100% (14/14) a cefpodoxima y 2 cepas resistentes a meropenem. En la familia de las quinolonas se encontró resistencia del 35.7% a ciprofloxacina y ácido nalidíxico. También se encontró 64.3% (9/14) cepas resistentes a gentamicina y 21.4% (3/14) cepas resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol. Se seleccionaron siete cepas que presentaron resistencia a 2 o más cefalosporinas de 3ra generación para la amplificación de genes que codifican para BLEE mediante PCR. El 42.9% (3/7) amplificó el gen *bla*_{CTX-M}; el 28.6% 2/7 amplificó el gen *bla*_{SHV}; el 28.6% amplificó el gen *bla*_{TEM} y ninguna de las cepas seleccionadas amplificó para el gen *bla*_{OXA-1}. Estos valores resultan preocupantes ya que se encontraron dos cepas clínicas pediátricas con resistencia a meropenem, antibiótico considerado dentro de las últimas alternativas de tratamiento y cepas de origen alimentario altamente resistentes a cefalosporinas de 2da y 3ra generación en las cuales se identificaron las β -lactamasas BLEE CTX-M del grupo 1, BLEE SHV y BLEE TEM en cepas de origen alimentario (pollo y cilantro) que pudieran estar en plásmidos y facilitar su propagación a humanos predispuestos a adquirir una infección.

INTRODUCCIÓN.

Los avances en la medicina en los países desarrollados han conseguido erradicar algunos microorganismos patógenos primarios como el bacilo diftérico, el tetánico o el virus de la viruela; sin embargo se ha incrementado la incidencia de las infecciones causadas por microorganismos oportunistas, destacando entre estos las especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

Los microorganismos de esta familia presentan una gran plasticidad en diversos aspectos y en particular en su capacidad para adquirir genes que le confieren resistencia a los antimicrobianos. Entre estos destacan los genes que codifican las β -lactamasas que inactivan a diversos antibióticos β -lactámicos.

La introducción de las cefalosporinas de tercera generación y los monobactams resistentes a las β -lactamasas prevalentes en los años 80s (TEM, SHV) permitió tratar las infecciones por microorganismos portadores de estas enzimas, que inactivan a las aminopenicilinas y en parte a las cefalosporinas de primera generación; sin embargo pronto aparecieron β -lactamasas capaces de inactivar a las cefalosporinas de tercera generación y los monobactams.

MARCO TEÓRICO

1. Características generales de las enterobacterias.

La familia *Enterobacteriaceae* (bacterias entéricas), se encuentra dentro de las “Gamma-proteobacterias” (Kerstens *et al.*, 2006), y pertenece al orden XIII de Enterobacteriales. Según la segunda edición 2001 del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, está conformada por 41 géneros y más de 100 especies. Está formada por bacilos gramnegativos de 0.3-3 μm , no esporulados, anaerobios facultativos y quimiorganotróficos.

Todas las especies fermentan la glucosa, son oxidasa negativa y reducen los nitritos a nitratos. Pueden ser móviles por flagelos peritricos o inmóviles como *Klebsiella* o *Shigella*. Distribuidos en todo el mundo, las enterobacterias se encuentran en suelo, agua, frutas, vegetales, granos, plantas florales y árboles, en gusanos, humanos (pueden ser patógenos potenciales para humanos), animales e insectos. Algunas especies causan enfermedades diarreicas incluyendo fiebre tifoidea y disentería bacilar. Muchas especies no asociadas con enfermedades diarreicas son referidas como patógenos oportunistas (Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, Brenner *et al*, 2005).

El 99% de los aislamientos clínicos pertenecen únicamente a 23 especies. De acuerdo a su poder patógeno se dividen en dos grupos; enterobacterias patógenas y oportunistas.

1.1 Enterobacterias patógenas.

Escherichia coli, productora de diarrea, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* son microorganismos que por lo general no forman parte de la microbiota intestinal,

pero que pueden dar lugar a procesos diversos en hospederos normales, en su mayoría en el tubo digestivo (enteritis).

1.2 Enterobacterias Oportunistas.

E. coli, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Serratia* spp, *Hafnia* spp, *Citrobacter* spp, *Edwardsiella* spp, *Proteus* spp, *Morganella* spp y *Providencia* spp., son microorganismos que forman parte de la microbiota comensal del tubo digestivo o que se encuentran como saprófitos en el medio externo que normalmente no se comportan como patógenos, pero cuando se presentan factores predisponentes, pueden dar lugar a cuadros clínicos diversos por lo general fuera del aparato digestivo (infecciones urinarias, supuraciones de diversa localización y sepsis). En su mayoría son cepas resistentes o multirresistentes a los antibióticos, que generalmente son necesarios para la curación del proceso (Jawetz, 1996).

2. *Citrobacter* spp.

El género *Citrobacter* descrito en el año 1932 por Werkman y Gillen, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*; se halla frecuentemente en el agua, suelo, alimentos y tracto intestinal de los animales incluyendo el hombre. Ha sido reconocido como agente etiológico de distintos procesos infecciosos tales como infección urinaria, infección quirúrgica, infección de piel y tejido celular subcutáneo, bacteriemia y septicemia, meningitis y abscesos cerebrales. En el año 1993, Brenner y cols., escribieron por hibridación de ADN once genomoespecies, y propusieron utilizar una serie de pruebas bioquímicas y de crecimiento en diferentes sustratos como única fuente de carbono, para identificar las diferentes genomoespecies en el laboratorio de microbiología clínica (Brenner *et al*, 1993)

Dado que el esquema de Brenner utiliza un elevado número de pruebas bioquímicas, en el año 1995 O'Hara y cols., diseñaron con el mismo esquema una

llave dicotómica sencilla para la identificación de las once genomoespecies descritas.

En la actualidad el género *Citrobacter* está compuesto por las siguientes genomoespecies: complejo *C. freundii* (*C. freundii*, *C. braakii*, *C. sedlakii*, *C. werkmanii*, *C. youngae*, *C. gillanii*, *C. murlinae* y *C. rodentium*), *C. koseri*, *C. amalonaticus* y *C. farmeri*.

En lo que respecta a estas nuevas especies, en particular a las que integran el denominado "complejo *C. freundii*", existen pocos estudios acerca de su significado clínico y de su distribución y frecuencia en especímenes clínicos.

En *Citrobacter* del grupo *C. freundii* (*C. freundii*, *C. youngae*, *C. murlinae*, *C. braakii* y *C. werkmanii*), *C. koseri*, *C. amalonaticus* y *C. farmeri* la resistencia natural a betalactámicos está dada por la presencia de cefalosporinasas inducibles de clase C. De esta manera, estas bacterias normalmente presentan resistencia a ampicilina y cefalosporinas de primera generación (corte del halo de cefalosporinas de tercera generación en la proximidad de un disco de cefoxitina). Desde el punto de vista epidemiológico es importante llegar a conocer la especie aunque para los efectos clínicos, como puede deducirse de lo anterior, basta con conocer el grupo al que pertenece. De este modo, aunque las pruebas de sensibilidad a ampicilina y cefalotina den resultados de sensibilidad por punto de corte, deben ser informadas como resistentes a estos antibióticos. Respecto de las cefalosporinas de tercera generación, si no se trata de una mutante desreprimida, se informa la sensibilidad como tal, pero efectuando una aclaración de que si se emplea en el tratamiento, puede fallar por selección de mutantes (Underwood, 2004; Petrella *et al*, 2006).

2.1 Características generales del genero *Citrobacter* spp.

Citrobacter spp., es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, con forma de cocobacilo, con un diámetro de 0.3-1µm y una longitud de 0.6-6µm. Es móvil, con

flagelos periféricos, fermenta el manitol con producción de gas y H₂S, puede también usar el citrato como fuente de carbono. El género puede dividirse en 43 serogrupos basados en el antígeno O del lipopolisacárido (LPS) y en 20 quimiogrupos basados en la composición de los carbohidratos del LPS (Holmes y Aucken, 1998, Knirel *et al*, 2002).

2.3 Infecciones causadas por *Citrobacter* spp.

Citrobacter spp. produce infecciones urinarias, infecciones del tracto respiratorio e infecciones de heridas principalmente en adultos mayores de 65 años. Entre el 50 y el 60% de estas infecciones son polimicrobianas y se asocian a altas tasas de mortalidad (18 – 50%) o estancias hospitalarias prolongadas. La meningitis está casi exclusivamente asociada a *Citrobacter koseri* y se da en niños menores de dos meses (media 7 días de edad) con complicaciones graves (abscesos cerebrales) y frecuentes secuelas neurológicas (Underwood, 2004; Petrella *et al*, 2006).

3. Antibióticos β -lactámicos.

Los antibióticos β -lactámicos, que desde su introducción en la terapéutica hace ya más de 70 años, representan los agentes antimicrobianos utilizados más ampliamente tanto a nivel nosocomial, como en la comunidad y en la veterinaria (Buynak, 2006). La característica común a todos los miembros de esta familia es la presencia de un anillo β -lactámico de cuatro átomos con un enlace amida en su estructura, al que se le unen sustituyentes o cadenas laterales (Figura 1).

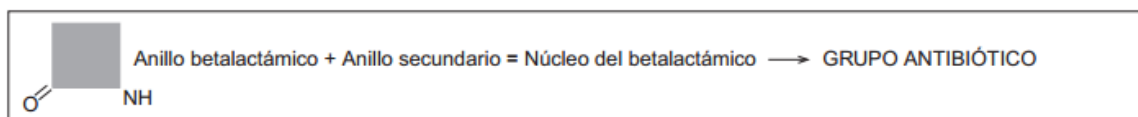


Figura 1. Anillo β -lactámico (Suárez y Gudiol *et al*, 2009).

3.1 Clasificación de los antibióticos β -lactámicos.

Estos antibióticos se clasifican en función de las características del anillo β -lactámico en penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. También se incluyen aquí por su estructura β -lactámica, los inhibidores de las β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) (Livermore, 1995). Figura 2.



^aTodos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.

Figura 2. Estructura química de los antibióticos β -lactámicos (Suárez y Gudiol, 2009).

Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo β -lactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. Además tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo β -lactámico y que es la que define sus propiedades.

Las cefalosporinas son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo *cefem* que consiste en la fusión de un anillo dihidrotiacínico (en lugar del anillo tiazolidínico característico de las penicilinas) y un anillo β -lactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas cefalosporinas (Suárez y Gudiol, 2009).

La estructura básica de los carbapenémicos consiste en un anillo β -lactámico fusionado a un pirrolidínico compartiendo un nitrógeno. Estas modificaciones y las cadenas laterales, así como la posición espacial de éstas, condicionan la mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) diana, un incremento de la potencia del espectro antibacteriano y de la resistencia a las β -lactamasas, siendo los β -lactámicos de más amplio espectro y actividad (Suárez y Gudiol, 2009).

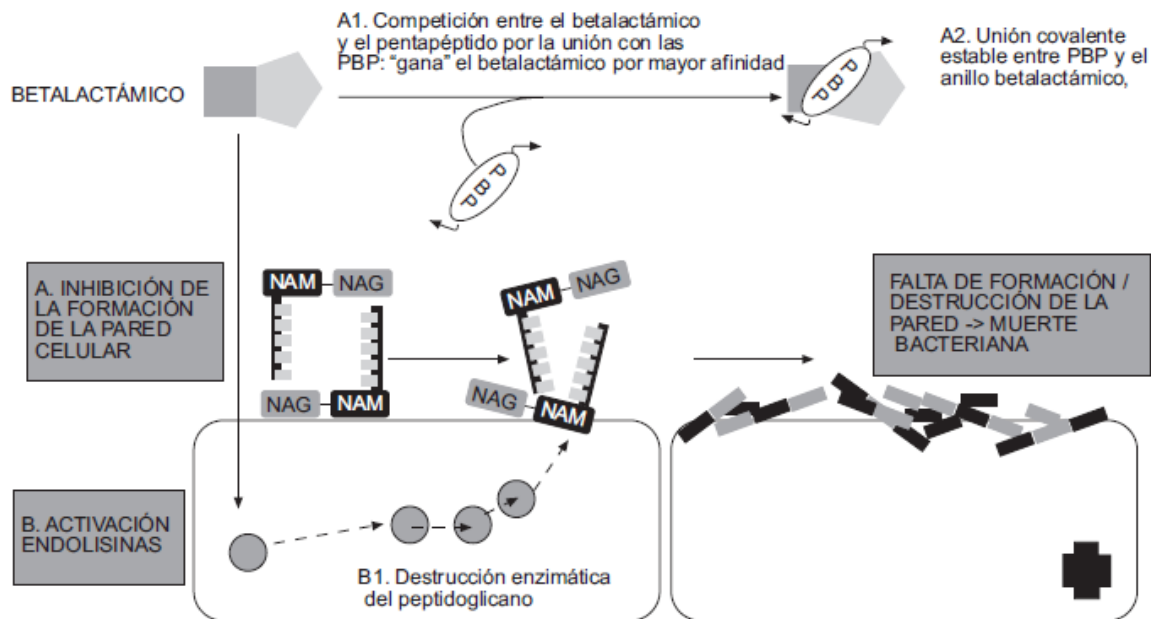
Los monobactámicos son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA). Tienen una estructura β -lactámica sencilla con una estructura monocíclica en la que el anillo β -lactámico no está fusionado a otro secundario.

Dentro de los inhibidores, el ácido clavulánico tiene un núcleo similar al ácido penicilánico de las penicilinas con la sustitución del átomo de azufre en posición 3 por un átomo de oxígeno (que incrementa la reactividad de la molécula y proporciona una afinidad mayor por las β -lactamasas), y la falta de la cadena lateral acilamino en posición 6. El sulbactam es una sulfona semisintética del ácido penicilánico y el tazobactam se diferencia del sulbactam por la presencia de un grupo triazoleno en posición 3 (Figura 2).

3.2 Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos.

Los antibióticos β -lactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto principalmente a través de 2 mecanismos: el primero es la Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana y el segundo la inducción de la autólisis bacteriana. El anillo

β -lactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido al que se unen estas enzimas, por lo que es capaz de unirse a ellas de forma covalente e impedir así la formación de la pared celular (Figura 3). Es por eso que estas enzimas se llaman también PBP (*penicillin binding protein*) proteína ligada a la penicilina. Sin la pared, la bacteria queda expuesta al medio y muere debido a cambios en la presión osmótica (Suárez y Gudíol, 2009).



NAM: Ácido N-acetilmurámico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina; PBP: Penicillin Binding Protein

Figura 3. Mecanismo de acción de los β -lactámicos (Suárez y Gudíol, 2009).

Los β -lactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. Las cepas que carecen de autolisina (generalmente son cepas tolerantes a los β -lactámicos) inhiben su crecimiento en presencia del β -lactámico, pero no se destruyen completamente (Suárez y Gudíol, 2009).

4. Resistencia bacteriana.

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente en los últimos años, caracterizado por una resistencia total o parcial de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico. De esta forma los microorganismos han desarrollado múltiples formas de evadir el agente antimicrobiano mediante mecanismos que involucran bombas, mutaciones y en especial enzimas como las β -lactamasas. Los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos (Figura 4) en bacterias gramnegativas son 4; 1. Enzimas modificadoras, 2. Bombas de expulsión, 3. Cierre de porinas y 4. Proteínas unidoras de penicilinas (Tafur, 2008).

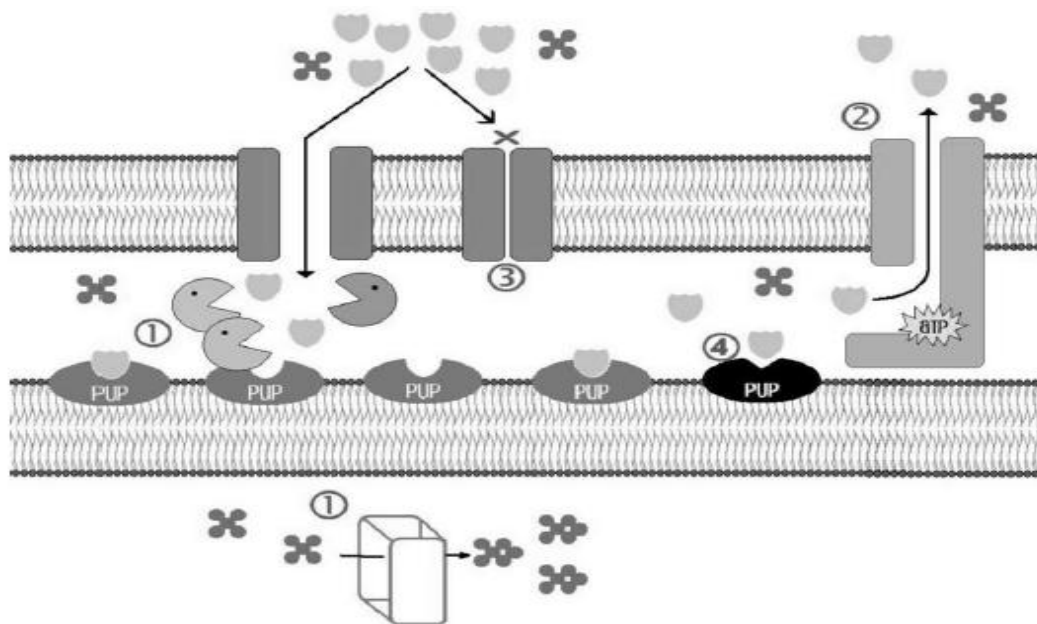


Figura 4. Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1. Enzimas modificadoras, 2. Bombas de expulsión, 3. Cierre de porinas y 4. Proteínas unidoras de penicilinas. Proteínas de unión a penicilina (PUP), (Tafur, 2008).

El mecanismo de resistencia a los antibióticos que prevalece en las bacterias gramnegativas es la producción de β -lactamasas (Tafur, 2008).

5. β -lactamasas.

Son enzimas capaces de romper el anillo β -lactámico presente en los antibióticos β -lactámicos, dando lugar a compuestos sin actividad antimicrobiana. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, lo cual permite su fácil transferencia entre diferentes bacterias, lo que representa un gran reto para el control de las infecciones.

