



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS EN  
ENTEROBACTERIAS Y BACILOS GRAMNEGATIVOS NO  
FERMENTADORES DE IMPORTANCIA HOSPITALARIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**Biólogo**

PRESENTA:

**Juan Manuel Vélez Ixta**

DIRECTORA:

QFB Juana Salazar Salinas

Asesor interno:

Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández



Ciudad de México, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS Y  
BACILOS GRAMNEGATIVOS NO FERMENTADORES DE  
IMPORTANCIA HOSPITALARIA

**Jurado asignado:**

**PRESIDENTE:** M. en E.S. María Cristina Alvarado Domínguez \_\_\_\_\_

**VOCAL:** Q.F.B. Juana Salazar Salinas \_\_\_\_\_

**SECRETARIO:** Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández \_\_\_\_\_

**SUPLENTE:** Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava \_\_\_\_\_

**SUPLENTE:** M. en C. Reynalda Roldán Pérez \_\_\_\_\_

Este trabajo fue realizado por Juan Manuel Vélez Ixta en el Laboratorio de Central de Vigilancia Epidemiológica y Santiaria del ISSSTE, ubicado en San Lorenzo, #502, Segundo Piso, Edificio "D", Colonia del Valle, Alcaldía Benito Juárez; bajo la dirección de la la Q.F.B. Juana Salazar Salinas y con la colaboración del equipo de trabajo conformado por el Biól. Gabriel Dámazo Hernández, el Q.F.B. Omar Fernando Mendoza Vázquez, el Q.F.B. Julio Jesús Alfaro López y la Lab. Alejandra Salamanca Ceciliano.

*«¿Cuix oc nelli nemohua in talticpac?  
An nochipa talticpac:  
zan achica ya nican».  
–Nezahualcóyotl.*



# Agradecimientos

---

En primer lugar, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, en específico a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por brindarme la infraestructura y los profesores que me acompañaron a lo largo de mis cuatro años de formación. En particular al Dr. Octavio, la Dra. Bertha, el Dr. Carlos Castillejos, la Dra. Adriana y el Biól. Marco, quienes considero que contribuyeron en gran medida para mi aprendizaje. Espero que el saber que me proporcionaron a lo largo de la carrera me sirva para hacer de este mundo un lugar un poco mejor.

A mi Asesor Interno, el Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández, por el apoyo prestado a lo largo de la carrera y sobre todo por los consejos que me brindó en bastantes ocasiones. A mi Directora de Tesis, Q.F.B. Juana Salazar Salinas, gracias por permitirme formar parte de su equipo, por sus revisiones severas, y también por las risas. A mis sinodales, M. en S.E. María Cristina Alvarado Domínguez, Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava y Reynalda Roldán Pérez, por realizar la revisión de este trabajo y compartir sus sugerencias en tiempo y forma.

Al ISSSTE, la institución que me abrió sus puertas para que pudiera realizar esta Tesis, y en especial a mi equipo de trabajo en el Laboratorio Central de Vigilancia Epidemiológica y Sanitaria, Q.F.B. Juana Salazar, Biól. Gabriel Dámazo Hernández, Q.F.B. Omar Fernando Mendoza Vázquez, Q.F.B. Julio Jesús Alfaro López y Lab. Alejandra Salamanca Ceciliano por enseñarme tantas cosas, escuchar mis inquietudes, resolver mis dudas y por supuesto, compartir tan buenos momentos en este pequeño espacio en el que pudimos coincidir. También a la Dra. Sofía, por recomendarme trabajar en este laboratorio.

A mis padres, todo comenzó con ellos; mi primer hogar. Agradezco a Raquel, quien fue mi primera maestra, pero que además de enseñarme a leer las palabras, me transmitió el amor al arte y la pasión por la vida, es posible que ella fuera la principal razón por la que decidí estudiar Biología. También agradezco a Juan Carlos, quien me enseñó a darle valor a las cosas y a leer a las personas, así como quererlas, todavía recuerdo aquellos días de mi infancia cuando me llevaba al tianguis de carros, me hubiera gustado ir más. Ambos deben saber que a estas alturas es posible que ya sea como ustedes, más parecido de lo que podría darme cuenta.

A mis hermanos, los otros dos con que compartí ese hogar. A Carlos Daniel, pues en algún momento estuve siguiendo sus pasos, y él fue quien tanteó muchos terrenos que luego yo pude pisar con mayor seguridad. A José Antonio, quien siguió mis pasos, pero además de ello me he divertido mucho con él, desde niño y hasta la actualidad, tocando la guitarra.

