



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Medicina

Departamento de Estudios Avanzados

Maestría en Ciencias de la Salud

**“Identificación molecular de especies bacterianas
multirresistentes presentes en hospitales del valle de Toluca”**

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

Q. F. B. Mildred Azucena Rivera Galindo

Comité de Tutores

Director: Dra. Ninfa Ramírez Durán

Co-director: Dr. Hugo Mendieta Zerón

Asesor: Dr. Ángel Horacio Sandoval y Trujillo

Toluca, Estado de México.

(2020)

Aviso de autoría

Yo, **Mildred Azucena Rivera Galindo**, autor responsable de la presente **Tesis**, la cual lleva como título “Identificación molecular de especies bacterianas multirresistentes presentes en hospitales del valle de Toluca”, y en representación de los coautores:

- a) **Dra. Ninfa Ramírez Durán,**
- b) **Dr. Hugo Mendieta Zerón,** y
- c) **Dr. Ángel Horacio Sandoval y Trujillo**

declaro que la información presentada en este documento es resultado de un protocolo de investigación del cual soy representante, y por tanto me responsabilizo legalmente por el contenido en caso de plagio, deslindando de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma del Estado de México.

ÍNDICE

		No. Página
	Resumen/ Summary	5
1.	Antecedentes	7
	1.1 Introducción	7
	1.2 Antecedentes	7
	1.3 Panorama actual	8
	1.4 Genética bacteriana	10
	1.4.1 Gen 16S <i>r</i> RNA	10
	1.5 Morfotipos bacterianos	11
	1.6 Identificación bacteriana	11
	1.7 Antibióticos	12
	1.7.1 Clasificación	13
	1.8 Resistencia bacteriana	14
	1.8.1 Multirresistencia	14
2.	Planteamiento del problema	16
3.	Hipótesis	17
4.	Objetivos	17
5.	Justificación	18
6.	Diseño metodológico	19
	6.1. Diseño de estudio	19
	6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	19
	6.3. Procedimientos	20
	6.3.1 Captación y recolección de cepas bacterianas multirresistentes	20
	6.3.2 Inoculación y aislamiento de cepas	20
	6.3.3 Análisis de resistencia antimicrobiana por el método de Kirby-Bauer modificado	20
	6.3.4 Obtención de biomasa	21
	6.3.5 Extracción de ADN genómico	21
	6.3.6 Integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%	22
	6.3.7 Amplificación del gen 16S <i>r</i> RNA	22
	6.3.8 Secuenciación e identificación bacteriana	24
	6.4 Variables de estudio	24
	6.5 Implicaciones bioéticas	26
	6.6 Recolección de datos	26
	6.7 Análisis estadístico	26

7.	Referencias bibliográficas	27
8.	Anexos	32
	8.1 Carta de envío del artículo	32
	8.2 Resumen del artículo	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Iniciadores utilizados para la amplificación del gen 16S <i>rRNA</i>	23
Tabla 2	Mezcla maestra para la PCR	23
Tabla 3	Condiciones para la reacción de amplificación del gen 16S <i>rRNA</i> mediante PCR	23
Tabla 4	Variables de estudio	25

Resumen

Para fines diagnósticos, la secuenciación de 1400 pares de bases (pb) del gen 16S del *rRNA* de aproximadamente 1500 pb es idóneo para la identificación de especies bacterianas de importancia hospitalaria. Alteraciones por antibióticos, condiciones desfavorables y la transferencia horizontal de genes, promueven la aparición de rasgos inusuales en estos microorganismos, dificultando así su identificación por métodos convencionales. La secuenciación del gen 16S *rRNA* es un valioso complemento para la identificación de especies bacterianas clínicamente relevantes.

Material y métodos. La susceptibilidad a antibióticos fue determinada por microdilución mediante el sistema automatizado MicroScan y por difusión en disco usando el método de Kirby-Bauer modificado. Las cepas multirresistentes fueron identificadas tanto fenotípica como molecularmente por el análisis de secuenciación del gen 16S *rRNA*.

Resultados. Se identificaron cepas correspondientes a *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. En cuanto a la susceptibilidad antimicrobiana, ceftazidima/avibactam y ceftolozane/tazobactam mostraron los mejores patrones de sensibilidad para todas las cepas.

Conclusiones. El uso de dos métodos de detección de resistencia a antibióticos y la evaluación de múltiples familias de antibióticos, permitió determinar los patrones de resistencia y sensibilidad de las cepas evaluadas. La secuenciación del gen 16S *rRNA* proporcionó la correcta identificación de las bacterias multirresistentes.

Summary

For diagnostic purposes, the sequencing of 1400 base pairs (bp) of the approximately 1500 bp 16S *r*RNA gene is ideal for identifying bacterial species of hospital importance. Alterations caused by antibiotics, unfavorable conditions and horizontal gene transfer promote the appearance of unusual traits in these microorganisms, thus making their identification difficult by conventional methods. 16S *r*RNA gene sequencing is a valuable complement to the identification of clinically relevant bacterial species.

Material and methods. Susceptibility to antibiotics was determined by microdilution using the automated MicroScan system and by disk diffusion using the modified Kirby-Bauer method. Multiresistant strains were identified both phenotypically and molecularly by the 16S *r*RNA gene sequencing analysis.

Results. Strains corresponding to *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* were identified. Regarding antimicrobial susceptibility, ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam showed the best patterns for all strains.

Conclusions. The use of two methods of detection of resistance to antibiotics and the evaluation of multiple families of antibiotics, allowed to determine the resistance and susceptibility patterns of the evaluated strains. The 16S *r*RNA gene sequencing provided the correct identification of multi-resistant bacteria.

1. Antecedentes

1.1 Introducción

El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming, sin duda alguna, fue un acontecimiento sin precedentes. Por otro lado, el médico y bacteriólogo Paul Ehrlich, fue el pionero en el tema de toxicidad selectiva; demostró las relaciones específicas entre microorganismos y antibióticos, la resistencia a estos y el papel de tratamientos combinados para combatirla ¹⁻⁴.

La resistencia antimicrobiana es un aspecto particular de su evolución natural, sin embargo, el uso indebido en el ser humano, animales y plantas ha acelerado el proceso; la industria ganadera, agrícola y acuícola es un rubro sin regularización en el uso de antibióticos. Principalmente se usa en dosis bajas como suplemento alimenticio para estimular el crecimiento de los animales, y en dosis altas como profilaxis en enfermedades respiratorias y gastrointestinales.