5.1 β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Las β -lactamasas de espectro extendido, son enzimas producidas por los bacilos gramnegativos, fundamentalmente enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, aunque también por microorganismos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y otros. Son capaces de inactivar, además de las penicilinas y las cefalosporinas de primera y segunda generación, alas oximino-cefalosporinas y al aztreonam (Álvarez, 2010).

El primer reporte de una β -lactamasa capaz de hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido codificada en plásmido fue publicado en 1983 (Kanothe *et al.*, 1983). El gen que codifica esta β -lactamasa mostró una mutación en un solo nucleótido comparado con el gen que codifica a SHV-1. Posteriormente se descubrió que otras β -lactamasas estaban estrechamente relacionadas con TEM-1 y TEM-2 que conferían resistencia a cefalosporinas de espectro extendido (Paterson y Bonomo, 2005). Por lo tanto estas nuevas β -lactamasas fueron acuñadas como de amplio espectro.

Dado que la familia de enzimas BLEE está en continuo crecimiento, se reconocen según sus características funcionales y genotípicas, mediante la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros y su correlación con la clasificación molecular de Ambler:

a) La clasificación molecular de Ambler (Ambler *et al.*, 1980) divide a las β -lactamasas en cuatro clases (A, B, C y D) basándose en la estructura de la proteína. Las enzimas de los grupos A, C y D son serin- β -lactamasas, que contienen un aminoácido serina en su centro activo, y las del grupo B son metalo- β -lactamasas, dependientes de Zn^{+2} .

b) La clasificación funcional propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995 (Bush *et al.*, 1995) establece diferentes grupos según su sustrato y el perfil de inhibición por inhibidores de β -lactamasas (Tabla 1).

a. El grupo 1 incluye enzimas de la clase C de Ambler que hidrolizan cefalosporinas y no son inhibidas por el ácido clavulánico o tazobactam.

b. El grupo 2 incluye enzimas de las clases A y D de Ambler que se inhiben por el ácido clavulánico y está compuesto por 12 subgrupos.

c. El grupo 3 incluye enzimas de la clase B de Ambler. Son metalo- β -lactamasas que requieren para actuar de la unión de Zn^{+2} a su centro activo y que se inhiben por agentes quelantes como el EDTA, pero que no se inhiben por el ácido clavulánico o por tazobactam.

d. La mayoría de enzimas incluidas en el grupo 4 no están completamente caracterizadas y podrían ser clasificadas en los grupos anteriores.

Las BLEE incluyen enzimas pertenecientes a la clase A de Ambler y funcionalmente al grupo 2be y enzimas de la familia de las OXA que pertenecen a la clase D de Ambler y al grupo funcional 2de (Tabla 1) y se clasifican según su secuencia de aminoácidos en diferentes familias. Aunque existen diferencias en la prevalencia de las distintas familias, las mayoritarias son las de tipo TEM, SHV y CTX-M, seguidas de OXA, PER y VEB. Otras BLEE identificadas menos

frecuentemente son SFO, TLA, GES, IBC y BEL. Estas enzimas derivan de genes de β -lactamasas cromosómicas por mutaciones y movilización e integración de los mismos en diferentes estructuras genéticas, siendo la mayoría de ellas de codificación plasmídica (Barlow, 2008; Cantón, 2008).

Tabla 1. Clasificación de las β -lactamasas, según Bush-Jacob y Madeiros.

Grupo funcional 1	Subgrupos principales	Clase molecular 2	Centro activo	Inhibición		Atributo del grupo funcional y enzimas representativas
				Acido Clavulánico	EDTA	
1	No tiene	C	serina	-	-	Confieren resistencia a los β -lactámicos excepto a las carbapenemas, son β -lactamasas de tipo AmpC. Son de dos tipos: cromosómica y plasmídica: ABA-1, ACT-1, ACC-1/2, BIL-1, CEP-1, CMY-1 a CMY-23, DHA-1 a DHA-3, FOX-1 a FOX-6, LAT-1 a LAT-4, MIR-1 a MI-3, MOX-1/2.
2	2a	A	serina	+	-	Penicilinas cromosómicas y plasmídicas de grampositivos.
	2b	A	serina	+	-	Penicilinas y Cefalosporinas de amplio espectro de sustrato. Cromosómicas: de <i>K. pneumoniae</i> . Plasmídicas: SHV-1, OHIO-1. TLE-1/2, ROB-1, LXA-1, HMS-1, TEM-1/2.
	2be	A	serina	+/-	-	Enzimas de espectro extendido, resistencia a penicilinas, oximino-cefalosporinas (1ª, 2ª, y 3ª generación) y monobactámicos. Cromosómicas: OXY de <i>K. oxytoca</i> . Plasmídicas: TEM-3 a TEM-29, TEM-42, TEM-43, TEM-46 a TEM-50, TEM-52 a TEM-58, TEM-60 a TEM-64, TEM-66 a TEM-72, TEM-75, TEM-79 a TEM-102, TEM-104 a TEM-155; SHV-2 a SHV-92 (excepto SHV-10); CTX-M-1 a CTX-M-43, CTX-M-46 a CTX-M-58; Toho-1/2; OXA-2, OXA-10, OXA-11, OXA-14, OXA-15, OXA-16, OXA-17, OXA-19, OXA-28, OXA-32, OXA-35, GES-1 a GES-9, PER-1 a PER-3; TLA-1.
	2br	A	serina	-	-	Penicilinas derivadas de TEM resistentes a inhibidores denominadas

						IRT (Inhibitor Resistant TEM) plasmídicas: TEM-30 a TEM-41, TEM-44, TEM-45, TEM-51, TEM-59, TEM-65, TEM-73, TEM-74, TEM-76 a TEM-78, TEM-80, TEM-103, SHV-10.
	2c	A	serina	+	-	Penicilinasas y carbenicilinasas plasmídicas: PSE-1 (CARB-2), PSE-3, PSE-4 (CARB-1), PSE-5 (CARB-7), CARB-3 a CARB-9.
	2d	D	Serina	+/-	-	Penicilinasas y oxacilinasas plasmídicas: OXA-1 a OXA-98.
	2e	A	Serina	+	-	Cefalosporinasas inducibles cromosomales como la de <i>Proteus vulgaris</i> y la enzima L2 de <i>S. maltophilia</i>.
	2r	A	Serina	+	-	Cromosómicas e inducibles; representantes son las enzimas: IMI-1, NMC-A, Sme-1.
3	3 ^a , 3b y 3c	B	Metal (Zinc)	-	+	Metalo-β-lactamasas, como la enzima: L1 de <i>S. maltophilia</i>, IMP-1, etc.
4	No tiene subgrupos	ND	Variable	-	+	Enzimas misceláneas como la Penicilinasas de <i>Bordetella cepacia</i>.

ND: No determinada.

1 Clasificación basada en características funcionales (Bush, et *al.*, 1995).

2 Clasificación basada en características estructurales (Ambler, 1980).

5.1.1 BLEE TEM.

La enzima TEM-1 se describió por primera vez en 1965 en Grecia en un aislado de *E. coli* procedente de una paciente llamada Temoniera, de ahí la denominación de TEM. Cerca del 90% de la resistencia a ampicilina en *E. coli* es debido a la producción de TEM-1 (Livermore, 1995). Esta enzima es también responsable de la resistencia a ampicilina y penicilina que ha sido vista en *Haemophilus influenzae*

y *Neisseria gonorrhoeae*. TEM-2, el primer derivado de TEM-1, tiene solamente una sustitución (Gln39Lys) de la β -lactamasa original; esto causa un aumento del punto isoeléctrico (pI) de 5.4 a 5.6, pero no cambia el perfil del sustrato (Perilli, 1997). TEM-3, originalmente reportada en 1989, fue la primera β -lactamasa tipo TEM con un fenotipo de BLEE (Sougakoff, 1988). A la fecha se han descrito 218 variantes de esta enzima (www.lahey.org/studies, 2014).

La mayoría de estas enzimas se ha descrito en *E. coli* y *K. pneumoniae*, aunque también se han identificado en enterobacterias como *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* y *Salmonella spp.* También se ha reportado en *Pseudomonas aeruginosa* (Bradford et al, 2001).

5.1.2 BLEE SHV.

La enzima SHV-1 es una β -lactamasa de espectro reducido que tiene actividad contra pencilinas y fue la primera β -lactamasa codificada cromosómicamente que se describe en miembros del género *Klebsiella*. Las enzimas de tipo SHV (Sulfhidrilo Hidroxil Variable) derivan de la β -lactamasa cromosómica de *K. pneumoniae* SHV-1. La primera BLEE de este tipo, que también fue la primera BLEE descrita, se detectó en 1983 en Alemania en un aislado de *Klebsiella ozaenae* que presentaba un fenotipo de resistencia poco habitual y que se transfería por conjugación. Se trataba de la variante SHV-2 que difería de su predecesor SHV-1 en una mutación aminoacídica (Knothe et al., 1983). La sustitución de Gly238Ser en SHV-2 altera el espectro de actividad (Knothe et al, 1983). Esta mutación por sí sola representa las propiedades de amplio espectro de esta β -lactamasa, designado como SHV-2 (Hertage et al, 1999).

Los cambios que se han observado en *bla*_{SHV} para dar lugar a las variantes de SHV ocurren en un menor número de posiciones dentro del gen estructural (Figura 5). Un número de variantes relacionadas con SHV-5 tienen una sustitución de Lys

por Glu en la posición 240. El residuo de Ser en la posición 238 es crítica para la hidrólisis eficiente de ceftazidima, y el residuo de Lys es crítico para la hidrólisis eficiente de cefotaxima (Bradford *et al.*, 2001).

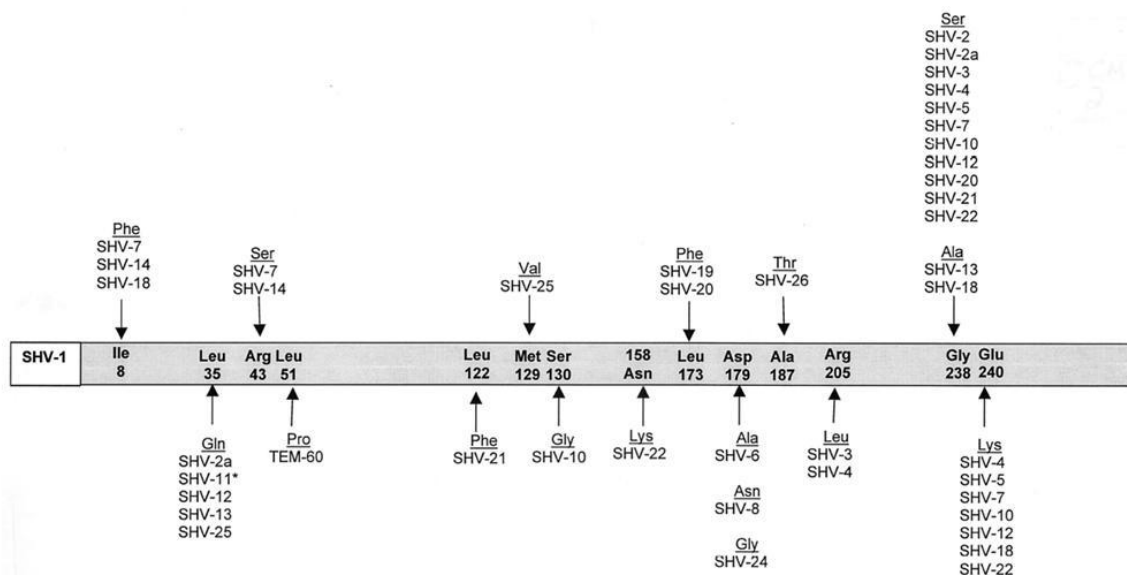


Figura 5. Sustitución de aminoácidos en los derivados de β -lactamasas tipo SHV. (Tomado de Bradford *et al.*, 2001).

5.1.3 BLEE OXA.

Las β -lactamasas tipo OXA (llamadas así porque tienen la capacidad de hidrolizar oxacilina), difieren de las enzimas tipo TEM y SHV porque pertenecen a la clase molecular D de Ambler y al grupo funcional 2d. Estas enzimas confieren resistencia a ampicilina y cefalotina y son caracterizadas por su alta actividad hidrolítica contra oxacilina y cloxacilina y que son inhibidas pobremente por el ácido clavulánico (Bush *et al.*, 1989).

La mayoría de β -lactamasas tipo OXA no hidrolizan las cefalosporinas de espectro extendido y no se consideran como BLEE. Sin embargo, OXA-10 hidroliza (débilmente) cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam. Las BLEEs OXA de tipo A fueron descubiertas originalmente en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de un

solo hospital en Turquía. Otras BLEEs OXA son: OXA -11, 14, 16, 17, 19, 15, 18, 28, 31, 32, 35, y 45. Éstas confieren resistencia a cefotaxima y a veces a ceftazidima y aztreonam (Toleman *et al.*, 2003).

Diversas BLEEs tipo OXA han sido derivadas de OXA-10, hasta este momento se han descrito 19 variantes de esta familia con fenotipo BLEE. OXA-14 y OXA-17 difiere de OXA-10 por un solo residuo de aminoácido, OXA-11, OXA-16 y OXA-142 difiere por dos residuos de aminoácidos (<http://www.lahey.org>, 2014).

5.1.4 BLEE CTX-M.

Recientemente, ha surgido una nueva familia de β -lactamasas mediada por plásmidos llamada cefotaximasa (CTX-M) que hidroliza preferentemente cefotaxima. Han sido encontradas principalmente en las cepas de *Salmonella* y *E. coli*, pero también han sido descritas en otras especies de enterobacterias (Paterson y Bonomo, 2005). Las enzimas tipo CTX-M constituyen un linaje diferente de β -lactamasas de clase molecular A y es un grupo que está creciendo rápidamente. Estas enzimas no están muy estrechamente relacionadas con TEM y SHV ya que sólo comparte el 40% de identidad con estas (Jacoby y Medeiros, 1991). Las enzimas tipo CTX-M se dividen según su secuencia de aminoácidos en cinco grupos (Cantón *et al.*, 2006; Rossolini *et al.*, 2008):

Grupo 1: CTX-M-1 (CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -23, -28)

Grupo 2: CTX-M-2 (CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, Toho-1)

Grupo 3: CTX-M-8

Grupo 4: CTX-M-9 (CTX-M-9, 13, -14, -16, -17, -18, -19, -21, Toho-2)

Grupo 5: CTX-M-25

El primer reconocimiento de la aparición de β -lactamasas CTX-M ocurrió casi simultáneamente en Europa y América del Sur a principios de 1989. La primera publicación que reconoce una BLEE del grupo CTX-M fue el reporte de una *E. coli*

resistente a cefotaxima pero susceptible a ceftazidima, recuperada del oído de un niño de cuatro meses de edad en Munich (Bauernfeind *et al.*, 1990). La enzima responsable de este fenotipo BLEE en particular que no hidroliza ceftazidima fue nombrada como CTX-M-1 en referencia a su actividad hidrolítica contra cefotaxima (**CTX** como sus siglas y **M** de Munich).

Simultáneamente en Argentina se describió la enzima CTX-M-2 en cepas de *Salmonella typhimurium*. En 1996, se detectó el primer aislado productor de CTX-M-8 en Brasil (Bonnet, 2000) y en 1994 el primer aislado de *E. coli* productor de CTX-M-9 en Francia. Hasta este momento 134 BLEE tipo CTX-M se han reportado (<http://www.lahey.org/studies>, 2014).

Las CTX-M constituyen un nuevo grupo de β -lactamasas de la clase A de Ambler con propiedades de espectro extendido. Se encuentran codificadas en plásmidos transferibles y la mayoría se encuentran principalmente en enterobacterias.

Dentro de las enterobacterias, actualmente la enzima BLEE CTX-M-15 se le ha considerado como un marcador epidemiológico de multirresistencia a nivel mundial, ya que su diseminación está ligada a una coselección tras la presencia de genes de resistencia a otros antibióticos como aminoglucósidos y quinolonas que pueden estar localizados en plásmidos y ser transferidos de forma horizontal en elementos móviles como transposones e integrones, originando una rápida propagación de la resistencia a β -lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos y otros antibióticos (Coque *et al.*, 2008).

5.1.5 BLEE AmpC.

En la clasificación estructural de Ambler las enzimas β -lactamasas AmpC, pertenecen a la clase C, mientras que en el esquema de clasificación funcional de Bush éstos se asignan al grupo 3. Estas enzimas pueden ser codificadas en el cromosoma o en plásmidos. Las β -lactamasas AmpC son clínicamente

importantes, ya que son activas frente a penicilinas, pero incluso más activas frente a cefalosporinas y pueden hidrolizar cefamicinas como cefoxitina; oxiamino-cefalosporinas como ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona además de monobactams como aztreonam y no se ven afectados por los inhibidores de β -lactamasas disponibles (ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam) (Phillipon *et al.*, 2002). Las β -lactamasas AmpC mediadas por plásmidos difieren de AmpCs cromosómicas en ser inducibles y son típicamente asociados con resistencia a múltiples fármacos (Barnaud *et al.*, 1998). Las β -lactamasas AmpC mediadas por plásmidos se han encontrado en aislados de *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter aerogenes* (Thomso *et al.*, 2001).

Los plásmidos portadores de genes de β -lactamasas AmpC, suelen llevar otras resistencias múltiples que incluyen genes de resistencia a los aminoglucósidos, cloranfenicol, quinolonas, sulfamidas, tetraciclina y trimetoprim así como los genes para otras β -lactamasas, como TEM-1, PSE-1, CTX-M-3, las variedades de SHV y VIM-1 (Jacoby, 2009). Las β -lactamasas AmpC mediada por plásmidos, se han encontrado en todo el mundo, pero son menos comunes que las β -lactamasas de amplio espectro (BLEE)

5.1.6 Otras BLEE.

Mientras que la mayoría de las BLEE son derivadas de β -lactamasas TEM o SHV, otras pueden ser caracterizadas como nuevas familias de BLEE, ya que no están relacionadas con ningún otro tipo de familias descritas:

La β -lactamasa PER-1 fue descubierta en un aislamiento de *P. aeruginosa* de un paciente de Turquía (Nordman *et al.*, 1993). Un plásmido codificante de PER-1 fue encontrado en múltiples aislamientos nosocomiales de *S. enterica* serovar *Typhimurium*, sugiriendo que estos aislamientos adquieren la resistencia por

plásmidos en los hospitales (Vahaboglu, 1996). Una enzima relacionada, PER-2, la cual tiene una homología de aminoácidos del 86% con PER-1, fue encontrada en la misma especie y serovar pero en un aislamiento de Argentina (Bauernfeind *et al*, 1996). Es interesante hacer notar que PER-1 es encontrada exclusivamente en Turquía, mientras que PER-2 ha sido encontrada exclusivamente en Sudamérica.