Al resto de mi familia con quienes he tenido la suerte de platicar y convivir, hemos comido juntos y compartido ideas, que me han prestado sus hogares y del mismo modo, me han abierto sus corazones. Quisiera mencionar aquí a mis tíos José Vélez, Galdina Baltazar, Julia Ixta y Leonor Ixta, con quienes he tenido grandes charlas, y a mis primos Alan Vélez, Axel Vélez, Alberto Gutiérrez y Yessica Gonzáles con quienes me llegué a divertir bastante.

A mis amigos, sobre todo a mi mejor amiga, Jocelyn Briseida, mi otro hogar, a quien conocí

desde la preparatoria y que a pesar de la distancia, nos hemos mantenido cercanos durante todos estos años, debe saber que siempre nos tendremos el uno al otro y que se ha vuelto una persona muy importante en mi vida.

A mis amigos de la preparatoria, Lezama Valeria, Karen, Amanda, Sarahi, Memo, Ricardo, Bryan y Fercho con quienes guardo muy buenos recuerdos de aquella etapa. De igual manera, a mis amigos de la Facultad, Armando, Itzel, Grecia, Diana, Max, Stephie, Viri, Selene y Benjamín, de quienes he aprendido, recibido y dado consejos. También a Kenya, a quien aún tengo en gran aprecio y que me hizo el favor de llevar a imprimir este trabajo.

Y por último, a los gigantes que jamás conocí en persona, pero que me prestaron sus hombros para que pudiera ver más allá, cuyas valiosas ideas y formación han transmitido a través de los libros que conocí y las canciones que disfruté a lo largo de mi vida. Para ellos sólo basta decir: crecí queriendo convertirme en lo que ustedes han llegado a ser.

# Índice general

---

<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
<b>2. Marco teórico</b>	<b>9</b>
2.1. Célula bacteriana . . . . .	9
2.1.1. Generalidades de la célula bacteriana . . . . .	9
2.1.2. Estructura de la célula bacteriana . . . . .	10
2.1.2.1. Pared celular . . . . .	10
2.1.2.2. Lipopolisacárido . . . . .	11
2.1.2.3. Formación de la pared celular . . . . .	11
2.1.3. Genética microbiana . . . . .	12
2.1.3.1. Replicación . . . . .	12
2.1.4. Las bacterias y el hombre . . . . .	13
2.2. Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud . . . . .	14
2.2.1. Panorama general de las IAAS . . . . .	15
2.2.2. Casos de IAAS en México . . . . .	15
2.2.3. Principales agentes etiológicos . . . . .	16
2.3. Microorganismos seleccionados para este trabajo . . . . .	17
2.3.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> . . . . .	17
2.3.1.1. Infecciones asociadas a <i>K. pneumoniae</i> . . . . .	18
2.3.1.2. Factores de patogenicidad . . . . .	18
2.3.2. <i>Escherichia coli</i> . . . . .	18
2.3.2.1. Infecciones asociadas a <i>E. coli</i> . . . . .	19
2.3.2.2. Factores de patogenicidad . . . . .	19
2.3.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . . . . .	19
2.3.3.1. Infecciones asociadas a <i>P. aeruginosa</i> . . . . .	19
2.3.3.2. Factores de patogenicidad . . . . .	20
2.3.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> . . . . .	20
2.3.4.1. Infecciones asociadas a <i>A. baumannii</i> . . . . .	21
2.3.4.2. Factores de patogenicidad . . . . .	21
2.4. Antibióticos . . . . .	21
2.4.1. $\beta$ -lactámicos . . . . .	22
2.4.2. Carbapenémicos . . . . .	23
2.4.2.1. Imipenem . . . . .	23
2.4.2.2. Meropenem . . . . .	24
2.4.2.3. Ertapenem . . . . .	24
2.4.2.4. Doripenem . . . . .	25
2.4.3. Mecanismo de acción . . . . .	25