1.2 Antecedentes

En el 2004, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (por sus siglas en inglés, IDSA, Infectious Diseases Society of America), utilizando datos de estudios de vigilancia hospitalarios, propuso un grupo de patógenos nosocomiales denominado ESKAPE, acrónimo de los microorganismos *Enterococcus* spp (particularmente *E. faecium* y *E. faecalis*, portadores del gen *vanA*), *Staphylococcus aureus* (resistente a meticilina, portador del gen *mecA*), *Klebsiella pneumoniae* (resistente a betalactámicos, productores de enzimas SHV, TEM, CTX-M, TLA y a carbapenémicos, productores de enzimas KPC y NDM), *Acinetobacter baumannii* (productores de enzimas OXA-58 y OXA-72), *Pseudomonas aeruginosa* (productoras de enzimas VIM e IMP) y *Enterobacter* spp (resistente a betalactámicos, productores de enzimas SHV, CTX-M, TLA y a carbapenémicos, productores de enzimas VIM y NDM), los cuales se caracterizan por poseer mecanismos potenciales de resistencia a fármacos ⁵⁻⁷.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha llamado la atención sobre el problema global de resistencia bacteriana, señalando la necesidad de que los países implementen estrategias para mejorar el uso de antibióticos ⁶. En el 2014, durante su primer informe mundial sobre resistencia a antibióticos, puso de manifiesto la “grave amenaza para la salud pública a nivel mundial”, pronosticando que, “para el 2050, la resistencia a los antibióticos derivará en la muerte de más

personas que el cáncer y costará al mundo alrededor de 100 mil millones de dólares en pérdidas, estimando que morirán alrededor de 10 millones de personas por esta causa”⁸.

En septiembre del 2016, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) realizó una Asamblea General, donde reconocieron los alcances de la resistencia antimicrobiana y el tipo de respuesta requerida, declarando que “Ningún país, sector u organización puede abordar esta problemática por sí sola. Esta grave amenaza ya no es una predicción para el futuro, sino que está sucediendo en todas las regiones del mundo, con el potencial de afectar a cualquier persona, de cualquier edad, en cualquier país”⁹. Esta Asamblea toma una perspectiva muy distinta si se toma en cuenta que es la tercera ocasión en la historia de la ONU en la que se involucra en una problemática de salud.

A principios del 2017, la OMS finalmente emitió una lista de patógenos prioritarios, entre los que se encuentran como prioridad crítica: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y la familia *Enterobacteriaceae*, principalmente formadoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE’s) y carbapenemasas¹⁰.

1.3 Panorama actual

Según un reporte emitido por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC)¹¹, cada año mueren cerca de 25,000 personas debido a infecciones causadas por bacterias multirresistentes. En México, no se cuenta con datos específicos de muertes debidas a la resistencia a antimicrobianos; sin embargo, diversos estudios revelan la alta incidencia de bacterias patógenas resistentes a antibióticos¹²⁻¹⁴. Ahora bien, en promedio, 1 de cada 25 pacientes adquiere al menos una infección durante su atención hospitalaria, lo que da como resultado un aproximado de “4,544,100 infecciones, 16 millones de días adicionales de hospitalización y 37,000 muertes al año sólo en Europa”^{12,13}; una cifra similar se calcula en Estados Unidos.

A principios de diciembre del 2018, la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) junto con la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH) y otras asociaciones, emitió un informe en el que declaran que “mueren ocho veces más personas por la resistencia a antibióticos que por accidentes de tráfico”. Es importante mencionar que “España es el país que encabeza a nivel mundial el consumo de antibióticos en humanos sin razón epidemiológica que lo justifique”, además de encontrarse entre los primeros

países de Europa en infecciones por bacterias multirresistentes, incluidas las infecciones asociadas a la atención a la salud (IAAS) ¹⁵.

Desafortunadamente, México aporta poca información epidemiológica al respecto; hay alrededor de 21 casos por cada 100 pacientes hospitalizados, lo que habla de un 2.1-15.8%, particularmente en el área de cuidados intensivos ¹². La tasa total en México de IAAS durante el 2014 correspondió a 4.7 con una prevalencia que va del 7-15.8% y mortalidad aproximada del 29%. Desafortunadamente, en las unidades de terapia intensiva (UTI) la prevalencia aumenta hasta un 23.2%, mortalidad de 5.9% y en el caso de IAAS en un 25.15% ^{12-14,16}.

Por otro lado, los informes de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) en México ¹¹⁻¹⁹ indican que las IAAS de mayor incidencia son las bacteremias (23%), seguidas de neumonía (20%), vías urinarias (15.9%), heridas quirúrgicas (15.4%) y otras no clasificadas (25.4%); las cuales variaron con las reportadas en el 2012, donde las principales correspondían a neumonía (39.7%), infecciones urinarias (20.5%), quirúrgicas (13.3%) y bacteremias (7.3%).

Uno de los principales problemas en el manejo de IAAS, es la generación de microorganismos multirresistentes derivados de la presión selectiva a antibióticos. En México, la proporción de pacientes hospitalizados con tratamiento antibiótico es de 63%, generando una alta resistencia bacteriana. Los bacilos Gram negativos son los principales causantes de IAAS; entre ellos, *Pseudomonas aeruginosa*. Según reportes de la RHOVE, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, representaron el 39.7% en 2014 y 39.4% en el 2017 ^{12-14,16,19}.

En pacientes oncológicos, en un estudio realizado en el Centro Oncológico Estatal (COE) del Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios (ISSEMyM) durante el 2012, los microorganismos que prevalecieron fueron *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*, los cuales presentaron resistencia aumentada a antibióticos identificados mediante sistema automatizado ¹⁷.

Finalmente, en respuesta al plan de acción mundial de la OMS, en junio del 2018 se publicó un acuerdo donde “se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos” ¹⁸.

1.4 Genética bacteriana

La mayoría de las bacterias poseen un único cromosoma, el cual se encuentra superenrollado. Al igual que en el ser humano, el gen es la “unidad funcional del cromosoma bacteriano”²⁰; sin embargo, es común encontrar varios genes ordenados en operones, dando lugar a ARN mensajeros policistrónicos, es decir, que codifican más de una proteína.

El desarrollo de métodos basados en el ADN para la detección e identificación de microorganismos en muestras clínicas ha facilitado enormemente el diagnóstico de infecciones en los últimos años. La secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S (16S *r*RNA) ha demostrado ser un buen complemento para la caracterización bioquímica e identificación de bacterias aisladas desconocidas.

La secuenciación de ADN directamente de muestras clínicas (secuenciación directa del gen 16S *r*RNA), permite la detección e identificación de bacterias, sean o no cultivables. Para fines diagnósticos, la secuenciación de 1400 pares de bases (pb) del gen del ARN ribosomal 16S (de aproximadamente 1500 pb) es adecuada para la identificación de especies de bacterias clínicamente relevantes²¹⁻²⁴.