Otra enzima relacionada con PER-1 es la β -lactamasa VEB-1, la cual fue encontrada en un aislamiento de *E. coli* de un paciente en Vietnam, Tailandia (Poirel *et al*, 2000). Una tercera enzima relacionada es CME-1, la cual fue aislada de *Chryseobacterium meningosepticum* (Rossolini *et al*, 1999).

Otra enzima es TLA-1, en honor a la cultura Tlahuica, un grupo étnico derivado de los Aztecas, fundadores de la ciudad de Cuernavaca (*Cuauhnahuac*, en Nahuátl), ciudad donde se aisló por vez primera, la cual fue identificada de un aislamiento de *E. coli* en México el cual resultó resistente a cefalosporinas de amplio espectro (CTX y CAZ) y otros antibióticos como aztreonam y ciprofloxacino (Silva *et al*, 2000).

Las β -lactamasas PER-1, PER-2, VEB-1, CME-1 y TLA-1 están relacionadas, pero muestran solo de un 40 a 50 % de homología. Todas estas enzimas confieren resistencia a oximiino-cefalosporinas, especialmente ceftazidima y aztreonam.

Una β -lactamasa no comúnmente encontrada es SFO-1, la cual está altamente relacionada con las β -lactamasas clase A de *Serratia fonticola*, es una enzima transferible que puede ser inducida a una producción de alto nivel por imipenem.

GES-1 es otra β -lactamasa no común que no está relacionada con ninguna otra BLEE, pero muestra un 36% de homología a una cabenicilinasas de *Proteus mirabilis* (Poirel *et al*, 2000).

6. Epidemiología y diseminación de BLEE

Las BLEEs son frecuentemente codificadas en plásmidos que pueden ser fácilmente transferidas hacia cepas bacterianas de la misma especie o de diferente especie, este hecho ha facilitado su propagación a nivel mundial (Livermore, 1995).

A partir del primer reporte de BLEEs en Europa, la gran mayoría de reportes en la primera década después de haber sido descubiertas se realizaron en Francia (Philippon *et al*, 1989). Sin embargo, no pasó mucho tiempo, antes de que las BLEEs fueran reportadas en Estados Unidos y Asia. En África y Medio Oriente, se han registrado varios brotes de infecciones causadas por *Klebsiella* productoras de BLEE, también han sido documentadas en Israel, Arabia Saudita y en varios países del norte de África (Akhan *et al.*, 2001).

En Australia la primera BLEE detectada fue en una cepa de *Klebsiella ssp.*, aislada en 1998, en la última década los microorganismos productores de BLEE se han detectado en todos los estados de Australia (Bell *et al*, 2002). En China en 1988, se reportó un aislamiento de *K. pneumoniae* portadora de SHV-2. Estudios nacionales han indicado la presencia de BLEE en *E. coli* aisladas de Japón, Corea, Malasia y Singapur (Paterson y Bonomo, 2005).

Un factor, que en los últimos años ha tomado especial relevancia en la diseminación de la resistencia bacteriana, es la movilidad de la población, ya que es precisamente por este fenómeno genes de resistencia se han propagado a nivel mundial.

Un ejemplo de esto, es la diseminación de una nueva metalo- β -lactamasa entre las enterobacterias, denominada metalo- β -lactamasa Nueva Delhi (por el lugar de origen, Nueva Delhi, India) descrita por primera vez en 2009. El gen *bla_{NDM-1}* que codifica para esta enzima, fue caracterizado en una clona de *K. pneumoniae*

aislada de un paciente masculino de 59 años de edad originario de la India que había vivido muchos años en Suecia, y que al viajar de nuevo a la India, adquirió una infección del tracto urinario ocasionada por una *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, al amplificar un integrón de clase 1, se reveló la presencia de tres regiones que conferían resistencia, una de las cuales correspondió al gen *bla_{NDM-1}*, ubicado en una región de 180 Kb que es fácilmente transferible por conjugación y que confiere resistencia a todos los antibióticos, excepto a las fluoroquinolonas y colistina. La metalo- β -lactamasa NDM-1 es un monómero de 28 kDa capaz de hidrolizar a todos los β -lactámicos, excepto aztreonam y que comparte muy poca identidad con otras metalo- β -lactamasas (Dongeon *et al*, 2009).

Desde su descripción en 2009, se han reportado casos alrededor del mundo (Estados Unidos, Canadá, Suecia, Reino Unido, Austria, Bélgica, Francia, Países Bajos, Alemania, Japón, África, Omán y Australia) y en distintas enterobacterias (*E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus spp.*, *Citrobacter freundii*, *K. oxytoca*, *Morganella morganii* y *Providencia spp.*), generando gran preocupación, ya que se trata de una metalo- β -lactamasa que se está diseminando muy rápidamente, además de que genera resistencia a antibióticos de amplio espectro y de última elección (Rolain *et al*, 2010).

MARCO DE REFERENCIA

En los últimos años se han reportado numerosos trabajos de los mecanismos de resistencia como la producción de BLEE y genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos en cepas del genero *Citrobacter* spp.

En Japón, Kanamori y cols., en 2011 reportan una alta prevalencia de BLEEs y determinantes Qnr en diferentes especies de *Citrobacter*, demostrando la diseminación de CTX-M-2.

De 187 aislados de *C. koseri* (53.7%), 151 de *C. freundii* (43.4%), y 10 de *C. amalonaticus* (2.9%) se obtuvieron 67 aislados de *Citrobacter* spp. productores de BLEE (19.3%) y la prevalencia de productores de BLEE fue mayor en *C. koseri* (60/187, 32.1%) que en *C. freundii* (7/151, 4.6%). En *C. amalonaticus* no se encontraron cepas productoras de BLEE. En cuanto a la distribución del genotipo BLEE se encontró que de los 67 aislados productores de BLEE, 50 (74.6%), 12 (17.9%) y 25 (37.3%) poseían *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}, respectivamente. Tras la secuenciación encontraron que 46 (92.0%) de los 50 aislados positivos *abla*_{CTX-M} tenían CTX-M-2, seguido por 3 con CTX-M-15 y 2 con CTX-M-14. Todos los aislados positivos a *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM} tenían SHV-2 y TEM-1, respectivamente (Kanamori *et al*, 2011)

En 2010, Poirel y cols., reportan un caso de una cepa de *Citrobacter freundii* extremadamente resistente aislada del urocultivo de una mujer francesa de 18 años de edad, la cual era resistente a todos los β -lactámicos incluyendo a los carbapenémicos imipenem, meropenem y ertapenem. En esta cepa se identificaron varios genes de resistencia para metalo- β -lactamasas *bla*_{NDM-1} y *bla*_{VIM-4}, *bla*_{OXA-181}, además de genes tipo BLEE como *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-9}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{TEM-1} y *bla*_{CMY} (Poirel *et al*, 2011).

En 2010, Pan y cols., reportan la coexistencia de múltiples genes de resistencia a antimicrobianos en un aislado clínico de *C. freundii* carbapenem-resistente en

China. En este trabajo se encontraron genes de resistencia como *bla*_{KPC-2}, al mismo tiempo realizaron PCR multiplex para la determinación de genes de resistencia a quinolonas encontrando los *qnrA* y *qnrB* como la acetilasa *aac(6')-Ib-c*, los genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-3} y *bla*_{CTX-M-14}. Además de una nueva variante del gen *bla*_{CMY} designada como CMY-49 (Pan *et al.*, 2010).

Kim y cols., en 2005 estudiaron en Korea la ocurrencia de CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14 y CTX-M-9 en aislados clínicos de enterobacterias, en las cuales se incluían una cepa de *C. freundii*, tres de *E. coli*, cuatro de *K. pneumoniae* y nueve de *Serratia marcescens*, encontrando la presencia de las β -lactamasas antes mencionadas y específicamente CTX-M-3 en *C. freundii* (Kim *et al.*, 2005).

Otro estudio realizado en la capital de la República Democrática del Congo en muestras de agua para consumo humano, realizado de 2009 a 2010, con un total de 150 aislados recuperados de enterobacterias, de las cuales el 4.7 correspondieron a *C. spp.* tenían la presencia de *bla*_{CTX-M} pertenecientes al grupo CTX-M-1 (De Boeck *et al.*, 2012).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia bacteriana es un grave problema de Salud Pública evidenciado a través de los numerosos trabajos que describen los mecanismos moleculares de resistencia a los antibióticos que se presentan, así como su rápida propagación por el mundo debido a numerosos factores como la globalización. Este problema se asocia principalmente a bacterias de origen clínico donde se ha visto la diseminación de genes de resistencia no solo entre bacterias patógenas comunes, sino también bacterias oportunistas, siendo esta diseminación muy elevada y facilitadora de la propagación de cepas multiresistentes hacia otros ambientes. De esta forma el aislar una bacteria multiresistente no es indicativo de que ésta sea de origen clínico ya que también puede aislarse de otros microambientes como agua, alimentos, animales, etc.

En los últimos años la emergencia de las BLEEs ha afectado muchas regiones del mundo y hoy en día es posible encontrar cepas en diferentes países aisladas de diferentes ambientes que tengan genes de resistencia a muchos de los antimicrobianos que son usados en la práctica clínica. Este problema no es exclusivo de bacterias patógenas comunes y a pesar de que existen pocos trabajos sobre la resistencia en cepas de *Citrobacter* spp., se tiene bien caracterizado y demostrado la presencia de genes que le confieren la misma o mayor resistencia a otras cepas patógenas clásicas como *E. coli*, *Klebsiella* spp., entre otras, sin embargo en México carecemos de información acerca de la presencia de cepas de *Citrobacter* spp., productoras de BLEEs, por lo tanto; ¿Existe resistencia mediada por BLEE a los antibióticos β -lactámicos en cepas de *Citrobacter* spp., aisladas en nuestra población?

JUSTIFICACIÓN

El uso irracional de los antibióticos debido a las malas políticas de comercialización ha contribuido al creciente problema de Salud Pública de la multirresistencia antimicrobiana, no solo en nuestro país, sino en todo el mundo. Muchos estudios apuntan a que este problema no sólo se adjudica a las bacterias patógenas clásicas sino también a las bacterias que tienen importantes participaciones en las infecciones de tipo nosocomial como lo es *Citrobacter* spp.

En México no existen reportes sobre el estudio de la presencia de BLEE en *Citrobacter* spp., y con base en las referencias anteriores, la importancia de este trabajo es proveer información acerca de las características de la resistencia en cepas de *Citrobacter* spp., hacia uno de los grupos de antibióticos ampliamente utilizados en la práctica clínica, los β -lactámicos.

La información que genere este proyecto generará conocimiento acerca de la prevalencia de la resistencia en ésta enterobacteria con la finalidad de contribuir en las decisiones en el uso de los antimicrobianos.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el fenotipo y el genotipo de la resistencia mediada por β -lactamasas de Espectro Extendido en cepas de *Citrobacter* spp., aisladas de muestras clínicas y alimentarias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Confirmar las cepas de *Citrobacter* spp., aisladas de muestras clínicas, portadores humanos y de productos alimentarios.
2. Determinar el perfil de resistencia a antibacterianos en las cepas de interés y seleccionar aquellas multiresistentes.
3. Amplificar genes que codifican para las BLEE (CTX-M, TEM, SHV y OXA) en cepas resistentes mediante PCR.
4. Secuenciar los genes codificantes para BLEE.
5. Analizar las secuencias de los genes codificantes para BLEE, mediante programas informáticos y determinar el tipo de β -lactamas.

METODOLOGÍA.

7. Universo de estudio.

Cepas de *Citrobacter* spp., aisladas de muestras clínicas de pacientes con infecciones asociadas a *Citrobacter* spp., (lesión tumoral y líquido pleural), alimentarias (alas de pollo y hojas de cilantro crudo sin desinfectar) y de portadores (coprocultivos) conservadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la comunidad (LMHyC) del Centro en Investigaciones Microbiológicas (CICM)

8. Tamaño de muestra.

Se trabajó con un total de 14 cepas de *Citrobacter* spp, de las cuales 5 fueron donadas por el Hospital para el Niño Poblano de la ciudad de Puebla aisladas de lesión tumoral y líquido pleural en pacientes con infecciones asociadas a *Citrobacter* spp., 9 se obtuvieron del cepario de Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del CICM, de las cuales 5 fueron de origen alimentario (4 de alas de pollo obtenidas de supermercados y una cepa de hojas de cilantro crudo sin desinfectar) y 4 del coprocultivo de humanos portadores durante el periodo del 01 julio al 31 de diciembre de 2013.

9. Tipo de estudio.

Epidemiológico, descriptivo y transversal.

10. Criterios de inclusión.

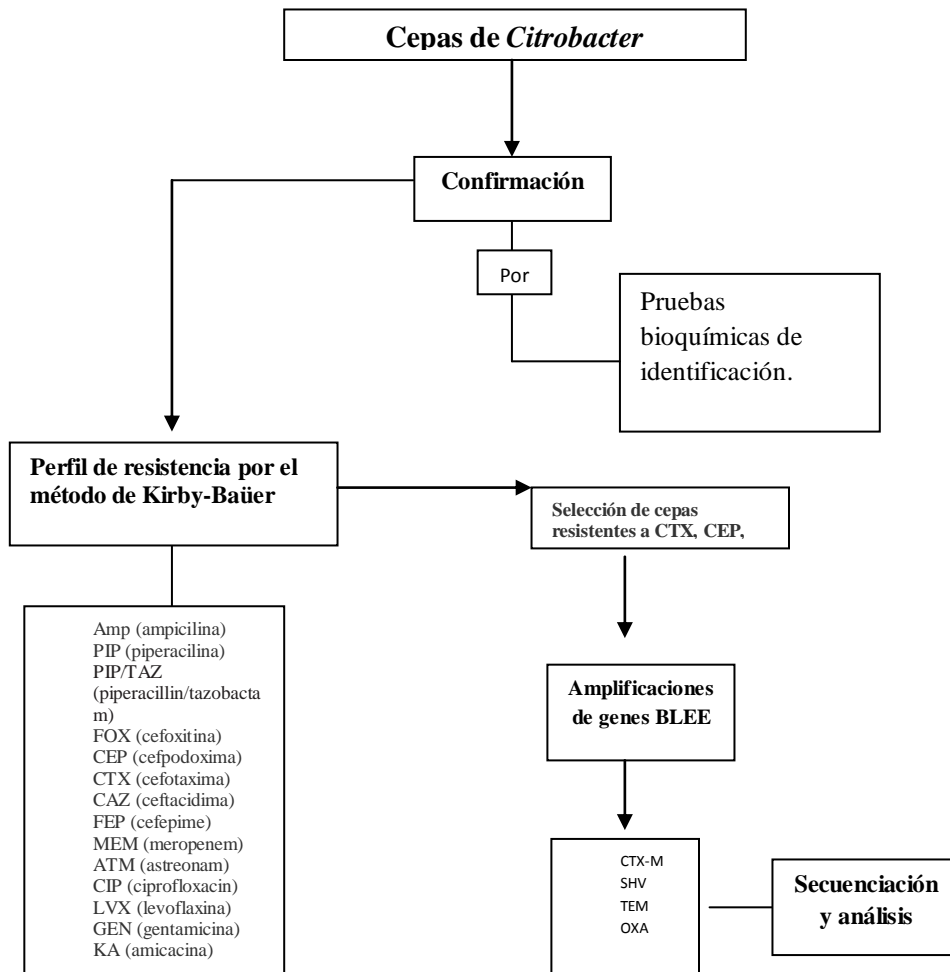
Todas aquellas cepas que provinieron de muestras de alimentos así como de origen clínico y de portadores que presentaron las características bioquímicas del género *Citrobacter*.

11. Criterios de exclusión.

Cepas contaminadas, cepas con otro origen, cepas con diferente perfil bioquímico-morfológico a *Citrobacter* spp.

En el diagrama 1 se muestra el diagrama general de trabajo.

Diagrama 1. Diagrama general de trabajo.



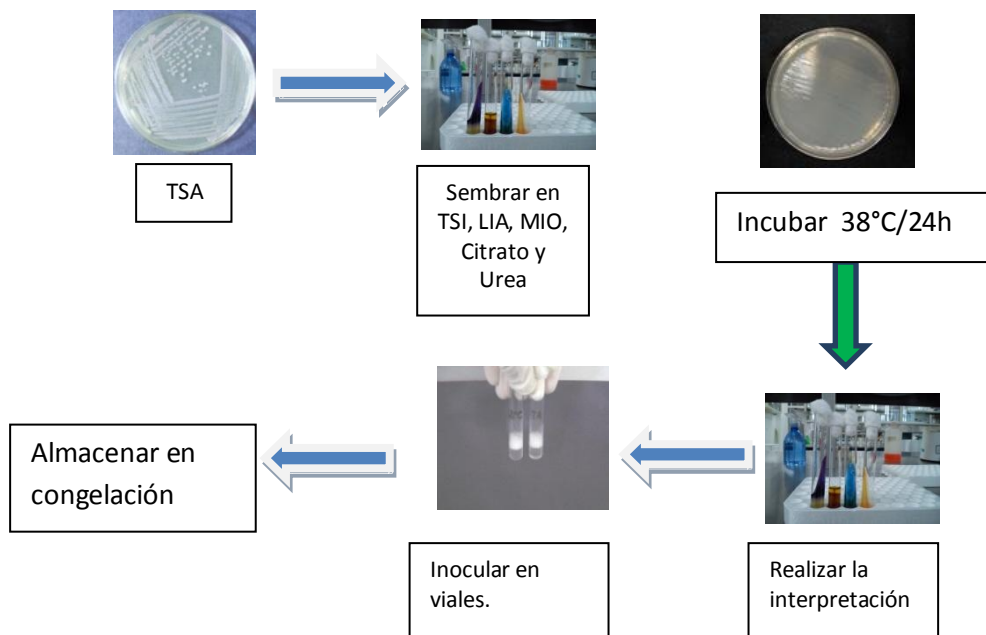
12. Obtención de Muestras.