## ÍNDICE GENERAL

---

2.5.	Resistencia bacteriana . . . . .	26
2.5.1.	Origen de la resistencia . . . . .	27
2.5.2.	Propagación de la resistencia . . . . .	27
2.5.3.	Mecanismos de resistencia . . . . .	28
2.5.3.1.	$\beta$ -lactamasas . . . . .	29
2.6.	Carbapenemasas . . . . .	29
2.6.1.	Generalidades de las carbapenemasas . . . . .	29
2.6.2.	Clases de carbapenemasas . . . . .	30
2.6.2.1.	VIM . . . . .	30
2.6.2.2.	NDM . . . . .	31
2.6.2.3.	KPC . . . . .	31
2.6.2.4.	OXA . . . . .	31
2.6.3.	Carbapenemasas en microorganismos de interés . . . . .	31
2.7.	Pruebas de detección de carbapenemasas . . . . .	33
2.7.1.	Pruebas de difusión en agar . . . . .	33
2.7.1.1.	Prueba de 12 Discos . . . . .	33
2.7.2.	Pruebas colorimétricas . . . . .	33
2.7.2.1.	Carba NP . . . . .	34
2.7.3.	Pruebas moleculares . . . . .	34
2.7.3.1.	Carba R . . . . .	34
2.8.	Justificación . . . . .	35
<b>3.</b>	<b>Hipótesis y Objetivos</b> . . . . .	<b>37</b>
3.1.	Hipótesis . . . . .	37
3.2.	Objetivos . . . . .	38
<b>4.</b>	<b>Metodología</b> . . . . .	<b>39</b>
4.1.	Prueba de 12 Discos . . . . .	42
4.1.1.	Material y reactivos . . . . .	42
4.1.2.	Procedimiento . . . . .	42
4.2.	Carba NP . . . . .	43
4.2.1.	Material y reactivos . . . . .	43
4.2.2.	Procedimiento . . . . .	44
4.3.	Carba R . . . . .	45
4.3.1.	Material y reactivos . . . . .	45
4.3.2.	Procedimiento . . . . .	45
<b>5.</b>	<b>Resultados y discusión</b> . . . . .	<b>49</b>
5.1.	Resultados . . . . .	49
5.1.1.	Prueba de difusión en agar . . . . .	50
5.1.2.	Carba NP . . . . .	52
5.1.3.	Carba R . . . . .	52
5.1.4.	Resultados globales . . . . .	53
5.2.	Discusión . . . . .	56
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b> . . . . .	<b>61</b>

<b>A. Halos de inhibición para prueba de difusión en Agar</b>	<b>63</b>
A.1. <i>Enterobacteriaceae</i> . . . . .	63
A.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . . . . .	64
A.3. <i>Acinetobacter baumannii</i> . . . . .	64
<b>B. Tabla de resultados</b>	<b>65</b>
<b>C. Cepario del Laboratorio Central de Vigilancia Epidemiológica y Sanitaria del     ISSSTE</b>	<b>71</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>73</b>







# Resumen

---

La resistencia a los antibióticos se ha convertido, en las últimas décadas, en una grave amenaza para seguridad alimentaria, sanitaria y la economía de los países. Existen microorganismos que producen enzimas capaces de degradar antibióticos  $\beta$ -lactámicos, extendiéndose la resistencia incluso a los carbapenémicos. El problema ha crecido tanto que la Organización Mundial de la Salud ha publicado listas en las que figuran como prioridad organismos de la familia *Enterobacteriaceae*, así como las especies *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.

El objetivo de este trabajo fue detectar y caracterizar carbapenemasas en Enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores, responsables de causar Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) en tres hospitales del ISSSTE. Las metodologías utilizadas fueron la prueba de difusión en agar de 12 Discos, la prueba colorimétrica Carba NP y una RT-PCR elaborada con el kit Xpert® Carba-R. Se encontró una alta cantidad de aislados de *Klebsiella pneumoniae* productores de carbapenemasas y una existencia casi nula de mecanismos enzimáticos contra carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa*. La resistencia general a los carbapenémicos fue considerable en todos los aislados, a excepción de *Escherichia coli*, donde la mayoría de los aislados aportados por los hospitales resultaron susceptibles a carbapenémicos.

Dada la poca detección de carbapenemasas en *Acinetobacter baumannii*, se sugieren modificaciones en las pruebas colorimétrica y molecular realizadas, para esclarecer los mecanismos de resistencia encontrados en este microorganismo.



---

## Capítulo 1

# Introducción

---

Durante las últimas décadas, se ha observado un incremento en el número de microorganismos resistentes a los antibióticos. Estos microorganismos se han encontrado, no sólo en el hombre, sino también en otros animales e incluso en los alimentos o el medio ambiente; convirtiéndose en una amenaza para la salud mundial, y además para la seguridad alimentaria y la economía de los países<sup>1</sup>.