1.4.1 Gen 16S *r*RNA

El gen 16S *r*RNA es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* de aproximadamente 1500 nucleótidos. Este gen de cadena sencilla, se pliega y adquiere una estructura secundaria, el cual, al poseer fragmentos de doble cadena, permiten la formación de asas y hélices^{25, 26}. Este gen ha sido reconocido como un marcador “universal” de gran magnitud, ya que se encuentra presente en todos los organismos procariontes. Se caracteriza igualmente por tener bajas tasas de evolución, aunque también tiene la suficiente variabilidad para poder diferenciar especies, cepas o variedades, por lo que es una herramienta de gran utilidad para la reconstrucción de filogenias²⁶.

El tamaño parcialmente largo de este gen disminuye la incertidumbre estadística, además de que la preservación de su estructura secundaria beneficia el correcto alineamiento durante la asimilación de secuencias. El 16S *r*RNA contiene nueve regiones (V1-V9), las cuales varían en cuanto a conservación se refiere, las regiones hipervariables son de mayor ayuda para estudios filogenéticos y taxonómicos^{25, 26} y las regiones conservadas generalmente son usadas para el diseño de iniciadores universales para la amplificación de las regiones hipervariables²⁷.

1.5 Morfotipos bacterianos

Los procariontes “son organismos que se caracterizan por poseer tiempos cortos de generación”²¹. Aunque aparentemente están limitados por su reproducción asexual, existen algunas alteraciones genéticas que se relacionan con la obtención de parte del material genético de otro microorganismo (bacteria o bacteriófago). Estas mutaciones pueden mostrar o no alteraciones detectables u observables a nivel fenotípico²¹⁻²⁴.

En muchas cepas bacterianas se pueden apreciar cambios fenotípicos en las colonias, las cuales se deben a mutaciones que afectan la membrana externa, la cápsula u otros componentes celulares²⁸. Este tipo de fenómenos son de gran interés clínico, particularmente en bacterias patógenas, ya que, este fenotipo mutado implica cambios importantes no solo a nivel morfológico (morfotipo) sino bioquímico, dificultando así su identificación mediante métodos convencionales (microbiología tradicional).

1.6 Identificación bacteriana

Las bacterias, al igual que otras células, son capaces de incorporar y metabolizar compuestos químicos necesarios para subsistir. La clasificación bacteriana se basa en caracteres funcionales, generalmente suelen identificarse a nivel metabólico y no solo por las características que presentan a nivel fenotípico²²⁻²⁸.

Las pruebas bioquímicas son, hasta cierto punto, un medio eficaz para la identificación bacteriana, ya que se determina la presencia o ausencia de enzimas o vías metabólicas mediante un método probabilístico, es decir, “la identificación corresponde con el porcentaje más alto de cepas positivas a las distintas pruebas bioquímicas en los diferentes taxones de forma comparativa”²⁸. Los sistemas automatizados y semiautomatizados se basan en el mismo principio, pero llevan a cabo un importante número de pruebas adicionales, lo cual conlleva un costo necesariamente más alto²²⁻²⁹.

Los errores en la identificación manual se deben, por un lado, al bajo poder de resolución de las pruebas utilizadas y por otro, al hecho de sobre-simplificar las tablas para la interpretación de resultados, con lo cual hay omisiones o presunciones para que coincidan y correspondan con el microorganismo que consideren adecuado, en un plano claramente subjetivo²²⁻²⁹.

A pesar de que las pruebas bioquímicas convencionales ofrecen una evidente ventaja, desde la perspectiva práctica y económica, poseen una capacidad baja de resolución, lo cual limita y entorpece la identificación. Según estudios ^{28,29}, de las pruebas bioquímicas convencionales utilizadas para caracterizar enterobacterias, solamente 4 son de ayuda para la identificación a nivel fenotípico, (indol, ácido sulfhídrico, lisina y ornitina descarboxilasa). Los equipos automatizados incluyen pruebas fermentativas adicionales como adonitol, L-arabinosa, celobiosa, L-ramnosa, rafinosa y sorbitol ^{28,29}.

En los últimos años, la biología molecular mostró un gran impacto en la identificación de microorganismos, particularmente a nivel taxonómico. Con estas técnicas se analizan con mayor detenimiento las propiedades genotípicas, complementando así la caracterización fenotípica. Es por lo que, actualmente, el concepto de especie es considerado como un orden que encierra un grupo en estrecha relación a nivel genético y molecular de aislamientos individuales con un alto grado de similitud de propiedades independientes ²²⁻²⁹.

1.7 Antibióticos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) describe a los antibióticos como “medicamentos utilizados para prevenir y tratar infecciones bacterianas” ⁶, sin embargo, dicha definición queda lejos de la complejidad de lo que realmente es un antibiótico.

“Los antibióticos son un complejo grupo de sustancias que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento o destruir al microorganismo, inhibiendo diversos procesos metabólicos esenciales para la supervivencia de estos” ^{1,30}. Poseen diversos mecanismos de acción y sus dianas se encuentran distribuidas en diferentes regiones del microorganismo en cuestión, mediante una interacción específica, además de poseer distintos comportamientos a nivel farmacocinético y farmacodinámico.

Las proteínas bacterianas actúan como receptores para los ligandos (antibióticos) y es justo en estas proteínas donde llevan a cabo su acción, las cuales son componentes indispensables en el metabolismo bacteriano, interfiriendo en dichas rutas metabólicas y destruyendo al microorganismo. Entre los procesos inhibidos se encuentran principalmente el metabolismo de ácidos nucleicos, la síntesis de la pared, membrana celular, subunidades ribosómicas, etc. ³⁰

Cabe mencionar la actual preocupación por la falta de nuevos antibióticos; la aprobación de nuevos antimicrobianos durante el periodo de 1983-1987 fue de 16, mientras que durante el periodo de 2008-2012 únicamente de dos ³¹. La presión política y social ha derivado en la autorización de nuevos antibióticos sin las pruebas necesarias para su comercialización y uso humano. Uno de los casos más conocidos es el caso de Ketek[®], una telitromicina de la familia de los cetólidos autorizada por la Food and Drug Administration (FDA) en el 2014, la cual se introdujo como la “primera de una nueva clase de antimicrobianos que evitaban la resistencia a antibióticos” ³¹. Sin embargo fue asociada a diversas advertencias de seguridad, particularmente por daño hepático, lo que derivó en investigaciones sobre la aprobación por parte de la FDA por “datos fraudulentos de farmacovigilancia y métodos inadecuados en los ensayos clínicos” ³¹.

Por otro lado, se ha comprobado que la bioequivalencia no va de la mano con la actividad antimicrobiana, ya que, entre otras cosas, la ventana terapéutica en un antibiótico es notablemente más reducida que en otros fármacos ³⁰⁻³¹. Entre otras cosas, se han encontrado impurezas como iones metálicos, que interactúan con el antibiótico (el caso de piperacilina-tazobactam), hidrolizándolo e inactivándolo. Otro caso fue el de meropenem, en el que desviaciones “insignificantes” en el genérico, dieron como resultado la falta de eficacia terapéutica; las concentraciones sub-inhibitorias encontradas en quinolonas y aminoglucósidos que incrementaron mutaciones, así como la resistencia *per se*, “encendiendo” la expresión de genes de virulencia, por ejemplo, de biopelículas. Es importante tener en cuenta que, a mayor dosis, disminuye la eficacia terapéutica antimicrobiana (ventana terapéutica); cada dosis es un riesgo potencial para la resistencia ³¹. Lo que es innegable es que las opciones se acaban y cada vez hay menos en desarrollo.