Las 5 cepas de origen clínico fueron donadas por el Hospital para el Niño Poblano de la ciudad de Puebla. Las 5 cepas de origen alimentario fueron donadas por el cepario del LMHyC así como las 4 cepas de portadores durante un periodo de seis meses del 01 julio a 30 de diciembre de 2013.

13. Confirmación de cepas.

A las cepas de estudio se les realizó la confirmación de género y especie mediante pruebas bioquímicas clásicas como se muestra en el diagrama 2. Todas las cepas que cumplieron con los criterios bioquímicos del género *Citrobacter* se incorporaron al cepario en viales con glicerol al 10% V/V en congelación a -70°C para su posterior estudio durante la realización de éste trabajo.

Diagrama 2. Confirmación de cepas de *Citrobacter* spp.



14. Determinación de sensibilidad a antibióticos.

Para la determinación de sensibilidad a los antimicrobianos de las cepas de *Citrobacter spp.*, se utilizó el método de Kirby-Baüer como se muestra en el diagrama 3, en él se evaluaron 16 antibióticos de diferentes familias como β -lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, entre otros, descritos en la tabla 2 como lo indica el CLSI 2013.

Procedimiento.

El método utilizado para determinar la sensibilidad antimicrobiana, consistió en preparar una suspensión bacteria en solución salina isotónica al 0.85% (masa/volumen) de NaCl, agitándola para resuspender el inóculo. Posteriormente se ajustó la turbidez equivalente a 0.5 en la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL) a partir de un cultivo de 18 a 24 horas sembrado en agar Soya tripticaseína (TSA) (BD Bioxon) se inoculó homogéneamente con un hisopo estéril toda la superficie de la placa de agar Mueller-Hinton (BD, Becton Dickison). Posteriormente con ayuda de unas pinzas estériles se colocó los discos con los antibióticos (Becton Dickinson) descritos en la tabla 2 con las concentraciones recomendadas por el CLSI, 2013 (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Por último las placas se incubaron invertidas a 37°C durante 18–24 horas, pasado este tiempo se les midió el halo de inhibición. La interpretación y los puntos de corte utilizados para la evaluación de resistencia a estos antibióticos se realizó siguiendo las normas del CLSI, 2013.

Diagrama 3. Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos.

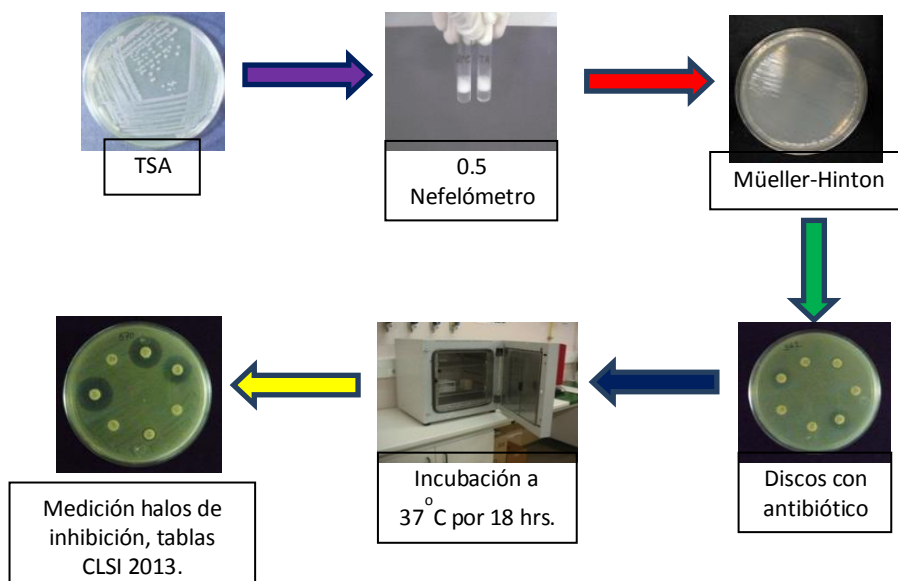


Tabla 2. Antibióticos evaluados en el antibiograma para las 14 cepas de *Citrobacter spp.* (Puntos de corte en los halos de inhibición CLSI, 2013).

Familia de antibiótico	Antibiótico		Concen tración (µg)	Halos de inhibición		
				S	I	R
β-lactámicos	Ampicilina	AMP	10	≥ 17	14-16	≤ 13
	Piperacilina	PIP	100	≥ 21	18-20	≤ 17
	Piperacilina/Tazobactam	TZP	100/10	≥ 22	18-21	≤ 18
	Aztreonam	ATM	30	≥ 21	18-20	≤ 17
	Cefoxitina	FOX	30	≥ 18	15-17	≤ 14
	Cefotaxima	CTX	30	≥ 26	23-25	≤ 22
	Ceftazidima	CAZ	30	≥ 21	18-20	≤ 17
	Cefepime	FEP	30	≥ 18	15-17	≤ 14
	Cefpodoxima	CEP	10	≥ 21	18-20	≤ 17
Quinolonas	Meropenem	MEM	10	≥ 23	20-22	≤ 19
	Ciprofloxacina	CIP	5	≥ 21	16-20	≤ 15
	Levoflaxina	LVX	5	≥ 17	14-16	≤ 13
Aminoglucósidos	Ácido Nalidíxico	NA	30	≥ 19	14-18	≤ 13
	Gentamicina	GM	10	≥ 15	13-14	≤ 12
Sulfonamida	Amikacina	AN	30	≥ 17	15-16	≤ 14
	Trimethoprin/sulfametoxazol	SXT	1.25/23.75	≥ 16	11-15.0	≤ 10

R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible.

Fuente: CLSI, 2013.

La composición de los medios de cultivo y la preparación de reactivos se describe en el anexo 2.

15. Selección de cepas para amplificación de genes.

Las cepas que presentaron resistencia a cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima, cefpodoxima y ceftazidima fueron las candidatas a la amplificación de genes de resistencia que codifican enzimas tipo BLEE.

16. Amplificación de genes BLEE.

La reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de una sola copia.

Con ayuda de esta técnica se amplificaron los genes *bla*_{CTX-M} (y sus variantes), *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{OXA} en las cepas que presentaron resistencia a los antibióticos β-lactámicos en especial a las cefalosporinas de tercera generación, para lo cual se utilizó oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes con los que cuenta el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del CICM (tabla 3).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes BLEE.

Nombre del gen a amplificar	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Referencia
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTXM-UNIVERSAL-F	CGATGTGCAGTACCAGTAA	566	Batchelor, <i>et al.</i> , 2005
	CTXM-UNIVERSAL-R	TTAGTGACCAGAATCAGCGG		
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M13U	GGTAAAAAATCACTGCGYC	843	Briñas, <i>et al.</i> , 2005
	CTX-M13D	TTGGTGACGATTTTAGCCGC		
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M-2-F	ATGATGACTCAGAGCATTTCG	843	Bertrand, <i>et al.</i> , 2006
	CTX-M-2-R	TCAGAAACCGTGGGTTAC		
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M-8-F	TGATGAGACATCGCGTTAAG	871	Hopkins, <i>et al.</i> , 2006
	CTX-M-8-R	TAACCGTCGGTGACGATTTT		
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M9-F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	857	Coque, <i>et al.</i> , 2002
	CTX-M9-R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC		
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-F	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC	1209	Belaouaj, <i>et al.</i> , 1994
	TEM-R	ACGCTCAGTGAACGAAAAC		
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-F	CACTCAAGGATGTATTGTG	883	Pitout <i>et al.</i> , 1998
	SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTCG		
<i>bla_{OXA}</i>	OXA-1	CCAAAGACGTGGATG	442	Briñas, <i>et al.</i> 2003
	OXA-2	GTAAATTCGACCCCAAGTT		

17. Templado para la amplificación.

Extracción por el método de hervido. Esta técnica se basa en la ruptura celular mediante el proceso físico de la ebullición, permitiendo la salida del contenido celular que queda en suspensión. El procedimiento se muestra en el diagrama 4.

Procedimiento.

A partir de un cultivo puro en placa de agar TSA de 24 horas, se recogió aproximadamente la mitad del cultivo y se suspendió en 0.8 mL de agua inyectable, se mezcló con vórtex y se colocó durante 10 minutos en un baño con agua hirviendo. Después de agitar con vórtex durante 10 segundos y dejar enfriar a temperatura ambiente, se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se separó en un tubo eppendorf estéril, se midió la concentración de DNA y se guardó a -20 °C.

Para determinar la concentración y pureza del DNA obtenido se procedió a leer la absorbancia que presenta a 260 y 280 nm con el empleo del NanoDrop (programa NanoDrop 3.0.0). La lectura a 260 nm indica la concentración de DNA teniendo en cuenta que 1 unidad de densidad óptica equivale a 50 µg/mL de DNA de doble hebra. Por otro lado, la pureza del DNA viene determinada por el cociente entre las absorbancias obtenidas a 260 y 280nm. Una preparación pura de DNA daría un cociente entre 1,8 y 2, por lo que si hay contaminación con proteínas o fenol el cociente es menor. Se considera un rango aceptable entre los valores de 200 a 400 ng/µL para utilizar ese templado en la PCR.

Las PCR se realizaron de la siguiente manera: cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL, empleando cada componente por separado como se indica en la Tabla 4.

Diagrama 4. Obtención del templado para la amplificación.

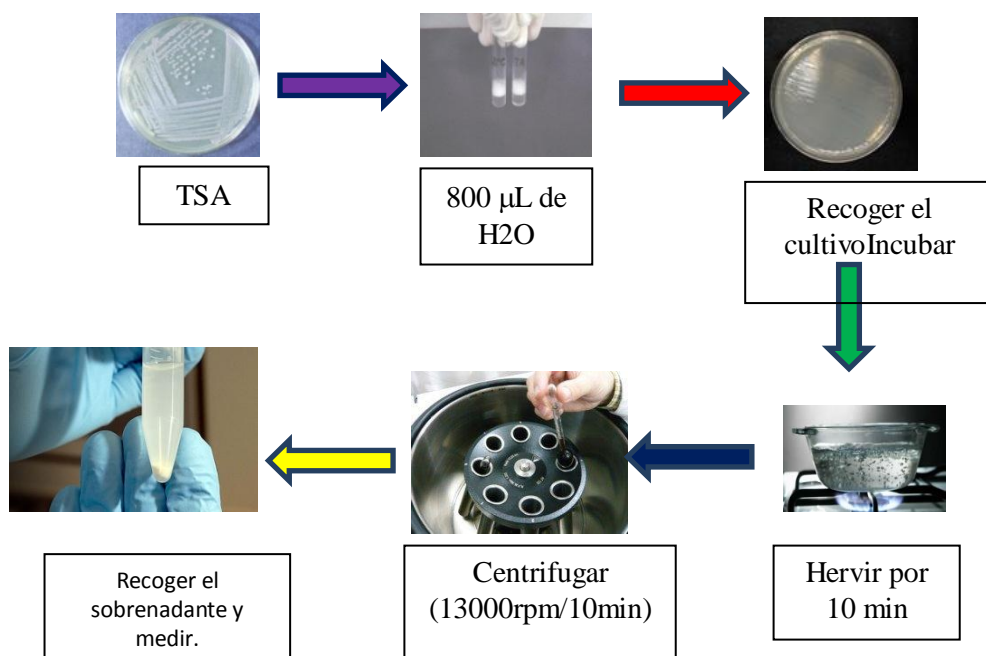


Tabla 4. Componentes utilizados en la PCR.

Componente	Concentración	Volumen 1X
Oligo forward (sigma)	25 mM	0.3 µL
Oligo reverse (sigma)	25 mM	0.3µL
BIOTAQTM DNA Polimerasa (Bioline)	5U/µL	0.1µL
Tampón de reacción NH ₄ (Bioline)	25mM	1.0 µL
MgCl ₂ (Bioline)	25mM	1.0 µL
dNTPs mix (Sigma Aldrich)	10 mM	0.4 µL
Agua	---	5.2 µL
DNA	200-400ng/µL	0.5 µL

18. Condiciones para las PCR's.

Los termocicladores utilizados fueron el Profesional TRIO, Thermocicler, y Labnet de Labnet International, Inc.

Las condiciones de reacción a empleados fueron las que se muestran en la tabla 5 y el procedimiento empleado se muestra en el diagrama 5. En cada PCR se utilizó un blanco que consiste de la misma mezcla de reacción pero sin DNA, en su lugar se coloca el volumen correspondiente de agua libre de nucleasas; y un control positivo donde se utilizó el DNA proveniente del lisado bacteriano de las cepas con el gen de interés ya secuenciado. Para el caso de genes donde no se tenga un control positivo se utilizó un marcador de peso molecular de 3000pb.

Diagrama 5. Procedimiento para la PCR.

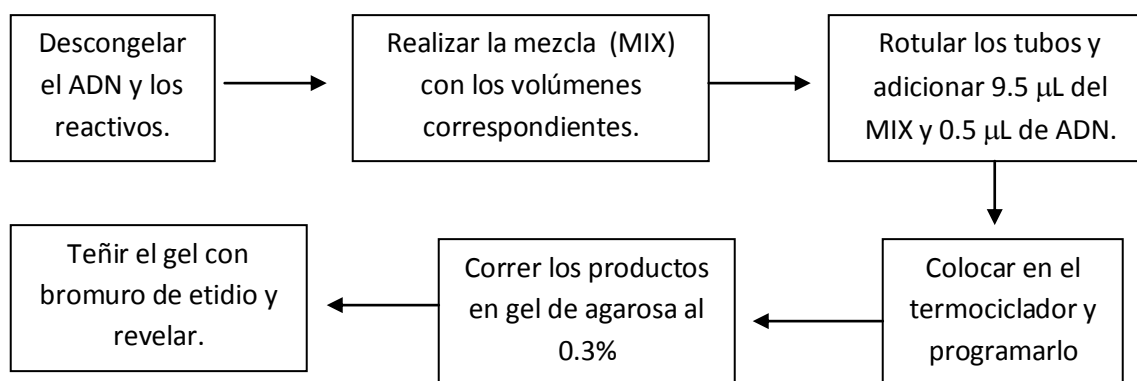


Tabla 5. Condiciones para la amplificación de genes codificantes de BLEE.

Gen a amplificar	Nombre del oligo	Desnaturalización inicial	Ciclos de amplificación			Extensión final	Conservación final
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTXM-UNIVERSAL-F CTXM-UNIVERSAL-R	94 °C / 5 min.	35 ciclos	Desnaturalización	94 °C / 30 seg.	72 °C / 5min	∞ 4 °C
				Alineamiento	52 °C / 30 seg.		
				Extensión	72 °C / 1 min.		
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M13U CTX-M13D	94 °C / 7 min.	35 ciclos	Desnaturalización	94 °C / 50seg.	68 °C / 5 min.	∞ 4 °C
				Alineamiento	50 °C / 40seg.		
				Extensión	68 °C / 1 min.		
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M-2-F CTX-M-2-R	°C / min.	35 ciclos	Desnaturalización	°C / seg.	72 °C / 5 min.	∞ 4 °C
				Alineamiento	°C / seg.		
				Extensión	°C / min.		
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M-8-F CTX-M-8-R	94 °C / 5min.	30 ciclos	Desnaturalización	94 °C / 30 seg.	72 °C / 5min.	∞ 4 °C
				Alineamiento	52 °C / 30 seg.		
				Extensión	72 °C / 1min..		

<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M9-F CTX-M9-R	94 °C / 3 min.	35 ciclos	Desnaturalización	94 °C / 45 seg.	72 °C / 10 min.	∞ 4 °C
				Alineamiento	62°C / 45 seg.		
				Extensión	72 °C / 45 seg.		
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-1 TEM-2	94 °C / 3 min.	30 ciclos	Desnaturalización	94 °C / 1min.	72 °C / 5 min.	∞ 4 °C
				Alineamiento	50 °C / 1min.		
				Extensión	72 °C / 1min.		
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-F SHV-R	96 °C / 15 seg..	24 ciclos	Desnaturalización	96 °C / 15 seg.	72 °C / 3 min.	∞ 4 °C
				Alineamiento	52 °C / 15 seg.		
				Extensión	72 °C / 2min.		
<i>bla_{OXA-1}</i>	OXA-1 OXA-2	96 °C / 5 min.	35 ciclos	Desnaturalización	96 °C / 1 min.	72 °C / 10 min.	∞ 4 °C
				Alineamiento	61 °C / 1 min.		
				Extensión	72 °C / 2min.		

19. Visualización de los productos de PCR.

Los productos de las PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% en una cámara de electroforesis con TAE 1X, a 90 Voltios durante 1 hora junto con un marcador de peso molecular y los respectivos controles (positivo y negativo). Posteriormente los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (BET) 0.5 g/L (anexo 2) por inmersión durante 5 segundos y se lavaron en agua destilada por 1-5 minutos. Para visualizar los fragmentos de DNA, los geles se revelaron en el digitalizador de imágenes (MiniBis Pro) del LMHyC.

20. Purificación de los productos de PCR.

Los productos de PCR que fueron positivos a la amplificación de genes que codifican para BLEE's se purificaron con el kit Gel DNA Recovery Kit, partiendo de un amplificado a un volumen de 80µL y separados en un gel de electroforesis al 1% en 4 pozos, una vez observado el producto se cortó el fragmento del gel que contenía el amplificado de interés con ayuda de un transiluminador. Una vez recuperado el DNA del kit se corrieron 2 mL en un gel de electroforesis para observar la presencia de una sola banda y garantizar la purificación para poder secuenciar, el procedimiento completo se describe en el anexo 3.

21. Secuenciación de los genes amplificados.

Los amplificados de interés puros se mandaron con sus respectivos cebadores a secuenciar al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México, los requerimientos para mandar a secuenciar se describen en el anexo 4.

22. Análisis de las secuencias.

Las secuencias recibidas se visualizaron en el programa Finch TV versión 1.4.0 Geospiza (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) y se analizaron con ayuda de herramientas informáticas en la web (<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>), BLAST 2.0 QBLAST del National Center for Biotechnology Information Site (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/), donde se compararon con las incluidas en la base de datos del GenBank. Los alineamientos se realizaron con el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) y la traducción aminoacídica se realizó en <http://molbiol-tools.ca/>.