Se han identificado distintas causas como son la propagación de microorganismos con genes de resistencia al medio ambiente, el uso inapropiado de antibióticos en el ganado y la prescripción inadecuada de los mismos a pacientes. Sobre esto último, en Latinoamérica, se está llevando a cabo una mala regulación para la venta de antibióticos, tanto en el sector salud como en la ganadería<sup>2</sup>.

Independientemente de la razón, todas estas prácticas someten a los microorganismos a un estrés que los induce a desarrollar estrategias evolutivas para preservar su supervivencia. A medida que son fabricados nuevos antibióticos, los microorganismos han desarrollado distintas modificaciones y adaptaciones, ya sea genéticas o en su estructura, para adquirir resistencia a estas sustancias<sup>3</sup>.

Estas adaptaciones son denominadas mecanismos de resistencia a antibióticos y pueden ser tanto intrínsecas, es decir que se encuentren en la célula de forma natural; o adquiridas, en donde la célula ha desarrollado esa resistencia gracias a una mutación o por la obtención de un gen de resistencia a antibióticos de otro microorganismo, como pueden ser transposones, integrones o plásmidos<sup>4</sup>.

Los mecanismos de resistencia a antibióticos se agrupan en tres categorías: alteración del sitio blanco, alteración de la permeabilidad de la membrana e inactivación del antibiótico por medio de enzimas. La resistencia conferida por la alteración del sitio blanco, como su nombre lo especifica, es la modificación de ciertos sitios, como la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o la 30S del ribosoma, eliminando así la posibilidad del antibiótico de ejercer su mecanismo de acción. La alteración de la permeabilidad de la membrana consiste en cambios estructurales de los componentes de la envoltura bacteriana que influyen en la permeabilidad, en la pérdida de capacidad de transporte activo o por la expresión de bombas de eflujo; así como la alteración de receptores bacterianos específicos para antibióticos. Finalmente, la inactivación del antibiótico es la degradación o modificación de la estructura química de la sustancia antimicrobiana mediante la producción de enzimas, como pueden ser las  $\beta$ -lactamasas<sup>5</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas se han ido presentando al mismo tiempo que se han suministrado los distintos antibióticos  $\beta$ -lactámicos, llegándose a observar inicialmente en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y posteriormente en *Klebsiella pneumoniae*. Del mismo modo,



## 1. INTRODUCCIÓN

---

han aparecido las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), siendo identificadas por primera vez en *Klebsiella ozaenae*, y tiempo después en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*<sup>6</sup>.

Un tipo particular de  $\beta$ -lactamasas son las carbapenemasas, capaces de hidrolizar carbapenémicos. Con base en estudios moleculares, las carbapenemasas se pueden clasificar en enzimas de serina, las cuales poseen un residuo de serina en el sitio activo, y metalo- $\beta$ -lactamasas, que requieren de cationes divalentes, por lo general Zinc<sup>2+</sup>, para llevar a cabo su actividad<sup>7</sup>.

Las enzimas tipo serina con actividad de carbapenemasas, pertenecen a la clase A y D de Ambler, las de la clase A pueden hidrolizar una gran variedad de betalactámicos como carbapenémicos, cefalosporinas, penicilinas y aztreonam, siendo características dentro de la familia Enterobacteriaceae. Las de clase D comprenden la segunda familia más grande de  $\beta$ -lactamasas, también son llamadas enzimas tipo oxacilinasas (OXA) y los microorganismos que las producen son *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, entre otros<sup>8</sup>.

Existen diversas pruebas para la detección de carbapenemasas, como los ensayos fenotípicos, estos ensayos son capaces de detectar la hidrólisis del carbapenémico por células resistentes al fármaco, un ejemplo de ello es el Test de Hodge Modificado, que es una prueba de difusión en agar. También existen pruebas que utilizan inhibidores de carbapenemasas como el Test del ácido fenilborónico. Y del mismo modo, se conocen pruebas moleculares capaces de detectar genes responsables de la producción de carbapenemasas, como son la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), PCR en tiempo real, hibridación del DNA y la secuenciación<sup>8</sup>.

Un tipo particular de pruebas fenotípicas son las colorimétricas, que están basadas en la hidrólisis de carbapenémicos y se valen de un indicador capaz de detectar el cambio de pH debido a la degradación del antibiótico que realiza la enzima. Una de estas pruebas es Carba NP, que permite la detección de la enzima en tan solo dos horas y que ha mostrado una buena especificidad para la detección de carbapenemasas, solo que se tiene el inconveniente de tener baja sensibilidad para detectar las enzimas tipo OXA<sup>9</sup>.