1.7.1 Clasificación

Los antibióticos pueden comportarse como bactericidas o bacteriostáticos. Los bacteriostáticos afectan el crecimiento microbiano en diferentes niveles causando un efecto inhibitorio y por ende su reproducción, pero no causan la muerte del microorganismo, aunque impiden procesos tales como síntesis de proteínas mediante la unión a ribosomas. Por el contrario, los bactericidas sí producen la muerte del microorganismo ³⁰.

Al “efecto particular de los antibióticos sobre grupos de bacterias específicas” ³⁰ se le conoce como espectro de acción. Existen diversas clasificaciones, según su origen (naturales,

semisintéticos o sintéticos), según su acción (bacteriostáticos o bactericidas), según su fuente de obtención (*Streptomyces*, micromonosporas, *Cephalosporium*, *Penicillium*) o según su espectro de acción (amplio, moderado o reducido), pero principalmente por su mecanismo de acción o al grupo al que pertenecen ³⁰.

1.8 Resistencia bacteriana

Los mecanismos de resistencia son originados por la interacción invariable entre bacterias y antibióticos en su afán de sobrevivir, lo que origina a su vez la presión de selección. Estos mecanismos son transmitidos de cepas madre a su progenie (transmisión vertical), así como entre especies diferentes (transmisión horizontal) ³²⁻³⁵.

El uso de antibióticos no sólo estimula la mutación, sino que selecciona las bacterias resistentes al mismo tiempo; lo que se conoce como selección bajo presión antibiótica, es decir, la supremacía del más fuerte y no es otra cosa que la teoría evolutiva de Darwin. Con esto, no solo hay supervivencia de bacterias, sino que se incrementa la resistencia antimicrobiana, derivando en una población muy resistente, manteniendo los clones de resistencia y una probable adquisición de panresistencia ²⁹⁻³¹.

1.8.1 Multirresistencia

La definición de multirresistencia generalmente depende del objetivo de cada estudio; sin embargo suele relacionarse con perfiles de resistencia adquirida principalmente en microorganismos tales como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae* (excepto *Salmonella* y *Shigella*), *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp, los cuales forman un grupo de bacterias frecuentemente responsables de infecciones asociadas al cuidado de la salud y que generan graves problemas de resistencia a los antibióticos ³³⁻³⁵.

Se le denomina fenotipo multidrogorresistente (MDR) cuando presentan resistencia al menos a uno de tres o más familias de antibióticos. Aquellos que tienen fenotipo de resistencia extensa o extendida (XDR) cuando presentan resistencia al menos a uno de todas las familias de antibióticos, excepto 1-2 familias y se considera fenotipo panresistente o pandrogorresistente (PDR) cuando presenta o adquiere resistencia a todos los antibióticos de todas las familias ^{7,22}.

México ha sido, durante mucho tiempo, uno de los principales consumidores de antibióticos en Latinoamérica. La colistina dejó de usarse en los años 70's y se reintrodujo hace

aproximadamente 10 años; por el momento tiene un escenario alentador en cuanto a la susceptibilidad en cepas multirresistentes, lo cual puede cambiar a corto plazo, con la llegada de la llamada resistencia movilizable ³².

Un punto importante es el abuso de antibióticos en el ganado y la agricultura; alrededor del 80-90% de la producción total de antibióticos es para estas industrias; 12 mil toneladas anuales de colistina son destinadas para cerdos ³²⁻³⁵. Según un estimado, en el 2013, sólo en Estados Unidos se administraron más de 17,000 toneladas de antibióticos en un año, de los cuales, 80% fue para uso en animales y menos del 20% en humanos ³¹. En un artículo publicado a finales del 2016, se habla de la amenaza anunciada de la resistencia a la colistina, la cual no es causada por el uso clínico, sino por el abuso en ganadería, agricultura y acuicultura ³²; esta resistencia se da por la co-localización (en el mismo plásmido) del gen MCR junto con betalactamasas de amplio espectro (BLEE's) y carbapenemasas, lo cual se traduce en la resistencia a cefalosporinas, carbapenémicos y polimixinas. Peor aún, se ha visto asociado a BLEE's de tipo CTX-M y carbapenemasas tipo KPC, lo cual fue documentado por primera vez en China a finales del 2017 (aislado en el tracto urinario), mostrando además resistencia a fosfomicina, cefalosporinas, quinolonas y aminoglucósidos. Este gen MCR se ha aislado en productos de origen animal, en el medio ambiente y en hospitales ³².

Las opciones son limitadas, uno de los antibióticos con mayor acción *in vitro* es la colistina, sin embargo, es conocida por su alta toxicidad. Diversos estudios han demostrado sinergismo combinando la colistina con carbapenémicos (imipenem), rifampicina o azitromicina contra *Acinetobacter* ³⁶⁻³⁸. Otras opciones terapéuticas más recientes, incluye a ceftolozane/tazobactam, ceftazidima/avibactam y el uso de nanopéptidos antimicrobianos (SNAPP's, por sus siglas en inglés Structurally Nanoengineered Antimicrobial Peptide Polymers) ³⁹⁻⁴⁶.

La resistencia pone en riesgo la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas y es una amenaza global para la salud, por lo que se requieren medidas inmediatas para su oportuna y adecuada detección. Cabe mencionar que la resistencia adquirida tiene mayor impacto a nivel clínico. El control de infecciones puede reducir no solo la tasa de infección, sino también la morbimortalidad asociada, en algunos casos en más del 50% ³¹⁻³⁵.

Es importante mencionar que la presencia de mecanismos de resistencia enzimáticos, los cuales son hasta cierto punto fáciles de identificar en la práctica diaria, puede errar en la correcta interpretación del antibiograma; es decir, *in vitro* puede ser sensible, cuando en realidad no lo es, por ello es de suma importancia analizar con detenimiento el antibiograma antes de emitir el reporte. La sensibilidad no es sinónimo de éxito terapéutico, la resistencia sí es sinónimo de fracaso ⁸.

2. Planteamiento del problema

Una de las principales crisis actuales a nivel mundial es la resistencia antimicrobiana, la cual incrementa notablemente el fracaso de la terapia con antibióticos; prolonga la recuperación, aumenta la mortalidad de pacientes con patologías adyacentes, incrementa el tiempo de hospitalización, eleva el riesgo de adquirir una nueva infección nosocomial (infección asociada a la atención a la salud, IAAS) y multiplica el costo y toxicidad de los antibióticos necesarios.