RESULTADOS

23. Muestras y cepas de *Citrobacter*.

En la tabla 6 se muestra el lugar y origen de las cepas trabajadas.

Tabla 6. Lugar de origen y cepas.

Origen	Cepas de <i>Citrobacter</i> spp.
HNP	5
Alimentos	5
Portadores	4
Total	14

*HNP: Hospital para el Niño Poblano

Las 14 cepas se confirmaron mediante pruebas bioquímicas clásicas para su identificación y caracterización (mencionadas en material y métodos) de acuerdo al procedimiento del anexo 1. Todas las cepas quedaron confirmadas como se muestra en la tabla 7.

Estas pruebas solo se les realizaron a las cepas que fueron recuperadas del cepario del LMHyC, para confirmar género y especie se envió la cepa A6 recuperada de hojas de cilantro sin desinfectar al laboratorio del HNP para ser analizada con el sistema automatizado VITEK, ésta cepa se utilizó posteriormente como referencia para las otras 8 cepas donadas por el LMHyC, 4 cepas de origen alimentario (alas de pollo) y 4 cepas de portadores (coprocultivos). Las 5 cepas de origen clínico (lesión tumoral y líquido pleural) enviadas por el hospital ya estaban confirmadas en género y especie por lo que se decidió no realizarle las pruebas bioquímicas.



Figura 6. Pruebas bioquímicas (LIA, MIO, citrato y urea respectivamente) características del genero *Citrobacter* spp.

Tabla 7. Pruebas bioquímicas para las cepas de *Citrobacter* spp.

Cepa	TSI			LIA		MIO			Citrato	Urea
	H ₂ S	Gas	pH	L	H ₂ S	M	I	O		
A6	+	-	A/A	+	+	+	-	+	+	-
362	+	-	A/A	+	+	+	-	+	+	-
385	+	-	A/A	+	+	+	-	+	+	-
395	+	-	A/A	+	+	+	-	+	+	-
400	+	-	A/A	+	+	+	-	+	+	-
453	+	-	A/A	+	+	+	-	+	+	-
454	+	-	A/A	+	+	+	-	+	+	-
458	+	-	A/A	+	+	+	-	+	+	-
460	+	-	A/A	+	+	+	-	+	+	-

TSI: triple azúcar hierro, H₂S: ácido sulfhídrico; L: lisina; M: movilidad; I: indol; O: ornitina

+: resultado positivo

-: resultado negativo

Algunas de las cepas donadas por el HNP fueron aisladas del mismo paciente como se muestra en los datos de origen de cepas de *Citrobacter* spp., en la tabla 8. Al mismo tiempo, el origen clínico de cada cepa fue variado, mismo que se muestra de manera general en la gráfica 1, de igual manera en la gráfica 2 se muestra el origen de las cepas provenientes de muestras alimentarias. Las cepas de origen alimentario procedieron de alas de pollo crudo y hojas de cilantro sin

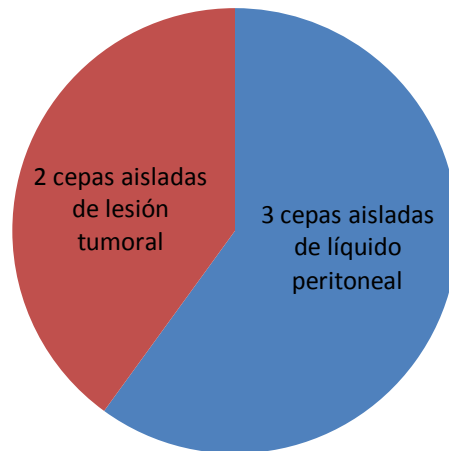
desinfectar. En el caso de las cepas aisladas de portadores el origen solo fue de coprocultivos.

Tabla 8. Datos de las cepas aisladas de *Citrobacter* spp.

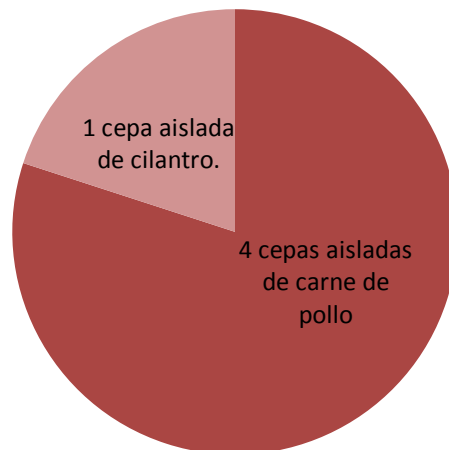
Cepa	Hospital/ Alimento	Bacteria	Paciente	Edad (años)	Sexo	Origen
362	Pollo	<i>C. freundii</i>	-----	-----	-----	Alas de pollo
385	Pollo	<i>C. freundii</i>	-----	-----	-----	Alas de pollo
395	Pollo	<i>C. freundii</i>	-----	-----	-----	Alas de pollo
400	Pollo	<i>C. freundii</i>	-----	-----	-----	Alas de pollo
A6	Cilantro	<i>C. freundii</i>	-----	-----	-----	Hojas
453	Portador	<i>C. freundii</i>	1	-----	F	Coprocultivo
454	Portador	<i>C. freundii</i>	2	22	M	Coprocultivo
458	Portador	<i>C. freundii</i>	3	-----	F	Coprocultivo
460	Portador	<i>C. freundii</i>	4	-----	F	Coprocultivo
A7	HNP	<i>C. brakii</i>	5	10.6	M	Líquido peritoneal
A8	HNP	<i>C. freundii</i>	6	13.5	M	Líquido peritoneal
A9	HNP	<i>C. youngoe</i>	7	9.4	M	Lesión tumoral antebrazo I.
A10	HNP	<i>C. youngoe</i>	7	9.4	M	Lesión tumoral Antebrazo I.
A11	HNP	<i>C. freundii</i>	8	16.9	F	Líquido peritoneal

F: femenino M: masculino

Nota: Las cepas que se marcan del mismo color provienen del mismo paciente.



Grafica 1. Origen de aislamiento de las cepas de *Citrobacter* spp., clínicas.



Grafica 2. Origen de los aislamientos de *Citrobacter* spp., de alimentos.

24. Perfil de susceptibilidad de las cepas de *Citrobacter* spp.

A las 14 cepas se les realizó el perfil de resistencia por el método de Kirby-Baüer, como se describe en material y métodos. Los resultados se muestran en la tabla 9.

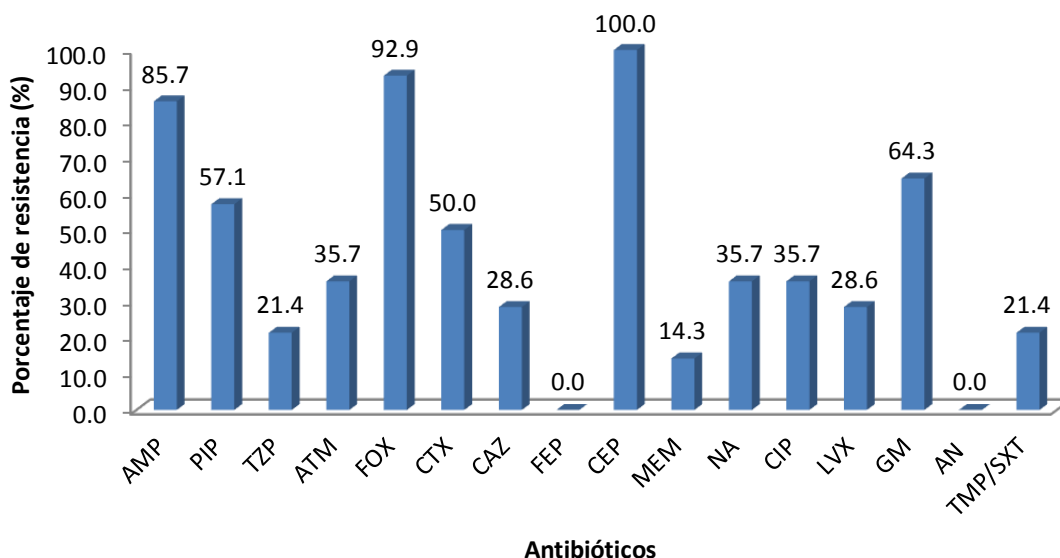
Tabla 9. Perfil de susceptibilidad de las cepas de *Citrobacter* spp., por el método de Kirby-Baüer.

Cepa	Origen	β-lactámicos										Quinolonas			Aminoglucósidos		Inhibidor/sulafa
		AMP	PIP	TZP	ATM	FOX	CTX	CAZ	FEP	CEP	MEM	NA	CIP	LVX	GM	AN	TMP/SXT
A6	Alimento (H. de cilantro)	S	R	S	R	R	R	S	I	R	I	I	S	S	S	S	S
362	Alimento (ala de pollo)	R	R	S	R	I	R	R	S	R	S	R	R	R	R	S	I
385	Alimento (ala de pollo)	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	S	I
395	Alimento (ala de pollo)	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	S	R
400	Alimento (ala de pollo)	R	R	S	I	R	R	I	S	R	S	R	R	R	R	S	R
453	Portador	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
454	Portador	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
458	Portador	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
460	Portador	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S
A7	Clínica	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	S	R	S	S
A8	Clínica	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	I	S	S	S	S	S
A9	Clínica	R	S	I	S	R	I	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S
A10	Clínica	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
A11	Clínica	R	S	S	S	R	I	S	S	R	I	I	R	S	R	S	S

R: resistente (amarillo), S: sensible (verde), I intermedio (azul)

AMP: ampicilina; PIP: piperacilina, TZP: piperacilina/tazobactam; ATM: aztreonam; FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CEP: cefepime; CEP: cefpodoxima; MEM: meropenem; NA: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacina; LVX: levofloxacina; GM: gentamicina; AN: amikacina; TMP/SXT trimethoprin/sulfametoxazol.

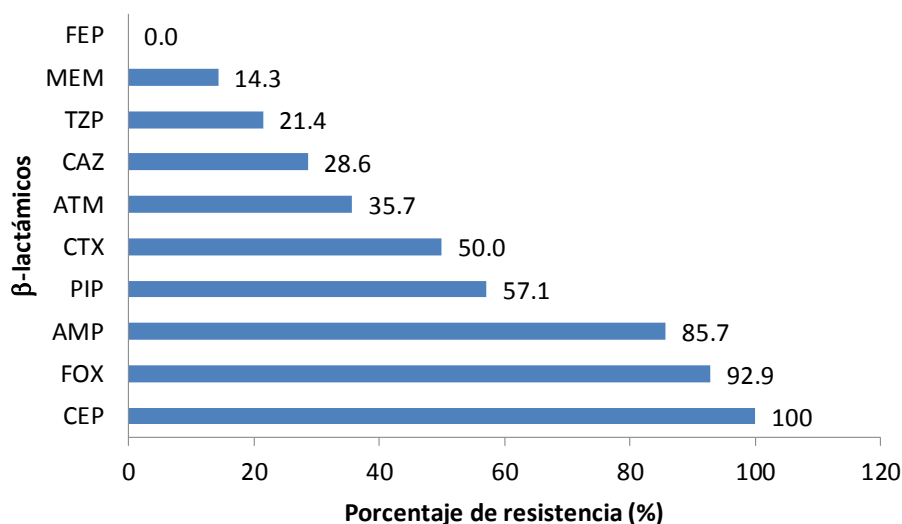
En la gráfica 3 se muestra el perfil de susceptibilidad de las cepas evaluadas de *Citrobacter* spp. De las 14 cepas evaluadas con diferentes familias de antibióticos se encontró una alta resistencia a 3 β-lactámicos; 100% (14/14) a cefpodoxima (CEP), 100 % (9/9) a cefoxitina (FOX), 85.7% (12/14) a ampicilina (AMP). Además se encontraron 2 cepas resistentes a meropenem asiladas de pacientes pediátricos, el único carbapenem evaluado. Cabe destacar que en este trabajo se reportan 2 cepas como sensibles a ampicilina, sin embargo el CLSI 2013 recomienda reportar como resistentes a aquellas cepas que sean susceptibles a ampicilina debido a la resistencia intrínseca que presenta *C. spp.*, a este antibiótico por la presencia de la β-lactamasa AMC de origen cromosómico. De esta forma cuando se inicia el tratamiento con este tipo de antibióticos después de unos días las cepas se vuelven resistentes debido a la desrepresión del gen *bla_{AMP}*. En la familia de las quinolonas se encontró baja resistencia, sin embargo se encontró resistencia del 35.7% a dos de las quinolonas de primera elección, ciprofloxacina (CIP) y ácido nalidíxico (NA). También se encontraron cepas resistentes a gentamicina (GM) 64.3% (9/14) y a trimethoprin/sulfametoxazol (TMP/SXT) del 21.4% (3/14).



Gráfica 3. Perfil de susceptibilidad de la cepas de *Citrobacter* spp., aisladas de alimentos, casos clínicos y de portadores.

A continuación se muestran los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos β -lactámicos en las cepas de *Citrobacter* spp., ensayadas en este trabajo.

En la grafica 4 se muestra el patrón de resistencia en orden ascendente de las 14 cepas ensayadas, encontrando que la mayor resistencia fue para los antibióticos CEP (100%), FOX (92.9%) AMP (85.7%), PIP (57.1%) y CTX (50%) en todas las cepas estudiadas.



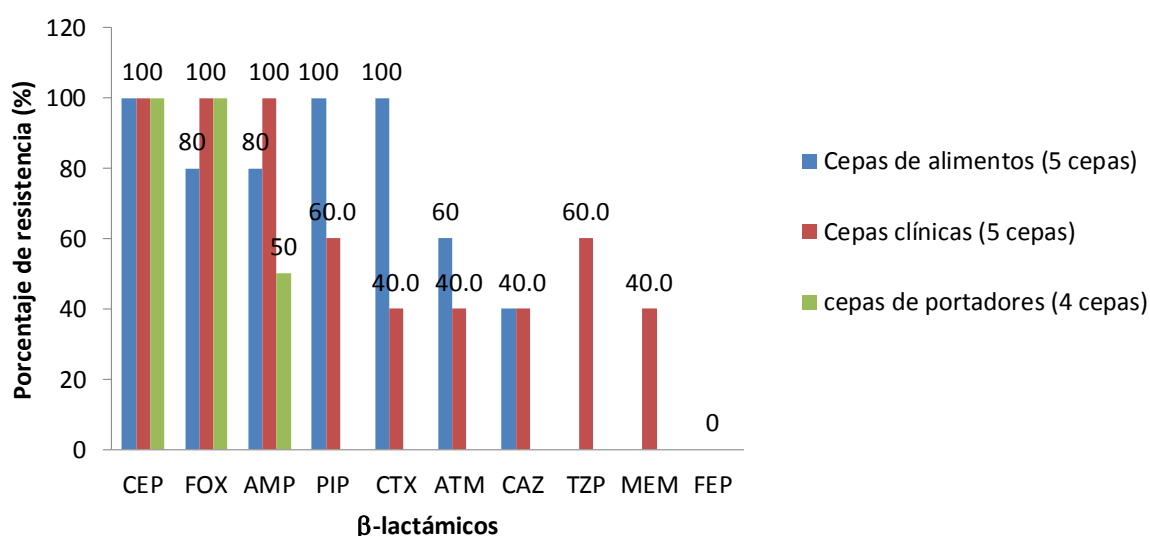
Gráfica 4. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos β -lactámicos evaluados en las 14 cepas de *Citrobacter* spp.

En la gráfica 5 se muestran los resultados de susceptibilidad en las cepas de origen clínico, alimentario y de portadores.

De las 5 cepas de origen clínico se encontró una alta resistencia a los siguientes antibióticos β -lactámicos; 100% (5/5) a cefpodoxima (CEP), 100 % (5/5) a cefoxitina (FOX) y 100% (5/5) a ampicilina (AMP) además de 2 cepas resistentes a

meropenem. De las 5 cepas de origen alimentario se encontró una resistencia del 100% (5/5) a 3 antibióticos β -lactámicos; cefpodoxima (CEP), Piperacilina (PIP) y cefotaxima (CTX). En menor proporción se encontró resistencia a cefoxitina y ampicilina, encontrando un 80% (4/5) de resistencia para ambos antibióticos.

En las 4 cepas de portadores se encontró una resistencia del 100% (4/4) a cefpodoxima y cefoxitina, una resistencia del 50% (2/4) a ampicilina y sensibilidad para el resto de antibióticos evaluados.



Gráfica 5. Perfil de resistencia a los β -lactámicos evaluados en las cepas de origen alimentario, clínico y de portadores.

CEP: Cefpodoxima; FOX: cefoxitina; AMP: ampicilina; PIP: piperacilina; CTX: cefotaxima; ATM: aztreonam; CAZ: Ceftazidima; : TZP: piperacilina/tazobactam; MEM: meropenem; FEP: cefepime.

25. Amplificación de genes de resistencia.

Para cumplir con este objetivo se seleccionaron 7 cepas que presentaron resistencia a 2 o más cefalosporinas de 3ra generación, dichas cepas seleccionadas se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Cepas seleccionadas para la amplificación de genes codificantes para BLEE.

Cepa	Hospital /alimento	Bacteria	Paciente	Edad (años)	Sexo	Origen	Perfil de resistencia								
							AMP	PIP	TZP	ATM	FOX	CTX	CAZ	CEP	MEM
362	Pollo	<i>C. freundii</i>				Alimentario	R	R	S	R	I	R	R	R	S
385	Pollo	<i>C. freundii</i>			R		R	S	R	R	R	R	R	S	
395	Pollo	<i>C. freundii</i>			R		R	S	S	R	R	S	R	S	
400	Pollo	<i>C. freundii</i>			R		R	S	I	R	R	I	R	S	
A6	Cilantro	<i>C. freundii</i>			S		R	S	R	R	R	S	R	I	
A7	HNP	<i>C. brakii</i>	5	10.6	M	Clínico	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A8	HNP	<i>C. freundii</i>	6	13.5	M		R	R	R	R	R	R	R	R	I

CEP: Cefpodoxima; FOX: cefoxitina; AMP: ampicilina; PIP: piperacilina; CTX: cefotaxima; ATM: aztreonam; CAZ: Ceftazidima; : TZP: piperacilina/tazobactam; MEM: meropenem; FEP: cefepime.