Los diferentes tipos de pruebas para la detección de carbapenemasas (moleculares, fenotípicas y colorimétricas) proporcionan distintas piezas de información sobre la manera en que ocurre la resistencia al carbapenémico, por lo que la aplicación conjunta y el contraste de las metodologías sirven para obtener una comprensión más completa de los mecanismos de resistencia en bacterias. Su aplicación es de gran importancia en el ámbito hospitalario, resaltando su utilización en la vigilancia de la resistencia, más específicamente, en los casos de las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) que, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud<sup>10</sup>, son infecciones contraídas por un paciente durante su tratamiento en un hospital u otro centro sanitario y que dicho paciente no tenía ni estaba incubando en el momento de su ingreso. Estas infecciones representan un gran peligro para la seguridad hospitalaria ya que son el evento adverso más frecuente durante la prestación de la atención sanitaria y aún no se ha desarrollado una solución factible al problema, además de que el riesgo de contraer IAAS es mayor en hospitales de países en vías de desarrollo.

Para la elección de los microorganismos que se utilizarán en este estudio, se consultó el informe de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica<sup>11</sup> (RHoVE), en el cual se identificaron los principales agentes etiológicos de IAAS en Unidades de la RHoVE en México. De acuerdo con este informe, del total de IAAS notificadas fue posible identificar el 56.3% de los principales agentes etiológicos aislados, los cuales fueron *Escherichia coli* (18.8%), *Pseudomonas aeruginosa* (12.4%), *Klebsiella pneumoniae* (9.5%), *Staphylococcus aureus* (7.0%), *Acinetobacter baumannii* (6.6%), entre otras. Estos microorganismos, a su vez, han sido identificados con altos perfiles de resistencia antimicrobiana. De manera que, es necesario el uso de metodologías para la detección de carbapenemasas que puedan proporcionar las bases para trabajar en mejores estrategias para disminuir el acelerado aumento en la resistencia bacteriana<sup>11</sup>.

---

El objetivo de este trabajo fue detectar y caracterizar carbapenemasas en Enterobacterias y bacilos gram negativos no fermentadores, responsables de causar IAAS en tres hospitales del ISSSTE. Se comenzará este trabajo hablando de la características de la célula bacteriana y las razones por las cuales las bacterias se han convertido en una amenaza para la salud. En la sección 2.2, se hablará de cómo los hospitales han servido como una fuente de propagación de la enfermedades infecciosas, con las llamadas IAAS. En la sección 2.3, se contará más a detalle las principales características de los microorganismos utilizados en este estudio. En las secciones 2.4, 2.5 y 2.6 se abundará sobre una de las principales respuestas que han desarrollado los seres humanos a las infecciones bacterianas: los antibióticos; así como de los mecanismos de resistencia que han desarrollado las bacterias para contrarrestar los antibióticos y la resistencia mediada por carbapenemasas. Se terminará el marco teórico, enunciando las pruebas de detección de carbapenemasas utilizadas para este estudio, en la sección 2.7.



---

## Capítulo 2

# Marco teórico

---

### 2.1. Célula bacteriana

En el marco actual de la biología se considera a la célula como la unidad fundamental de la vida. Más aún, la vida es una propiedad emergente de las reacciones químicas acontecidas en el interior de la célula y sus interacciones con el medio externo. Las células pueden agruparse en una basta cantidad de formas para dar lugar a configuraciones cada vez más complejas, pero es también interesante el estudio de la célula en una de sus formas más sencillas: la célula bacteriana.

#### 2.1.1. Generalidades de la célula bacteriana

De acuerdo con la clasificación de Woese et al.<sup>12</sup>, las bacterias pertenecen al dominio *Bacteria* y se encuentran al mismo nivel que *Arhcaea* y *Eucarya*. Esta clasificación se basa en el grado de homología entre las secuencias del RNA ribosomal. En el dominio *Bacteria* se encuentran células procariotas con rRNA de 70 subunides, en su membrana contienen, en su mayoría, lípidos constituidos por diacil diésteres de glicerol y en su pared celular contienen peptidoglicano<sup>13</sup>.