Cada vez es más reconocido el polimorfismo bacteriano derivado de condiciones desfavorables para estos microorganismos, lo que conlleva a una re-adaptación metabólica, dificultando su identificación por métodos convencionales, ya que no existe actualmente un conjunto de pruebas bioquímicas lo suficientemente completa para identificarlas y diferenciarlas entre miembros del mismo género. Este polimorfismo en conjunto con la adaptación metabólica, origina microorganismos viables pero no cultivables y por lo tanto se corre el riesgo de reportar cultivos negativos o bien reportar un microorganismo que no corresponde con el agente infeccioso responsable; derivando en el reporte de un antibiograma erróneo, facilitando aún más la resistencia antimicrobiana, la diseminación de este tipo de cepas y por ende un mal manejo del paciente.

La resistencia pone en riesgo la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas y es una amenaza global para la salud, por lo que se requieren medidas inmediatas para su oportuna y adecuada detección. La resistencia adquirida tiene mayor impacto a nivel clínico; el control de infecciones puede reducir no solo la tasa de infección, sino también la morbimortalidad asociada, en algunos casos en más del 50%.

Pregunta de investigación

¿Es posible obtener una mayor precisión en la identificación de especies bacterianas multirresistentes con el uso de herramientas moleculares que con métodos tradicionales de identificación?

3. Hipótesis

- Hipótesis alterna

El uso de herramientas moleculares tiene una mayor precisión en la identificación de especies bacterianas multirresistentes en comparación con los métodos tradicionales de identificación.

- Hipótesis nula

El uso de herramientas moleculares no tiene una mayor precisión en la identificación de especies bacterianas multirresistentes en comparación con los métodos tradicionales de identificación.

4. Objetivos

General

Identificar mediante secuenciación del gen 16S *rRNA* especies bacterianas multirresistentes aisladas en hospitales del valle de Toluca y comparar con la identificación obtenida mediante métodos tradicionales.

Específicos

- Aislar cepas bacterianas de pacientes de hospitales del valle de Toluca.
- Realizar un análisis de resistencia a antibióticos por dos técnicas (microdilución y difusión) a cada cepa resistente a 3 o más familias de antibióticos.
- Identificar a nivel molecular las especies bacterianas multirresistentes.

5. Justificación

La resistencia antimicrobiana, definida por la aparición de cepas que no responden al efecto bacteriostático y bactericida de los antibióticos, constituye un problema de salud pública global.

La resistencia pone en riesgo la prevención y tratamiento de infecciones ocasionadas por estos microorganismos, lo que requiere de medidas para su oportuna detección, tomando en cuenta sensibilidad, especificidad, costos y tiempo de reporte. Dada la actual deficiencia en la correcta y oportuna identificación de especies bacterianas en la práctica clínica y la subsecuente correlación en el reporte antimicrobiano, es indispensable el uso de métodos de identificación que, en conjunto, aporten más información, veracidad y confiabilidad.

La identificación a nivel fenotípico mediante el uso de pruebas bioquímicas convencionales determina la presencia o ausencia de enzimas o vías metabólicas mediante un método probabilístico; sin embargo dificulta y limita la identificación, ya que no existe actualmente un conjunto de pruebas bioquímicas lo suficientemente completa para diferenciarlas. Esto puede resultar en una malinterpretación, una mala selección del antibiótico, aumentando así el perfil de resistencia y desencadenando un mal manejo del paciente.

Por otro lado, el marcador molecular 16S rRNA es una herramienta molecular estandarizada de gran precisión que se considera universal (presente en todas las bacterias), su estructura es estable durante tiempos prolongados manteniendo estabilidad funcional, por lo que las variaciones a nivel de secuencia son probablemente aleatorias, lo cual favorece la alineación precisa durante la comparación de secuencias. Posee además suficiente variabilidad de diferenciación de especies, cepas o variedades.

6. Diseño metodológico

6.1 Diseño de estudio

Tipo de estudio: descriptivo, transversal y exploratorio.

Universo: bacterias aisladas en hospitales del valle de Toluca.

Método de muestreo: recolección directa en laboratorios clínicos de hospitales del valle de Toluca. No aleatorizado.

Tamaño de muestra: a conveniencia.

6.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios inclusión

- ✓ Cepas bacterianas multirresistentes al menos a tres o más familias de antibióticos (incluyen multidrogorresistencia, resistencia extensa y pandrogorresistencia).

Criterios exclusión

- ✓ Cepas resistentes a menos de tres familias de antibióticos.

Criterios eliminación

- ✓ Cepas bacterianas contaminadas (más de un microorganismo) o cuyo contenedor esté abierto, dañado o expuesto.

6.3 Procedimientos

6.3.1 Captación y recolección de cepas bacterianas multirresistentes

Las cepas incluidas en este estudio fueron obtenidas del laboratorio del Hospital Materno-Perinatal "Mónica Pretelini Sáenz" (HMPMPS), Instituto de Salud del Estado de México (ISEM) en Toluca, Estado de México, de octubre del 2019 a febrero del 2020, las cuales fueron identificadas como multirresistentes a nivel fenotípico con el equipo semi-automatizado MicroScan modelo AutoScan 4 (Beckman Coulter®). La recopilación estandarizada de datos epidemiológicos incluyó edad del paciente, diagnóstico clínico, tipo y origen de muestra, así como el reporte final emitido por el equipo, el cual incluyó género, especie y fenotipo multirresistente de la cepa. Toda la información se gestionó en una hoja de datos de Excel®.

6.3.2 Inoculación y aislamiento de cepas

Las cepas recolectadas se inocularon en cajas Petri con agar infusión cerebro-corazón (BHI). Una vez aisladas, se realizó tinción de Gram para confirmar la pureza de cada cepa.

6.3.3 Análisis de resistencia antimicrobiana por el método de Kirby-Bauer modificado

Una vez comprobada la pureza de cada una de las cepas recolectadas, se realizó una suspensión bacteriana al 0.5 de la escala de McFarland mediante el método de suspensión directa de colonias en caldo BHI, a partir de un medio no selectivo e incubado durante la noche, comparando visualmente con una suspensión estándar de turbidez equivalente. De esta suspensión, se tomó 1 mL e inoculó en agar BHI estéril a 40° C, se vació en cajas Petri estériles y se dejó solidificar durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron los discos con los antibióticos seleccionados firmemente sobre la superficie del agar, tratando de que el contacto con este fuera firme y homogéneo, teniendo la precaución de no moverlos una vez colocados, ya que la difusión del antibiótico es rápida.

Se invirtieron las cajas e incubaron en los 15 minutos posteriores a la colocación de los discos a $35 \pm 2^\circ$ C durante 18-24 horas en condiciones de aerobiosis. Si se dejan las placas a temperatura ambiente después de haber colocado los discos, la pre-difusión del antibiótico puede dar lugar a halos de inhibición superiores.