Nota: Las columnas del mismo color indican los antibióticos a los que fueron resistentes las cepas de *Citrobacter* spp. que fueron seleccionadas para el amplificado de genes que codifican para BLEE's.

En la tabla 11 se muestra de manera general los amplificadores positivos para genes que codifican para BLEE.

Tabla 11. Amplificados positivos para genes que codifican para BLEE.

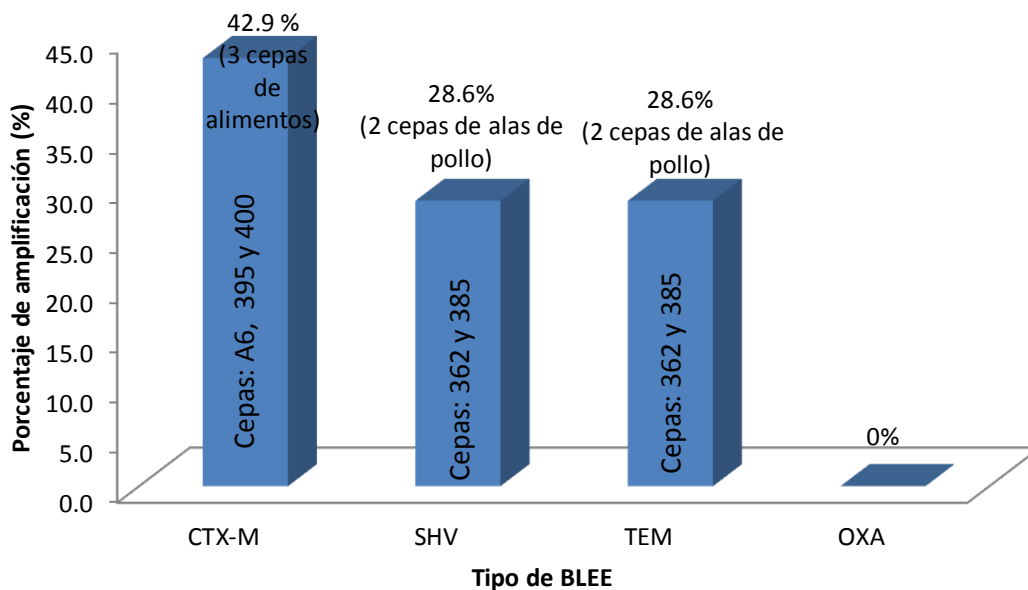
Cepa	Origen	Bacteria	Amplificados.			
			<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{OXA-1}
362	Alas de pollo	<i>C. freundii</i>	-	+	+	-
385	Alas de pollo	<i>C. freundii</i>	-	+	+	-
395	Alas de pollo	<i>C. freundii</i>	+	-	-	-
400	Alas de pollo	<i>C. freundii</i>	+	-	-	-
A6	Hojas de cilantro	<i>C. freundii</i>	+	-	-	-
A7	Clínico	<i>C. brakii</i>	-	-	-	-
A8	Clínico	<i>C. freundii</i>	-	-	-	-

+: Positivo al amplificado.

-: Negativo al amplificado.

Nota: en esta tabla se muestra el amplificado para el gen *bla*_{CTX-M} con los oligonucleótidos universales.

De las 7 cepas seleccionadas para amplificación de genes que codifican para BLEE, el 42.9% (3/7) amplificó el gen *bla*_{CTX-M} (3 cepas de alimentos; 1 cepa aislada de hojas de cilantro y 2 cepas aisladas de alas de pollo crudo); el 28.6% 2/7 amplificó el gen *bla*_{SHV} (2 cepas aisladas de alas de pollo); el 28.6% amplificó el gen *bla*_{TEM} (2 cepas aisladas de alas de pollo) y ninguna de las 7 cepas seleccionadas amplificó para el gen *bla*_{OXA-1} (gráfica 6).



Gráfica 6. Porcentaje de amplificación mediante PCR de genes codificantes para BLEE en las 7 cepas seleccionadas.

En las figuras 7 a la 10 se muestran amplificados de los genes codificantes para BLEE en las cepas seleccionadas:

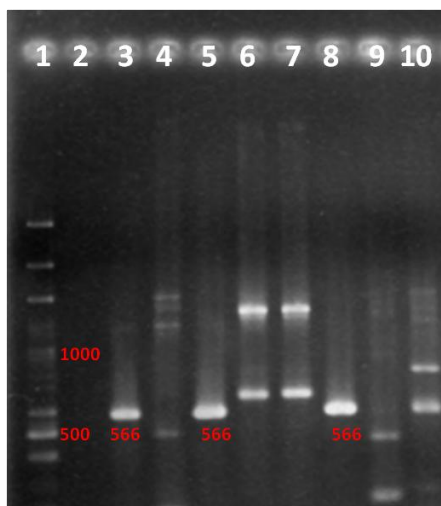


Figura 7. Amplificación del gen *bla*_{CTX-M} (universal). Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: control negativo, carril 3: control positivo (cepa 1550), carriles 4-10: cepas A8, A6, 362, 385, 395, A7 y 400 de *Citrobacter* spp.

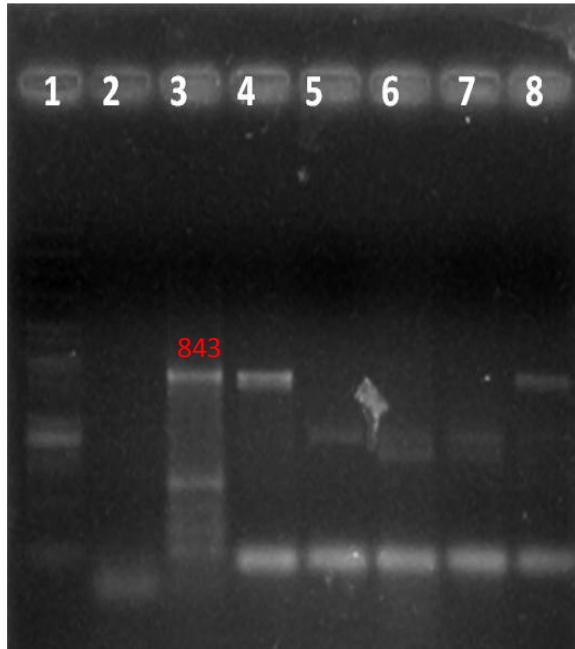


Figura 8. Amplificación del gen *bla*_{CTX-M-1}. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: control negativo, carril 3: control positivo (cepa 1550), carriles 4-8: cepas A6, 400, 362, 385 y 395 de *Citrobacter* spp.

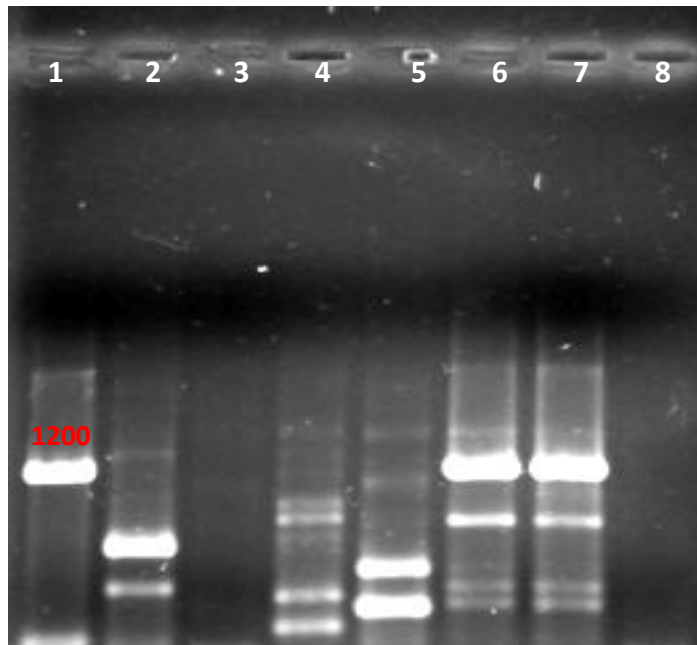


Figura 9. Amplificación del gen *bla*_{TEM}. Carril 1: control positivo (cepa 560), carril 2-8): cepas A7, A6, A8, 400, 385, 362 y control negativo.

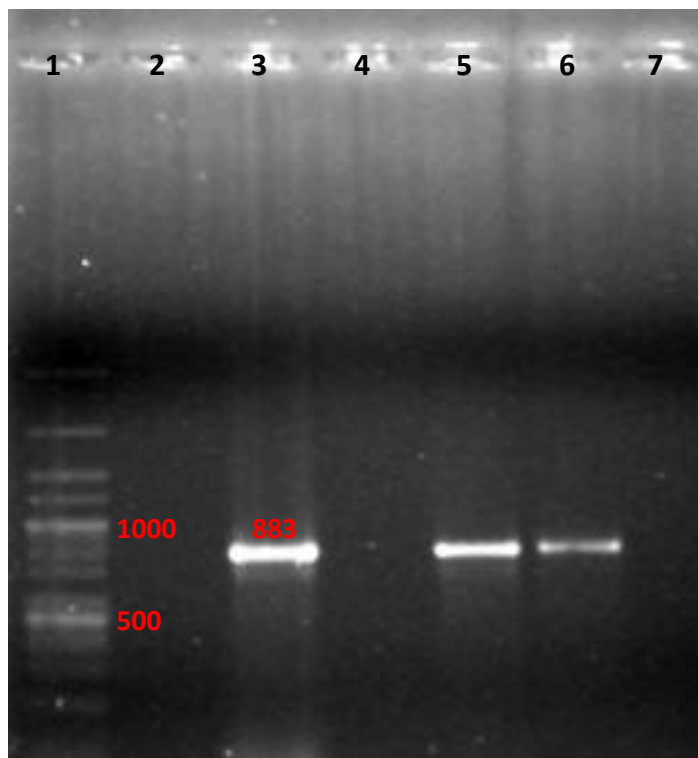


Figura 10. Amplificación del gen *bla*_{SHV}. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: control negativo, carril 3: control positivo (cepa 560), carriles 4-7: cepas A6, 362, 385 y 395 de *Citrobacter* spp

26. Secuenciación de genes que codifican para BLEE.

Los amplificadores positivos para genes BLEE obtenidos se purificaron con el kit mencionado en material y métodos y se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM. Posteriormente se analizaron las secuencias con ayuda del programa FichTV versión 1.4. De estos amplificadores solo se mandó a secuenciar un gen de cada amplificado, de esta forma para la BLEE CTX-M se mandó a secuenciar la cepa 395, para la BLEE SHV la cepa 362 y para la BLEE TEM la cepa 385.

27. BLEE CTX-M.

Al realizar el alineamiento en el Genbank se encontró una identidad del 99% con dos variantes del gen *bla*_{CTX-M} del grupo 1, la variante 3 (Sequence ID: [emb|HF549092.1|](#)) y la variante 22 (Sequence ID: [gb|JN676832.1|](#))

A continuación se muestra el alineamiento de las variantes 3 y 22 con la secuencia obtenida del amplificado positivo para el gen *bla*_{CTX-M} del grupo 1.

CTX_M_3: Variante 3 del gen *bla*_{CTX-M}

CTX_M_3: Variante 22 del gen *bla*_{CTX-M}

CTX_M_395: Cepa 395

```
CTX_M_3      ---ATGGTTAAAAAATCACTGCGCCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTG  57
CTX_M_22     CCCATGGTTAAAAAATCACTGCGCCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTG  60
CTX_M_395    -----GC-----ACCGTCACGCTG  16
                                     **                               *****

CTX_M_3      TTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAA  117
CTX_M_22     TTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAA  120
CTX_M_395    TTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAA  76
*****

CTX_M_3      TTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAAATTCG  177
CTX_M_22     TTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAAATTCG  180
CTX_M_395    TTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAAATTCG  136
*****

CTX_M_3      CAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCC  237
CTX_M_22     CAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCC  240
CTX_M_395    CAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCC  196
*****
```

```

CTX_M_3      GCGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAG 297
CTX_M_22     GCGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAG 300
CTX_M_395    GCGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAG 256
*****

CTX_M_3      ATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACG 357
CTX_M_22     ATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACG 360
CTX_M_395    ATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACG 316
*****

CTX_M_3      ATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAAT 417
CTX_M_22     ATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAAT 420
CTX_M_395    ATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAAT 376
*****

CTX_M_3      AAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCCACAGCTGGGA 477
CTX_M_22     AAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCCACAGCTGGGA 480
CTX_M_395    AAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCCACAGCTGGGA 436
*****

CTX_M_3      GACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCGGGGCGAT 537
CTX_M_22     GACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCGGGGCGAT 540
CTX_M_395    GACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCGGGGCGAT 496
*****

CTX_M_3      CCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCGCGGAATCTGACGCTGGGT 597
CTX_M_22     CCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCGCGGAATCTGACGCTGGGT 600
CTX_M_395    CCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCGCGGAATCTGACGCTGGGT 556
*****

CTX_M_3      AAAGCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACC 657
CTX_M_22     AAAGCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACC 660
CTX_M_395    AAAGCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACC 616
*****

CTX_M_3      GGTGCAGCGAGCATTACAGGCTGGACTGCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGGATAAAACCGGC 717
CTX_M_22     GGTGCAGCGAGCATTACAGGCTGGACTGCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGGATAAAACCGGC 720
CTX_M_395    GG----- 618
**

CTX_M_3      AGCGGTGACTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCG 777
CTX_M_22     AGCGGTGACTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCG 780
CTX_M_395    -----

CTX_M_3      CTGATTCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATGTA 837
CTX_M_22     CTGATTCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATGTA 840
CTX_M_395    -----

CTX_M_3      TTAGCGTCGGCGGCTAAAATCGTCACCACCGGTTTGTAATAG----- 879
CTX_M_22     TTAGCGTCGGCGGCTAAAATCGTCACCACCGGTTTGTAATAGCGGAAACGG 891
CTX_M_395    -----

```

Nota: en color verde se muestra la diferencia entre la variante 3 y 22.

La diferencia éntre la variante 3 y 22 se encuantra en la posición 865 donde la variante 3 presenta el nucleótido Guanina (G) y la variante 22 el nucleótido Adenina (A). El

oligonucleótido reverso utilizado para la amplificación de este gen se alinea justamente en la posición donde se encuentra la discriminación entre la variante 3 y 22. Por lo general los extremos de la secuenciación son difíciles de trabajar por lo que se eliminan, considerando este echo, resulto imposible establecer la variante del gen amplificado.

28. BLEE SHV.

Tras la secuenciación de la cepa 362, se encontró en el Genbank una identidad del 100% con el gen *bla_{SHV-12}*.

A continuación se muestra el alineamiento de la secuencia obtenida del amplificado positivo para el gen *bla_{SHV}* con el gen *bla_{SHV-12}*

```

SHV12          CTCAAGGATGTATTGTGGTTATGCGTTATATTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAG 60
CF362          TCACTCAAGGATGTATTGTGGTTATGCGTTATATTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAG 60
                *****

SHV12          CCACCCCTGCCGCTGGCGGTACACGCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAACAAAGCG 120
CF362          CCACCCCTGCCGCTGGCGGTACACGCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAACAAAGCG 120
                *****

SHV12          AAAGCCAGCTGTCGGGCCGCGTAGGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCGCACGC 180
CF362          AAAGCCAGCTGTCGGGCCGCGTAGGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCGCACGC 180
                *****

SHV12          TGACCGCTGGCGCGCCGATGAACGCTTTCCCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTCT 240
CF362          TGACCGCTGGCGCGCCGATGAACGCTTTCCCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTCT 240
                *****

SHV12          GCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACT 300
CF362          GCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACT 300
                *****

SHV12          ATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGCA 360
CF362          ATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGCA 360
                *****

SHV12          TGACGGTCGGCGAACTCTGCGCCGCCGCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCCGCCAATC 420
CF362          TGACGGTCGGCGAACTCTGCGCCGCCGCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCCGCCAATC 420
                *****

```

```

SHV12      TGCTGCTGGCCACCGTCGGCGGCCCGCCGAGGATTGACTGCCTTTTTTGCGCCAGATCGGCG 480
CF362      TGCTGCTGGCCACCGTCGGCGGCCCGCCGAGGATTGACTGCCTTTTTTGCGCCAGATCGGCG 480
*****

SHV12      ACAACGTCACCCGCCTTGACCGCTGGGAAACGGAAGTGAATGAGGCGCTTCCCGGGCGACG 540
CF362      ACAACGTCACCCGCCTTGACCGCTGGGAAACGGAAGTGAATGAGGCGCTTCCCGGGCGACG 540
*****

SHV12      CCCGCGACACCACTACCCCGGCCAGCATGGCCGCGACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCC 600
CF362      CCCGCGACACCACTACCCCGGCCAGCATGGCCGCGACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCC 600
*****

SHV12      AGCGTCTGAGCGCCCGTTTCGCAACGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTTCG 660
CF362      AGCGTCTGAGCGCCCGTTTCGCAACGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTTCG 660
*****

SHV12      CCGGACCGTTGATCCGCTCCGTGCTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGGAG 720
CF362      CCGGACCGTTGATCCGCTCCGTGCTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGGAG 720
*****

SHV12      CTAGCAAGCGGGGTGCGCGCGGGATTGTTCGCCCTGCTTGGCCCGAATAACAAAGCAGAGC 780
CF362      CTAGCAAGCGGGGTGCGCGCGGGATTGTTCGCCCTGCTTGGCCCGAATAACAAAGCAGAGC 780
*****

SHV12      GCATTGTGGTGATTTATCTGCGGGATACGCCGGCGAGCATGGCCGAGCGAAATCAGCAAA 840
CF362      GCATTGTGGTGATTTATCTGCGGGATACGCCGGCGAGCATGGCCGAGCGAAATCAGCAAA 840
*****

SHV12      T 841
CF362      T 841

```

A pesar de la identidad del 100% con la varinate 12, se encontró identidad también con la variante 5 y 1 las cuales difieren del la variante 12 por la presencia del aminoácido Leucina (L) en vez de Glutamina (Q) en la posición 31.