En cuanto a la lectura, se leyó el borde del halo en el punto de inhibición completa que se aprecia a simple vista por el reverso contra un fondo negro iluminado con luz reflejada. Se

midieron los diámetros correspondientes con un vernier, aproximando el resultado al valor más cercano en milímetros. Se interpretó de acuerdo con los puntos de corte del CLSI (por sus siglas en inglés Clinical and Laboratory Standards Institute).

Para la validación de la metodología, se utilizó la cepa de la colección ATCC® (por sus siglas en inglés American Type Culture Collection) *Escherichia coli* 25922, la cual es una cepa ampliamente caracterizada, reconocida y recomendada para validar pruebas de susceptibilidad en bacilos Gram negativos.

Interpretación.

Se midió el diámetro en milímetros y se interpretó de acuerdo con la guía M100 del CLSI como: sensible, intermedio o resistente; según correspondiera a la familia, género, especie y/o tipo de muestra para cada antibiótico ⁴⁷.

En este estudio, la multiresistencia fue definida como la resistencia simultánea a 3 o más familias de antibióticos de un mínimo de 10 familias ⁴⁸. Para el control de calidad se usó la cepa de colección *Escherichia coli* ATCC® 25922 ⁴⁷.

6.3.4 Obtención de biomasa

La recuperación de biomasa se realizó mediante el método de suspensión directa de colonias en caldo BHI a $35 \pm 2^\circ$ C durante 18-24 horas en condiciones de aerobiosis, a partir de un medio no selectivo e incubado durante la noche, recolectando en tubos Falcon y posterior centrifugación a 9000 rpm/5 minutos, decantando el sobrenadante. Se resuspendió y refrigeró el pellet hasta su uso.

6.3.5 Extracción de ADN genómico

- Se resuspendió el pellet a temperatura ambiente con 480 μ L de EDTA 0.5M (pH 8) grado biología molecular, posteriormente se adicionaron 60 μ L de lisozima a cada muestra problema. Se llevó al vórtex por 3 segundos y se incubó durante 60 minutos a 37° C.
- Se centrifugó a 14000 rpm/2 minutos, al terminar se removió cuidadosamente el sobrenadante.
- Se adicionaron 600 μ L de solución de lisis, se mezcló e incubó a 80° C durante 5 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.

- Se adicionaron 3 μL de RNasa a cada tubo y se mezcló por inversión 3 veces. Se incubó a 37° C durante 60 minutos y dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Se adicionó 200 μL de solución de precipitación de proteínas al lisado tratado con RNasa y se agitó vigorosamente en vórtex por 20 segundos. Se incubó a -20° C durante 5 minutos y se centrifugó a 14000 rpm/3 minutos.
- Se transfirió el sobrenadante a un microtubo con 600 μL de isopropanol a -20° C y se mezcló hasta que se observó la formación de hebras de ADN. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm/2 minutos.
- Se drenó el microtubo en papel absorbente y se adicionó 600 μL de etanol al 70%, invirtiendo el microtubo tratando de despegar cuidadosamente el pellet de ADN.
- Se centrifugó a 14000 rpm/2 minutos y se decantó con cuidado el etanol, dejando secar el microtubo a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.
- Se adicionó 100 μL de solución de rehidratación y se almacenó en congelación hasta su uso.

6.3.6 Integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%

Para observar la presencia e integridad del ADN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Conda Pronadisa, No. de catálogo 8100), teñido con bromuro de etidio (Sigma No. de catálogo E7637-1G), bajo las siguientes condiciones: 3 μL de ADN extraído, 3 μL de buffer de carga, corrida a 120 V durante 30 minutos con buffer TAE 1X (TAE buffer Invitrogen No. de catálogo 5M0311). El gel se visualizó en un transiluminador. Para verificar la concentración y pureza del ADN obtenido, se leyó en el espectrofotómetro EPOCH BioTek®.

Una vez verificada la presencia, integridad, cantidad y calidad del ADN, se amplificó el gen 16S *rRNA* mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

6.3.7 Amplificación del gen 16S *rRNA*

La amplificación se realizó mediante PCR en un termociclador MaxyGenII (Axygen®), utilizando Taq ADN polimerasa (MyTaq, Bionline) y los primers universales 27F y 1492R, cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la amplificación del gen 16S *r*RNA

Primer	Secuencia	Base	Blanco	Amplificado	Referencia
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20	Bacteria	1500 pb	Lane. <i>et al.</i> 1991 ⁴⁹
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	22	Universal		Stackebrandt. <i>et al.</i> 1993 ⁵⁰

Se calculó el volumen a preparar para la mezcla maestra de acuerdo con la Tabla 2:

Tabla 2. Mezcla maestra para la PCR

Reactivo	Volumen/reacción
Agua libre de nucleasas	14.3 μ L
Buffer 1X	2.50 μ L
Primer F (8F)	2.50 μ L
Primer Rvs (1492R)	2.50 μ L
Taq polimerasa	0.20 μ L
ADN genómico	3 μ L
Volumen final	25 μL

Las condiciones usadas en el termociclador para la amplificación del gen se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones para la reacción de amplificación del gen 16S *r*RNA mediante PCR

Fases	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	5 minutos
Desnaturalización	94	1
30 ciclos		
Alineación	59	30 segundos
Extensión	72	1 minuto
Extensión final	72	10 minutos
Mantenimiento	4	∞

Los amplicones obtenidos se conservaron a 4° C hasta su uso. Los fragmentos amplificados fueron observados mediante electroforesis en gel de agarosa, tal como se describió en el punto 6.3.6. El marcador molecular 16S *r*RNA corresponde a ~1500 pb. Finalmente, se cuantificó la concentración del amplicón obtenido en el espectrofotómetro EPOCH BioTek®.

6.3.8 Secuenciación e identificación bacteriana

Los productos de la amplificación del marcador molecular 16S *r*RNA fueron purificados con el kit Wizard® SD Gel and PCR Clean-Up System (Promega A9282), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y enviados al servicio de secuenciación de Macrogen USA (Macrogen Sequencing Service, Maryland, USA).

Las secuencias obtenidas fueron corregidas y analizadas con BioEdit v7.2.5⁵¹, contruyendo secuencias consenso, las cuales fueron comparadas con secuencias depositadas en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)⁵², así como en la base pública de datos EzBioCloud⁵³. De acuerdo con Stackebrandt *et al*⁵⁴, la certeza del análisis de secuencia del gen 16S *r*RNA implica similitudes $\geq 97\%$, sin embargo, Kim *et al*⁵⁵ consideran que el 98.65% de similitud de la secuencia del gen 16S *r*RNA puede ser usado como umbral para diferenciar dos especies, por lo que, en cualquier caso, la mejor alineación, es decir, aquella con puntuación de al menos 97%, preferentemente $\geq 98.65\%$, fue seleccionada.