Para la discriminación entre la variante 12 y 5 se realizó la alineación aminoacídica entre las variantes 5, 1, 12 y la secuencia de la cepa 362.

```

SHV_5_KP      -----MRYIRLCIISLLATLPLAVHASPPLEQIKLSESQLSGRVGMIEMDLASGRTL 53
SHV_1_EC      -----MRYIRLCIISLLATLPLAVHASPPLEQIKLSESQLSGRVGMIEMDLASGRTL 53
SHV_12_EC     -----MRYIRLCIISLLATLPLAVHASPPLEQIKLSESQLSGRVGMIEMDLASGRTL 53
SHVCF362      TQGCIVVMRYIRLCIISLLATLPLAVHASPPLEQIKLSESQLSGRVGMIEMDLASGRTL 60
*****

SHV_5_KP      TAWRADERFPMMSTFKVVLCGAVLARVDAGDEQLERKIHYRQQDLVDYSPVSEKHLADGM 113
SHV_1_EC      TAWRADERFPMMSTFKVVLCGAVLARVDAGDEQLERKIHYRQQDLVDYSPVSEKHLADGM 113
SHV_12_EC     TAWRADERFPMMSTFKVVLCGAVLARVDAGDEQLERKIHYRQQDLVDYSPVSEKHLADGM 113
SHVCF362      TAWRADERFPMMSTFKVVLCGAVLARVDAGDEQLERKIHYRQQDLVDYSPVSEKHLADGM 120
*****

```

```

SHV_5_KP      TVGELCAAATMSDNSAANLLLATVGGPAGLTAFLRQIGDNVTRLDRWETELNEALPGDA 173
SHV_1_EC      TVGELCAAATMSDNSAANLLLATVGGPAGLTAFLRQIGDNVTRLDRWETELNEALPGDA 173
SHV_12_EC     TVGELCAAATMSDNSAANLLLATVGGPAGLTAFLRQIGDNVTRLDRWETELNEALPGDA 173
SHVCF362      TVGELCAAATMSDNSAANLLLATVGGPAGLTAFLRQIGDNVTRLDRWETELNEALPGDA 180
                *****

SHV_5_KP      RDTTTPASMAATLRKLLTSQRLSARSQRQLLQWMVDDRVRVAGPLIRSVLPAGWFIADKTGA 233
SHV_1_EC      RDTTTPASMAATLRKLLTSQRLSARSQRQLLQWMVDDRVRVAGPLIRSVLPAGWFIADKTGA 233
SHV_12_EC     RDTTTPASMAATLRKLLTSQRLSARSQRQLLQWMVDDRVRVAGPLIRSVLPAGWFIADKTGA 233
SHVCF362      RDTTTPASMAATLRKLLTSQRLSARSQRQLLQWMVDDRVRVAGPLIRSVLPAGWFIADKTGA 240
                *****

SHV_5_KP      SKRGARGIVALLGPNNAERIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAALIEHWQR 286
SHV_1_EC      GERGARGIVALLGPNNAERIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAALIEHWQR 286
SHV_12_EC     SKRGARGIVALLGPNNAERIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAA----- 279
SHVCF362      SKRGARGIVALLGPNNAERIVVIYLRDTPASMAERNQQ----- 279
                .:*****

```

Nota: la discriminación entre las variantes se muestra de color verde y rojo.

La secuencia de la cepa 362 y SHV-12 difieren de las variantes 1 y 5 en la posición 31, de esta forma se concluyó que la secuencia obtenida para la cepa 362 corresponde a la variante 12 del gen *bla_{SHV}*. Encontrando así la BLEE SHV-12.

29. BLEE TEM.

Para el caso del gen *bla_{TEM}* de la cepa 385, el tamaño de la secuenciación obtenida fue muy corta (aproximadamente 400pb) ya que se esperaba un tamaño de 1202pb, sin embargo, la secuencia obtenida se alineó en el Genbank y se encontró similitud con muchas variantes del gen *bla_{TEM}*.

Se alineó con la secuencia con número de referencia [gb|JF775516.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gb|JF775516.1) con la cual compartió identidad del 99% como se muestra a continuación.

```

bla_TEM_1      --TTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA 58
cepa_385      CTTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA 60
                *****

bla_TEM_1      CCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGA 118
cepa_385      CCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGA 120
                *****

bla_TEM_1      GCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGAAAATGTTGA 178
cepa_385      GCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGAAAATGTTGA 180
                *****

```

```

bla_TEM_1      ATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTACCAGGGTTATTGTCTCATG 238
cepa_385      ATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTACCAGGGTTATTGTCTCATG 240
*****

bla_TEM_1      AGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTT 298
cepa_385      AGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTT 300
*****

bla_TEM_1      CCCCAGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAA 358
cepa_385      CCCCAGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACAT-AACCTATAAA 359
*****:***

bla_TEM_1      AA 360
cepa_385      A- 360
*
```

Debido a la poca cantidad de secuencia no se pudo establecer la variante de éste gen.

30. Análisis de las secuencias obtenidas.

Una vez obtenidas las secuencias analizaron en el Genbank, posteriormente se alinearon en el sistema informático <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> . Para el gen *bla*_{CTXM} no se pudo establecer la variante amplificada ya que el cebador reverso se alinea justamente en el sitio donde dos de las variantes difieren. Para el caso de del gen *bla*_{SHV} se encontró la variante 12 y para el gen *bla*_{TEM} tampoco se pudo establecer la variante. Los resultados obtenidos sel análisis de las secuencias se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Variantes de los genes secuenciados codificantes para BLEE.

Cepa	origen	Bacteria	Gen		
			<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}
362	Ala de pollo	<i>C. freundii</i>	-----	<i>bla</i> _{SHV-12}	-----
385	Ala de pollo	<i>C. freundii</i>	-----	-----	<i>bla</i> _{TEM}
395	Ala de pollo	<i>C. freundii</i>	<i>bla</i> _{CTX-M gpo. 1}	-----	-----

DISCUSIÓN

Tras el descubrimiento de la penicilina hace ya más de 80 años se marcó una nueva era en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, esto supuso un gran avance en la medicina que logró controlar graves procesos infecciosos que terminaban en su mayoría en la muerte. Sin embargo, tras generalizar el uso de sustancias antimicrobianas y tras el uso indiscriminado de estas durante varios años, las bacterias empezaron a desarrollar mecanismos para evadir el efecto de dichas sustancias, iniciando así un grave problema de Salud Pública conocido como resistencia bacteriana a los antibióticos. Esto propició el alargamiento de las estancias hospitalarias haciendo del tratamiento de estas personas más costoso y generalmente terminaban con la muerte.

De los primeros mecanismos de resistencia descubiertos y más estudiados, se encuentra la producción de β -lactamasas que hidrolizan el anillo β -lactámico de los antibióticos β -lactámicos originando compuestos sin actividad antimicrobiana como el ácido peniciloico. Dentro de éste mecanismo encontramos las β -lactamasas de amplio espectro (BLEE) que tienen la peculiaridad de hidrolizar antibióticos de primera elección y desde su descubrimiento por Knothe *et al* en 1983, se consideraron como un importante problema a nivel hospitalario. Durante esa época las cefalosporinas de amplio espectro hidrolizadas por estas enzimas suponían los últimos recursos en cuanto a la terapia con antibióticos β -lactámicos, pero 2 años más tarde se pudo disponer de los carbapenémicos como alternativa.

Los primeros aislados productores de BLEE estaban asociados a *Klebsiella pneumoniae* causantes de brotes nosocomiales, en su mayoría en la unidad de cuidados intensivos que producían enzimas del tipo SHV y TEM (Paterson et al 2005). En la actualidad se han encontrado este tipo de enzimas en diferentes aislados incluyendo a los de la comunidad como *E. coli* sobretodo con producción de enzimas de tipo CTX. La diseminación tiene múltiples factores entre ellos la dispersión clonal

además de los elementos genéticos móviles (integrones, transposones y plásmidos) a los que se asocian los genes *bla*_{BLEE}.

En este trabajo se estudió el aspecto genotípico de aislados con posible producción de BLEE provenientes del Hospital para el Niño Poblano (5 cepas) y del cepario del LMHyC del CICM (4 cepas de portadores y 5 cepas de origen alimentario). Particularmente se trabajo con cepas de *Citrobacter freundii* (11 cepas), *Citrobacter youngoe* (2 cepas) y *Citrobacter brakii* (1 cepa) debido a que es una bacteria oportunista importante en el área de cuidados neonatales además de numerosos procesos infecciosos en instituciones de salud; a esta bacteria también se le considera como un reservorio importante de genes productores de BLEE y resistencia a quinolonas mediadas por plásmidos, siendo un agente útil para monitorizar la diseminación de dichos genes y con ello los posibles cambios epidemiológicos.

Se incluyeron cepas de origen alimentario y cepas de origen clínico y de portadores. En el primer caso se trabajo con 5 cepas: 1 proveniente de cilantro como alimento crudo y 4 provenientes de carne de pollo de diferentes centros comerciales del estado de Puebla. En el segundo caso se trabajo con 9 cepas: 5 provenientes de aislados clínicos y 4 del coprocultivo de portadores humanos, todas las cepas se recolectaron en un periodo de 6 meses (01 de julio a 30 diciembre de 2013).

El perfil de resistencia de las 14 cepas fue alto encontrando una resistencia por encima del 80% a cefpodoxima, cefoxitina y ampicilina, seguido de piperacilina y cefotaxima con un 57% y 50% respectivamente. De las 5 cepas de origen alimentario se encontró una resistencia del 100% (5/5) a 3 β -lactámicos: cefpodoxima, Piperacilina y cefotaxima.

Estos valores resultan realmente preocupantes para ambos casos evaluados. En el caso clínico se encontraron dos cepas de origen pediátrico con resistencia a meropenem, un carbapenemico que se considera dentro de las últimas alternativas en la terapéutica microbiana y considerando que provienen de un hospital donde se atienden niños los cuales son pacientes altamente inmunocomprometidos siendo

susceptibles a infecciones ya que la mayoría de estos niños tienen cáncer, traumatismos además de quemaduras y otras infecciones que los hacen aún más vulnerables.

En el caso de las cepas de origen alimentario los resultados son también alarmantes ya que estas cepas son altamente resistentes a los β -lactámicos de primera elección y a cefalosporinas de 2da y 3ra generación lo cual indica la fácil propagación de los mecanismos de resistencia aquí estudiados en la comunidad y considerando las malas prácticas de higiene en nuestro país, este tipo de cepas pueden llegar a pacientes inmunocompetentes y por consiguiente comprometer su salud.

En general todas las cepas de origen alimentario seleccionadas para el análisis genético de BLEE tuvieron al menos un gen codificante para BLEE, se encontraron 3 cepas que portaban el gen que codifica para la BLEE CTX-M, 2 cepas que portaban los genes que codifican para la BLEE SHV y TEM y no se halló la presencia del gen que codifica para la BLEE OXA-1. De las 2 cepas de origen clínico no se halló la presencia de gen alguno de resistencia estudiados en esta tesis, sin embargo haciendo referencia a la evaluación de susceptibilidad a los antimicrobianos se encontraron cepas altamente resistentes a las quinolonas evaluadas (ácido nalidíxico y ciprofloxacina) además de que se encontró la presencia de dos cepas resistentes a meropenem cabiendo así la posibilidad de encontrar genes que codifican para la resistencia a quinolonas y los carbapenémicos los cuales son la elección inmediata después de los β -lactámicos.

En el presente trabajo solo se mandó a secuenciar un gen de cada amplificado positivo para los genes encontrados, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}. Los otros genes amplificados no se mandaron por cuestiones de tiempo, sin embargo se infiere por las mismas condiciones de amplificación y peso molecular que son genes que pertenecen al mismo grupo de los que se mandaron a secuenciar; a pesar de ello no se puede confirmar la variante, pues a pesar de tener el mismo peso molecular la única forma de saber la variante es la secuenciación. En el caso del gen *bla*_{CTX-M} que se mandó a secuenciar se confirmó que pertenece al grupo 1 de la BLEE CTX-M recordando que son 5 grupos.

Dentro de este grupo están las variantes CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23 y -28 respectivamente: cuando se comparó en el Genbank se encontró parecido con 2 variantes, la variante CTX-M-3 y CTXM-22 sin embargo, no se pudo discriminar entre estas dos variantes ya que el cebador reverso que se uso se alinea justamente en la secuencia donde las dos variantes 3 y 22 difieren y considerando que tras la secuenciación es casi imposible que los extremos sean confiables no se pudo discriminar dejando este gen como perteneciente al grupo 1 sin llegar a la variante. Para lograr discriminar entre estas dos variantes se propone hacer un cebador reverso que se alinee en una región más lejos de la secuencia donde las dos variantes difieren.

En el caso del gen *bla_{SHV}* se encontró la variante 12 que difiere de la variante 1 por la presencia de glutamina (Q) en la posición 31 a diferencia de la variante 1 que tiene leucina (L).

Para el gen *bla_{TEM}* no pudo encontrar la variante de este gen ya que la secuencia que fue enviada por el IBT fue muy corta, apenas de 400pb y considerando que el peso esperado es de 1202pb fue imposible realizar una alineación completa del gen con alguno del Genbank. Se realizó la alineación del fragmento secuenciado encontrando identidad con el gen *bla_{TEM}*, sin embargo, no se pudo establecer la variante de éste gen.

CONCLUSIONES

- Se encontró una alta resistencia a los antibióticos β -lactámicos, observando un 100% (14/14) de resistencia a cefpodoxima, un 92%(13/14) a cefoxitina y un 85.7% (12/14) a ampicilina, así como dos cepas clínicas resistentes a meropenem.
- Se encontró resistencia a las tres quinolonas evaluadas, teniendo que el 35.7% (5/14) fue resistente a ácido nalidíxico y a ciprofloxacino y el 28.6% (4/14) a levoflaxina.
- Se encontró un 64.3% (9/14) de resistencia a los aminoglucósidos gentamicina y amikacina.
- De las 7 cepas seleccionadas para el estudio genotípico de BLEE, el 42.9% (3/7) amplificó el gen *bla*_{CTX-M} y el 28.6% (2/7) los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}. Ninguna cepa amplificó para el gen *bla*_{OXA-1}.
- Las cepas que amplificaron para los genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM} fueron de origen alimentario; ninguna cepa clínica, ni de portadores amplificó estos genes, a pesar de ser resistentes a cefotaxima y otros antibióticos β -lactámicos.
- La cepa 395 aislada de pollo, se evidenció la presencia del gen plasmídico *bla*_{CTX-M} que codifica para la BLEE CTX-M, asociada a la resistencia a cefotaxima.
- En las cepas 362 y 385 aisladas de pollo, se observó la presencia de las β -lactamasas BLEE SHV-12 y BLEE TEM respectivamente.
- Este trabajo representa el primer reporte en México de la presencia de los genes plasmídicos *bla*_{CTXM} del grupo 1, *bla*_{SHV-12} y *bla*_{TEM}, asociados a la resistencia hacia antibióticos β -lactámicos en cepas de *Citrobacter* spp., de origen alimentario.

PERSPECTIVAS

- Caracterizar el genotipo de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos en las cepas que presentaron resistencia a estos antibióticos.
- Caracterizar en fenotipo (mediante CMI) y el genotipo de las cepas que presentaron resistencia a meropenem.
- Realizar convenios con más hospitales para obtener más cepas de *Citrobacter* para aumentar el número de cepas y tener más claro el comportamiento de este fenómeno en este tipo de cepas en México.
- Diseñar primers para poder discriminar entre la variante CTX-M-3 y CTX-M-22.
- Realizar la purificación de los genes amplificados para realizar la secuenciación del gen *bla*_{CTX-M} de las cepas A6 y 400 así como la secuenciación del gen *bla*_{TEM} de la cepa 362 y del gen *bla*_{SHV} de la cepa 385.
- Repetir la secuenciación de la cepa 385 para establecer la variante del gen *bla*_{TEM}.

BIBLIOGRAFÍA

- Akhan, S., Coskuncan, F., Tansel O. and Vahaboglu, H. 2001. Conjugative resistance to tazobactam plus piperacillin among extended-spectrum betalactamase-producing nosocomial *Klebsiella pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 33:512–515.
- Alvarez A. 2010. Identificación de beta-lactamasas de espectro extendido en enterobacterias. *Rev haban cienc méd.* 9: 516-524.
- Ambler RP. 1980. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 289: 321–31.
- Barlow M, Reik RA, Jacobs SD, Medina M, Meyer. MP, McGowan JE, Jr, Tenover FC. 2008. High rate of mobilization for blaCTX-Ms. *Emerg Infect Dis.* 14: 423-8.
- Barnaud, G., Arlet, G., Verdet, C., Gaillot, O., Langrange, P. H., Philippon, A.1998. *Salmonella enteritidis* AmpC plasmid mediated inducible - β - lactamases (DHA-1) with an ampR gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2352–8.
- Bauernfeind, A., Grimm, H. and Schweighart, S. 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichiacoli*. *J. Infection* 18: 294–298.
- Bauernfeind, A., I. Stemplinger, R. Jungwirth, P. Mangold, S. Amann, E. Akalin, Ö. Ang, C. Bal, and J. M. Casellas. 1996. Characterization of β -lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:616-620.
- Bell, J. M., Turnidge, J. D., Gales, A. C., Pfaller M. A. and Jones, R. N. 2002. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–99). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 42:193–198.
- Bertrand, S., Weill, F.-X., Cloeckaert, A., Vrints, M., Mairiaux, E., Praud, K., ... Collard, J.-M. (2006). Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2897–903.

- Bonnet, R. 2004. MINIREVIEW Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases:the CTX-M Enzymes. *J. Agents. Chemother.* 48:1-14.
- Bradford PA. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 14: 933-51.
- Brenner DJ., Grimont PA., Steigerwalt AG., Fanning GR., Ageron E., Riddle CF. 1993. Classification of *Citrobacter* by DNA hybridizations: designation of *Citrobacter fermeri* sp. Nov., *Citrobacter youngae* sp. Nov., *Citrobacter braakii* sp. Nov., *Citrobacter werkmanii* sp. Nov., *Citrobacter sedlakii* sp. Nov and three unnamed *Citrobacter* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol.* 43(4):645-58
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., and Staley, J.T. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria Part A Introductory Assays*, Springer, New York, NY, USA. 304 pp.
- Bush, K. and Singer, S. B. 1989. Biochemical characteristics of extended broad spectrum β -lactamases. *Infection* 17:429–433.
- Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211–1233.
- Buynak, J. D. 2006. Understanding the longevity of the beta-lactam antibiotics and of antibiotic/beta-lactamase inhibitor combinations. *Biochem. Pharmacol.* 71:930-940.
- Cantón, R. and Coque, T. M. 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Microbiol.* 9:466–475.
- Coque, TM., Baquero, F., Canton, R. 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.* 20: 13.
- Donggeun, Y., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., Walsh, T.R. 2009. Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, *bla**NDM-1*, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemother.* 53:5046-5054.

- Hertage, J., Zali, H.M. F., Gascoyne-Binzi and Hawkey M. P. 1999. Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamase in Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 44:309-318.
- Holmes, B., & Aucken, H. M. 1998. Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia and other members of the Enterobacteriaceae. In L. Collier, A. Balows & M. Sussman (Eds.), *Microbiology and Microbial infections: Systematic Bacteriology* (9th ed., pp. 999-1033). London: Arnold.
- Hopkins KL, Deheer-Graham A, Threlfall EJ, Batchelor MJ, Liebana E. (2006). Novel plasmid-mediated CTX-M-8 subgroup extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-40) isolated in the UK. *Int J Antimicrob Agents.*;27(6):572-5.
- Jacoby, G. A. 2009. AmpC β -Lactamases. *J. clinical Microbiol. Reviews.* 22(1):161-182.
- Jawetz-Melnick y Adelberg. *Mibrobiología Médica*. Ed. Manual Moderno, 15^a ed. 1996.
- Kanamori, H., Yano, H., Hirakata, Y., Endo, S., Arai, K., Ogawa, M., Kaku, M. 2011. High prevalence of extended-spectrum beta-lactamases and qnr determinants in Citrobacter species from Japan: dissemination of CTX-M-2. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(10):2255–2262.
- Kerstens, K., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., Stackebrandt, E. 2006. Introduction to the Proteobacteria. *The Prokaryotes*, Springer, New York.
- Kim, J., Lim, Y.-M., Jeong, Y.-S., & Seol, S.-Y. 2005. Occurrence of CTX-M-3, CTX M-15, CTX-M-14, and CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae clinical isolates in Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 49(4), 1572–1575.
- Knirel, Y. A., Kocharova, N. A., Bystrova, O. V., Katzenellenbogen, E., & Gamian, A. 2002. Structures and serology of the O-specific polysaccharides of bacteria of the genus Citrobacter. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis.* 50:379-391.
- Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 11: 315-7.
- Livermore D.M. 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 8:557–84.

- Nordman, P., Ronco, E., Naas, T., Duport, C., Michel-Briand, Y. and Labia, R. 1993. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:962–969.
- O'Hara, C. M., Roman, S. B., & Miller, J. M. 1995. Ability of commercial identification systems to identify newly recognized species of *Citrobacter*. *Journal of Clinical Microbiology.* 33(1):242–245.
- Pan, J., Hu, L., Yu, F., Chen, C., & Zhang, X. 2010. Coexistence of multiple antimicrobial-resistance genes in a carbapenem-resistant *Citrobacter freundii* clinical isolate from China. *Journal of Medical Microbiology.* 5: 622–3.
- Paterson, D. L., and Bonomo, R. A. 2005. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinic. Microbiol. Review.* 18(4): 657-686.
- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eighteenth Informational supplement. CLSI document M100-S18. Wayne. PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
- Perilli, M., A. Felici, N. Franceschini, A. D. Santis, L. Pagani, F. Luzzaro, A. Oratore, G. M. Rossolini, J. R. Knox, and G. Amicosante. 1997. Characterization of a new TEM-derived β -lactamase produced in a *Serratia marcescens* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2374–2382.
- Petrella, S., M. Renard, N. Ziental-Gelus, D. Clermont, V. Jarlier, and W. Sougakoff. 2006. Characterization of the chromosomal class A beta-lactamase CKO from *Citrobacter koseri*. *FEMS Microbiol. Lett.* 254:285–292.
- Philippon, A., Labia, R. and Jacoby. G. 1989. Extended-spectrum betalactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:1131–1136.
- Phillipon, A., Arlet, G., Jacoby G. A.2002. Plasmid determined AmpC type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:1–11
- Poirel, L., I. L. Thomas, T. Naas, A. Karim, and P. Nordman. 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron IN52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:622–632.
- Poirel, L., Ros, A., Carricajo, A., Berthelot, P., Pozzetto, B., Bernabeu, S., & Nordmann, P. 2011. Extremely drug-resistant *Citrobacter freundii* isolate producing NDM-1

- and other carbapenemases identified in a patient returning from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), 447–448.
- Rolain, J.M., Parola, P., Cornaglia, G. 2010. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemia?. *Clinical Microbiology and Infection*. 16: 1699-1701.
- Rossolini, G. M., D'Andrea, M. M. and Mugnaioli, C.2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum b-lactamases. *J. Clin Microbiol Infect*. 14(1): 33-41.
- Rossolini, G. M., N. Franceschini, L. Lauretti, B. Caravelli, M. L. Riccio, M. Galleni, J.-M. Frère, and G. Amicosante. 1999. Cloning of a *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) menigiosepticum chromosomal gene (blaACME) encoding an extended-spectrum class A β -lactamase related to the *Bacteroides cephalosporinases* and the VEB-1 and PER β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*. 43:2193–2199.
- Silva, J., C. Aguilar, G. Ayala, M. A. Estrada, U. Garza-Ramos, R. Lara-Lemus, and L. Ledezma. 2000. TLA-1: a new plasmid-mediated extended spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 44:997–1003.
- Sougakoff, W., S. Goussard, and P. Courvalin. 1988. The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiol. Lett*. 56:343–348.
- Suárez C. and Gudíol F. 2009. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 27(2):116–129
- Tafur, D., & Villegas, V. 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación colombiana de infectología*. 12(3): 217-226
- Thomson, K. S. 2001. Controversies about extended spectrum and AmpC β -lactamases. *Emerg. Infect. Dis*.7:333–6.
- Toleman, M. A., Rolston, K., Jones, R. N., and Walsh T. R. 2003. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Agents Chemother*. 47:2859-2863.
- Underwood, S., and M. B. Avison. 2004. *Citrobacter koseri* and *Citrobacter amalonaticus* isolates carry highly divergent beta-lactamase genes despite having

high levels of biochemical similarity and 16S rRNA sequence homology. *J. Antimicrob. Chemother.* 53:1076–1080.

Vahaboglu, H., S. Dodanli, C. Eroglu, R. Öztürk, G. Soyletir, I. Yildirim, and V. Avkan. 1996. Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* strains: molecular epidemiology of PER-1-producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone. *J. Clin. Microbiol.* 34:2942–2946.

ANEXO 1.

1. Medios de cultivo y pruebas bioquímicas.

Todos los medios de cultivo utilizados fueron adquiridos de la casa comercial Bioxon ® y fueron preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante (como se indica a continuación) y posteriormente se vertieron o distribuyeron en cajas de Petri: las placas se colocaron a prueba de esterilidad por 18-24 horas en incubación a 37 °C y por último se guardaron en el refrigerador a 4 °C hasta su uso.

1. Infusión Cerebro Corazón (BHI).

Formula (gramos por litro)		Instrucciones.
Infusión cerebro de ternera	200.0	Disolver 52 g de polvo en un litro de agua destilada. Calentar a ebullición hasta su disolución total. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Nota: el caldo BHI se prepara de la misma manera.
Infusión corazón vacuno	250.0	
Peptona	10.0	
Agar cloruro de sodio	5.0	
Glucosa	2.0	
Fosfato disódico	2.5	
Agar	15.0	
pH final 7.4 ± 0.2		

2. Mac Conkey (MC).

Formula (gramos por litro)		Instrucciones.
Peptona	17.0	Suspender 50 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar suavemente y hervir 1 a 2 minutos hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
Pluripeptona	3.0	
Lactosa	10.0	
Mezcla de sales biliares	1.5	
Cloruro de sodio	5.0	
Agar	13.5	
Rojo neutro	0.03	
Cristal violeta	0.001	
pH final 7.1 ± 0.2		

3. Müller-Hinton (MH).

Formula (gramos por litro)		Instrucciones.
Infusión de carne	300.0	Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°-50°C y distribuir a cajas de Petri (o agregar los suplementos que se desee) hasta un nivel de 4 mm sobre una superficie horizontal (25-30 ml en placas de 9 cm de diámetro).
Peptona ácida de caseína	17.5	
almidón	1.5	
Agar	15.0	
pH final 7.3 ± 0.1		

4. Soya Trypticaseína (TSA).

Formula (gramos por litro)		Instrucciones.
Tripteína	15.0	Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°-50°C y distribuir a cajas de Petri.
Peptona de soya	5.0	
Cloruro de sodio	5.0	
Agar	15.0	
pH final 7.3 ± 0.2		

5. Pruebas bioquímicas.

Preparación

Todos los medios de cultivo se adquirieron de la casa comercial Bioxon ® y fueron preparados de acuerdo a las indicaciones del fabricante y bajo condiciones de completa esterilidad (al medio OF se agregó como carbohidrato problema la glucosa y las pruebas de oxidasa y catalasa se prepararon como se indica en el anexo 1). Posteriormente de ser preparados se colocaron 4 mL de cada medio en tubos de ensayo, se les colocó un tapón de corcho o algodón, se esterilizaron y se esperó a que gelificaran de la siguiente forma: los tubos de las pruebas TSI, Citrato, LIA, Urea y Fenilalanina fueron inclinados para obtener un pico de flauta final; MIO, MRVP y OF se mantuvieron de forma vertical. El medio de cultivo MC fue vertido en placas de Petri.

Todos los tubos y placas se colocaron a prueba de esterilidad y posteriormente se guardaron en el refrigerador de 4 °C hasta su uso.

Siembra

Las pruebas bioquímicas se sembraron a partir de un cultivo puro en agar TSA (Bioxon ®) de 18 a 24 horas, seleccionando una colonia de crecimiento con un asa recta bacteriológica y sembrándola en las pruebas bioquímicas en el siguiente orden y forma de inoculación (Barrow and Feltham, 2004):

- Urea: se realizó la estría del inóculo en la superficie del medio de cultivo.
- Citrato: se estrió solamente en la superficie del agar del pico de flauta.
- TSI: se estrió en el pico de flauta con una picadura central hasta el fondo.
- LIA: se estrió en la superficie del agar e hicieron 2 picaduras profundas, una en la parte más alta del pico de flauta y la otra en el pico más bajo del pico.
- MIO: se realizó una picadura en el centro del tubo.
- Prueba de Lactosa: se realizó inoculando una placa de medio de cultivo MC mediante estría cruzada en la superficie del agar.

Lectura e interpretación

Posteriormente de haber realizado la siembra de cada una de ellas, se incubaron a 37 °C por 24 horas, y tras la incubación se leyeron las pruebas bioquímicas bajo las siguientes pautas (Barrow and Feltham, 2004):

- Urea: un resultado positivo fue la generación de un color rosa-rojo intenso en el pico de flauta y/o en el interior del agar, la extensión del color indica la velocidad de la hidrólisis de la urea, resultado de una producción de la enzima ureasa, un resultado negativo no generó cambio de color, es decir, el tubo se mantuvo de color piel a amarillo pálido.

- Citrato: una interpretación positiva consistió en un crecimiento del microorganismo en la superficie del medio y/o el cambio a color azul intenso en el pico de flauta, mientras que un resultado negativo no presentó ningún cambio en el medio de cultivo ni crecimiento alguno.
- TSI: un cambio de color a rojo en la superficie y amarillo en el fondo se consideró como una prueba “Alcalino/Ácido”, lo que significa únicamente la fermentación de la glucosa; un cambio en todo el tubo a amarillo (“Ácido/Ácido”) se considera como la fermentación de la glucosa y lactosa y por último el tubo de color rojo o sin cambio de color se consideró como la ausencia de fermentación de glucosa y lactosa (“Alcalino/Alcalino o Inerte”). La producción de gas se pudo observar con la formación de burbujas en el medio, ya sea en el fondo del mismo o a lo largo del medio de cultivo; la producción de Ácido Sulfhídrico (H_2S) se observó con la pigmentación de color negro demasiado intenso en la prueba bioquímica.
- LIA: la interpretación de la descarboxilación de la lisina consistió en el pico de flauta púrpura y el extremo inferior púrpura con H_2S o sin él (prueba positiva), un resultado negativo fue la generación de un color amarillo pálido o sin cambio en el tubo; la desaminación de la lisina se consideró como un pico de flauta rojo y el extremo inferior del tubo amarillo, una prueba negativa no generó el color rojo en el pico de flauta. La producción positiva de H_2S se consideró como la reacción en el extremo inferior de color negro intenso.
- MIO: para la lectura de la Movilidad se consideró positivo la migración del crecimiento desde la línea de siembra y difusión del medio, lo que produce turbidez en medio, un resultado negativo fue un crecimiento únicamente a lo largo de la línea de siembra; para la lectura de la prueba de Indol, se agregaron 3 gotas del reactivo de Kovac's al tubo de la prueba

bioquímica, un resultado positivo fue la aparición, en segundos, de un anillo rojo en la interfase del medio con la porción inferior de la fase alcohólica sobre el medio, un resultado negativo fue ningún desarrollo de color en la superficie; la lectura positiva de la prueba de ornitina descarboxilasa consistió en un color púrpura oscuro, mientras que en una prueba negativa, el medio viró a color amarillo.

- Prueba de Lactosa: los microorganismos lactosa positiva fueron considerados aquellos que dieron colonias de color rosa con o sin zona de precipitado alrededor, mientras que los microorganismos lactosa negativos dieron colonias incoloras o de color muy claro.

ANEXO 2

1. Soluciones y reactivos.

1. Reactivo de Indol (Kovac's)

Para-dimetil-aminobenzaldehído	2 g
Alcohol etílico al 95%	190 mL
Ácido Clorhídrico	40 mL

Preparación: mezclar los 3 compuestos y agitar vigorosamente hasta obtener una solución homogénea, mantener en frasco ámbar para evitar la degradación por la luz.

2. Solución cefpodoxima.

Cefpodoxima tabletas 500mg

Agua estéril.

Preparación: mezclar la tableta con agua para obtener la concentración deseada y agitar vigorosamente hasta obtener una solución homogénea, mantener en refrigeración después de su preparación.

3. Solución salina isotónica.

Cloruro de sodio	0.85 g
Agua destilada	La necesaria para aforar a 100 mL

Preparación: realizar la solución en un frasco y mantener en refrigeración.

4. TAE 50x

Tris base	12.11 g
Ácido acético glacial	2.85 mL
EDTA disódico	0.93 g
Agua destilada	80 mL

Preparación: disolver los ingredientes en el agua destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar posteriormente a 100 mL. Guardar en refrigeración. Hacer una dilución para el TAE 1X.

5. Tampón de carga.

Azul de bromofenol	0.025 g
Xyleno-cyanol	0.025 g
Sacarosa	4 g
(Se pueden utilizar también 4 mL de glicerol)	
Agua destilada estéril	10 mL

Preparación: disolver todos los componentes en el agua destilada estéril, y agitar fuertemente.

6. Bromuro de etido 100 μ M

Bromuro de etidio	0.0099 g
Agua destilada	25 mL

Preparación: disolver vigorosamente los componentes y de esta disolución tomar 5 mL y disolverlos en 50 mL de agua destilada para así obtener la concentración deseada.

ANEXO 3

1. Purificación de los productos de PCR.

Protocolo para purificar DNA a partir de gel de agarosa.

- Extracción de DNA con el Zimogean™ Gel DNA Recovery Kit

Componentes del kit:

Buffer disolvente de agarosa (agarose dissolving buffer, ADB™)

Columna de filtración (Zymo-Spin™)

Buffer de lavado (Wash buffer)

Procedimiento.

1. Realizar una PCR a un volumen de 80µL y cargar la solución que contiene el DNA en un gel de agarosa y correr para separar los productos.
2. Cortar la banda de interés con ayuda de untrasiluminador, se debe realizar lo más rápido posible para evitar el deterioro del DNA por la radiación UV.
3. Colocar el gel cortado en un tubo eppendorf de 1.5mL.
4. Agregar un volumen del buffer disolvente de agarosa de tal forma que el gel quede sumergido en él.
5. Incubar de 50 a 55°C por aproximadamente 10 minutos, de tal forma que el gel quede disuelto totalmente.
6. Colocar una columna del kit en un tubo de recolección y agregar la agarosa disuelta por partes hasta que se termine.
7. Centrifugar la columna con la agarosa por 1 minuto a 13 000 rpm.
8. Una vez terminado de centrifugar la agarosa, agregar a la columna 200µL del buffer de lavado y centrifugar por 30 segundos, se repite el lavado dos veces.
9. Pasar la columna a otro tubo de recolección y adicionar 10µL de agua inyectable estéril para recoger el DNA y centrifugar por 30 segundos, repetir 2 veces llegando a un volumen final de 20µL.
10. Se colocan los 20µL de agua con DNA en un tubo de PCR y se conserva a -5°C
11. Se corre una alícuota del producto puro en un gel de agarosa para observar la presencia de una sola banda. Por otro lado se mide la concentración de DNA en el nanodrop.

ANEXO 4

1. Requerimientos para mandar a secuenciar.

El DNA para secuenciar se manda purificado, debe de ir en agua destilada (nada de buffer). La concentración de la muestra depende de si es un plásmido o es un producto de PCR, para un producto de PCR aislado se necesitan entre 20-60 nanogramos por microlitro, dependiendo del tamaño del producto, además se necesita una fotografía de una alícuota (2-3 microlitros) de los productos de PCR ya purificados corridos en un gel, junto con un marcador de peso molecular, se tiene que indicar cuantos microlitros de la muestra se cargaron en el gel, así como el tamaño aproximado del producto, los primers se requieren también en agua y a una concentración de 10 micromolar (10 picomolas por microlitro) y se requieren unos 16 microlitros, El DNA y los primers se mandan por separado.