6.4 Variables de Estudio

Independientes:

- Sitio de infección
- Edad
- Diagnóstico

Dependientes:

- Especie bacteriana
- Resistencia adquirida (perfil de resistencia a 3 o más familias de antibióticos).

Tabla 4. Variables de estudio

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
Sitio de infección	Área de invasión en el hospedero por un microorganismo patógeno.	Sitio anatómico o tejido del cual se obtuvo la cepa	Cualitativa/independiente	Nominal	Frecuencias y distribución porcentual
Edad	Referente al tiempo que ha vivido un organismo	Tiempo que ha transcurrido desde el nacimiento del paciente	Cuantitativa/independiente	Ordinal	
Diagnóstico	Denominación de padecimiento, trastorno, dolencia o daño	Motivo de solicitud del cultivo bacteriológico	Cualitativa/independiente	Nominal	
Especie bacteriana	Código de clasificación taxonómica que se refiere a la diversidad dentro del género bacteriano.	Subcategoría taxonómica de clasificación de las bacterias multirresistentes de hospitales del valle de Toluca	Cualitativa/dependiente	Nominal (género y especie)	
Perfil de resistencia	Resistencia a antibióticos resultado de la mutación o adquisición de nuevos genes en una cepa que no poseía resistencia de manera intrínseca o natural.	Resistencia antimicrobiana que aparece a lo largo del tiempo en cepas que originalmente son sensibles y tiene mayor impacto a nivel clínico	Cualitativa/dependiente	Ordinal	

6.5 Implicaciones bioéticas

La presente investigación cumplió con los criterios instaurados en el reglamento de la “Ley General de Salud en materia de investigación para la salud en el Título IV Bioseguridad de las Investigaciones”⁵⁶ y en apego al “Protocolo de Nagoya sobre acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de su utilización al convenio sobre la diversidad biológica”⁵⁷.

La creciente importancia de la resistencia en microorganismos requieren de mejores y más precisos métodos diagnósticos, tomando en cuenta la eficacia técnica, así como la experiencia y conocimiento del personal de laboratorio.

6.6 Recolección de datos

Cepas: obtenidas del laboratorio del Hospital Materno-Perinatal "Mónica Pretelini Sáenz" (HMPMPS), Instituto de Salud del Estado de México (ISEM) en Toluca, Estado de México.

Periodo: octubre del 2019 a febrero del 2020.

La recopilación estandarizada de datos epidemiológicos incluyó edad del paciente, diagnóstico clínico, tipo y origen de muestra, así como el reporte final emitido por el equipo, el cual incluyó género, especie y fenotipo multirresistente de la cepa. Toda la información se gestionó en una hoja de datos de Excel[®].

6.7 Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva, con frecuencias simples y porcentajes para la presentación de resultados.

7. Referencias bibliográficas

1. Tórtora GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la Microbiología. 12ª Ed. México. Ed. Médica Panamericana (2017).
2. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1945. Nobel Media 2018. Disponible en: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/summary/>
3. Romero CR. Microbiología y Parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª Ed. México. Ed. Médica Panamericana (2007).
4. Lloyd NC, Morgan HW, Nicholson BK, Ronimus RS. The composition of Ehrlich's salvarsan: resolution of a century-old debate. *Angewandte Chem Int Ed.* 2005; 44: 941-944.
5. Organización Panamericana de la Salud. Vigilancia Epidemiológica de las Infecciones Asociadas a la Atención a la Salud. Washington, D. C. (2012).
6. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antibióticos. Comunicado de prensa, febrero 2018. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
7. Gutiérrez MJ, Ramírez CA, Martínez BM, Coria LJ, Armenta GL, Ayala FJ, Bernal GS, Flores ZF, García PF, Monjardín RJ, Martínez FG, Gutiérrez MV, Suárez CJ. Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Rev Lat Infect Ped;* 2017, 30 (2): 68-75.
8. Organización Mundial de la Salud. Comunicado de prensa sobre la amenaza de salud pública de la resistencia antimicrobiana. Abril, 2014. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>
9. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally. The Review on Antimicrobial Resistance. (2014).
10. Organización Mundial de la Salud. Comunicado de prensa sobre patógenos prioritarios. Febrero 27, 2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
11. Centers for Disease Control and Prevention. (2016) National and State Healthcare-associated Infections Progress Report. Disponible en: <https://www.cdc.gov/hai/surveillance/progress-report/index.html>
12. Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología. Informe anual RHOVE 2014. México. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-rhove-2014>

13. Diario Oficial de la Federación. Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018
14. Dirección General de Epidemiología. Medición de la prevalencia de Infecciones Nosocomiales en Hospitales Generales de las principales Instituciones Públicas de Salud. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México (2011)
15. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica SEIMC. Nota de prensa. Madrid, 17 de mayo de 2018. Disponible en: https://seimc.org/contenidos/noticias/2018/seimc-nt-180517-Presentacion_del_registro_de_pacientes_BMR_SEIMC.pdf
16. Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los antimicrobianos (ReLAVRA). Organización Mundial de la Salud. Organización Panamericana de la Salud. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13682:relavra-home&Itemid=42427&lang=es
17. Martínez RR, Márquez AD, Bárcenas OA. Prevalencia y resistencia antimicrobiana de microorganismos aislados en el Centro Oncológico Estatal del ISSEMyM. *Rev Lat Pat Clin Med Lab*; 2013, 60 (4): 244-251.
18. Diario Oficial de la Federación. Secretaría de Gobernación. Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos en México. 05 de junio de 2018. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018
19. Ponce de León S et al. Estado actual de la resistencia antimicrobiana en México. Reporte de los hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y consumo de antibióticos. Programa Universitario de Investigación en Salud. Universidad Nacional Autónoma de México. (2018) http://www.puis.unam.mx/slider_docs/reporte-ucradigital.pdf
20. Cepi J, Blahuskova A, Markos A. Variations and heredity in bacterial colonies. *Com Int Biol*; 2016, 9 (6): 1-11.
21. Fernández CF. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enf Inf Microbiol Clin*; 2004, 22 (6): 355-60.
22. Pliego CA, Yáñez VJ, López VT. *Pseudomonas* spp multirresistentes. Susceptibilidad in vitro a combinaciones de dos antibióticos. *Academia Mexicana de Cirugía*; 2005, 73 (6): 465-470.
23. Helander JK, Dargis R, Jorgen CJ, Kemp M. Ribosomal PCR and DNA sequencing for detection and identification of bacteria: experience from 6 years of routine analysis of patient samples. *J Path Microbiol Immun*; 2013, 122 (3): 248-255.

24. Garza RU et al. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública Mex*; 2009, 51 (3): 439-46.
25. Valenzuela GF, Casillas HR, Villalpando E, Vargas AF. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Cienc Mar*; 2015, 41 (4): 297-313.
26. Rodicio MD, Mendoza MD. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enf Inf y Microb Clin*; 2004, 22: 238-245.
27. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods*; 2003, 55: 541-555.
28. García BP, Mendoza MA. Pruebas bioquímicas tradicionales y de alta resolución para identificación manual de enterobacterias. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*; 2014, 48 (2): 249-254.
29. Nuvials X et al. Influencia de la confirmación microbiológica en la duración y adaptación del tratamiento antimicrobiano empírico de los pacientes ingresados en UCI. *Revista Española de Quimioterapia*; 2014, 27 (4): 252-260.
30. Dandan RH, Brunton LL. Goodman & Gilman. Manual de farmacología y terapéutica. 2ª Ed. México. (2015)
31. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. The review of antimicrobial resistance. Mayo, 2016. Disponible en: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
32. Al-Tawfiq JA et al. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistina resistance in humans and animals? *Int J Infect Dis*; 2016, 54: 77-84.
33. Crespo OM. La resistencia bacteriana: ¿estamos preparados para detectarla? *Infectio*; 2005, 9 (1): 31-45.
34. Llewelyn MJ et al. The antibiotic course has had its day. *BMJ*; 2017, 26: 358-j3418.
35. Spellberg B et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: A call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*; 2008, 46 (2): 155-164.
36. Barletta FR, Pérez PL, Castro VG, Pujol PM, Barletta CE, Dueñas PY. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a challenge for current therapeutic. *Medisur*; 2018, 16 (2): 322-334.
37. Diene SM et al. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species. *Clin Microb Inf*; 2014, 20 (9): 831-838.

38. Hernández TA, García VE, Herrero MJ, Gómez GJ. Infecciones por bacilos Gram negativos no fermentadores: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp. y *Stenotrophomonas maltophilia*. *Medicine*; 2014, 11 (56): 3311-3316.
39. Serra VM. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Rev Hab Cienc Med*; 2017, 16 (3): 402-419.
40. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *New Engl J Med*; 2010, 362: 1804-1813.
41. Evans S et al. Choosing ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam as empiric therapies against *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) using rapid molecular diagnostics (RMDs): Primers IV. *Open Forum Infect Dis*; 2016, 3 (1): 2050.
42. Ohl CA et al. Health care provider education as a tool to enhance antibiotic stewardship practices. *Infect Dis Clin North Am*; 2014, 28: 177.
43. Brade K. Novel treatment options for multi-drug resistant Gram-negative infections. *Virulence*, Jul; 2016, 6:1-14.
44. González M et al. Susceptibility of ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam against a collection of betalactam-resistant Gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol*; 2014, 52: 4049-52.
45. Papp-Wallace KM et al. New betalactamase inhibitors in the clinic. *Antimicrob Agents Chemother*; 2015, 59: 1020-9.
46. Lam SJ et al. Combating multidrug-resistant Gram-negative bacteria with structurally nanoengineered antimicrobial peptide polymers. *Nature Microbiol*; 2016, 1 (11): 16162.
47. Wayne PA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Supplement M100 300th Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute (2020).
48. Palomar M, Alvarez LF, Olaechea P, Insausti J, López PM. Informe ENVIN 2008. Disponible en: <http://hws.vhebron.net/envin-helics/Help/ENVIN-UCI%20Informe%202008.pdf>
49. Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed), nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons. New York, NY (1991).
50. Stackebrandt E, Liesack W. Nucleic acids and classification. In M. Goodfellow and A. G. O'Donnell (ed.), Handbook of new bacterial systematics. Academic Press, London, England (1993).
51. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*; 1999, 41: 95-98.
52. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*; 1990, 215: 403-410.

53. Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J syst Evol Microbiol*; 2017, 67: 1613-1617.
54. Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*; 1994, 44: 846-849.
55. Savini V, Catavittello C, Talia M, Manna A, Pompetti F, Favaro M, Fontana C, Febbo F, Balbinot A, Di Bernardino F, Di Bonaventura G, Di Zacomo S, Esattore F, D'Antonio D. Multidrug-resistant *Escherichia fergusonii*: a case of acute cystitis. *J Clin Microbiol*; 2008, 46 (4): 1551-1552.
56. Diario Oficial de la Federación. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Título IV de la Bioseguridad de las Investigaciones. México (2012).
57. Protocolo de Nagoya sobre acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de su utilización al Convenio sobre la Diversidad Biológica. Nagoya, Japón 29 de octubre de 2010. Disponible en: <https://treaties.un.org/doc/Treaties/2010/11/20101127%2002-08%20PM/XXVII-8-b-Corr-Original.pdf>

8. Anexos

8.1 Carta de envío del artículo

Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society - Manuscript ID JPIDS-2020-703

Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Jue 15/10/2020 11:25 AM

Para: ninfard@hotmail.com <ninfard@hotmail.com>

15-Oct-2020

Dear Dr. Ramírez Durán,

Your manuscript entitled "Multi-resistant bacteria detected in children under two months of age in an Intensive Care Unit" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society.

Your manuscript ID is JPIDS-2020-703.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when emailing the Editorial Office with questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/jpids> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jpids>.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society.

Best wishes,

Editorial Office
Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society
jpids.editorialoffice@oup.com

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society

Manuscript ID

JPIDS-2020-703

Title

Multi-resistant bacteria detected in children under two months of age in an Intensive Care Unit

Authors

Rivera-Galindo, Mildred Azucena
Manzanares-Leal, Gaudy Lizeth
Caro-González, Luz Marcela
Santos-Ramírez, Erika
Mendieta-Zerón, Hugo
Sandoval-Trujillo, Horacio
Ramírez Durán, Ninfa

Date Submitted

15-Oct-2020

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2020. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

 @ScholarOneNews |  System Requirements |  Privacy Statement |  Terms of Use

8.2 Resumen del artículo

Background. In Mexico, the leading bacterial agents responsible for the most common pediatric infections are Gram-negative bacilli that are multi-resistant to antibiotics. This work aimed to identify phenotypically and sequencing analysis of the 16S *r*RNA gene, multi-resistant bacterial species isolated from children under two months of age in a Neonatal Intensive Care Unit.

Methods. Antimicrobial susceptibility was determined by microdilution using the automated MicroScan system and disk diffusion using the modified Kirby-Bauer method. Multi-resistant strains were identified as phenotypically and molecularly by 16S *r*RNA gene sequencing analysis.

Results: The multi-resistant bacteria *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* were identified. In antimicrobial susceptibility results, ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam showed the best sensitivity patterns for all strains.

Conclusions: With the use of two methods to detect antibiotic resistance and the evaluation of multiple antibiotic families, it was possible to determine the tested strains' resistance and sensitivity patterns. The sequencing of the 16S *r*RNA gene provided the correct identification of the multi-resistant bacteria. *Escherichia fergusonii* was identified for the first time in children under two months of age in an Intensive Care Unit in Toluca city, State of Mexico.