Las bacterias corresponden a un grupo de microorganismos bastante heterogéneo por sus múltiples y complejos mecanismos de reproducción, pero de manera general puede decirse que sus dimensiones suelen oscilar entre los 0.3 y 5  $\mu\text{m}$ , carecen de una membrana que englobe el material genético y no poseen histonas asociadas al mismo. En cuanto a su morfología, presentan variedad de formas como cocos, bacilos y espiroquetas que a su vez pueden presentarse en agrupaciones como es el caso de los estreptococos, estafilococos diplococos, entre otros. Algunos géneros tienen la capacidad de producir esporas, como es el caso de *Bacillus* y *Clostridium*. Con respecto a su alimentación, la mayor parte son heterótrofas, aunque también existen grupos fotoautotrófos y quimioautótrofos<sup>14-16</sup>.

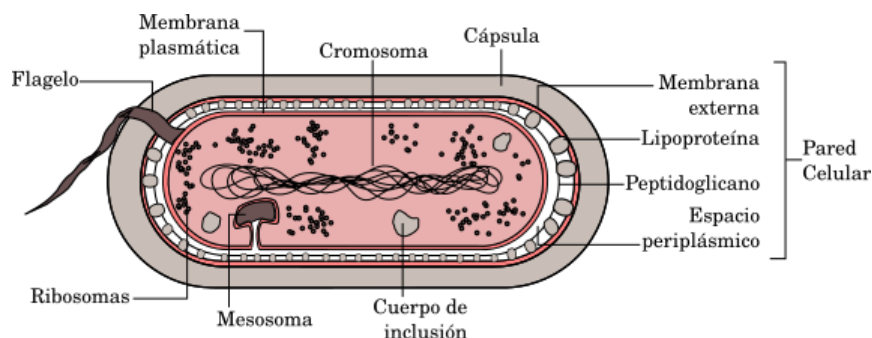
Asímismo, para su identificación, las bacterias pueden ser clasificadas en gram negativas, gram positivas y micoplasmas, siendo la mayor diferencia entre gram positivas y negativas, el grosor de la pared celular, mientras que en micoplasmas hay ausencia de pared celular, pero es posible encontrar precursores de peptidoglicano rodeando la membrana celular<sup>13,17</sup>. Este trabajo, se centrará únicamente en la bacterias identificadas como gram negativas.

### 2.1.2. Estructura de la célula bacteriana

En la Figura 2.1 se presenta un esquema con la estructura estándar de una bacteria gram negativa. La característica más conocida de las bacterias es la ausencia de material genético compartimentado por una membrana, en su lugar, el ácido desoxirribonucleico (DNA), que suele estar compuesto por un solo cromosoma, se encuentra en una región denominada nucleoide que abarca gran parte del citoplasma. Las bacterias poseen plásmidos, pequeños fragmentos circulares de DNA extracromosomal que les son de utilidad para propagar distintos tipos de genes de los que se hablará con mayor detalle en el apartado 2.5.2. Los ribosomas son proteínas esenciales para el proceso de transcripción, además de ser uno de los blancos de los antibióticos<sup>18</sup>.

Algunas estructuras externas de la célula bacteriana son los *pilus*, apéndices semejantes a cabellos anclados a la membrana de algunas bacterias y que cumplen las funciones de permitir a la bacteria adherirse a superficies, así como de facilitar la transferencia horizontal de material genético. Otro tipo de apéndices muy distintos son los flagelos que están anclados a los cuerpos basales de ciertas bacterias y que son responsables de la motilidad de las mismas<sup>18,19</sup>.

La membrana plasmática de *Bacteria* es muy similar en estructura a *Eukarya*, pero carece de esteroides en la mayoría de los organismos. El espacio periplásmico entre la membrana plasmática y la membrana externa de las gram negativas contiene enzimas y otras proteínas que se encargan del transporte de energía y nutrientes de la célula, así como de la síntesis de sus componentes estructurales (Figura 2.2).

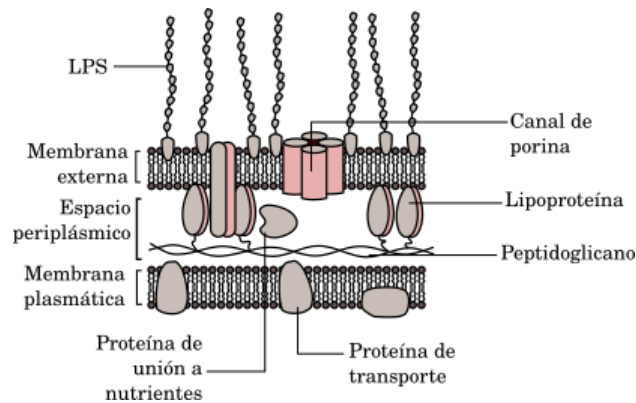


**Figura 2.1:** Estructura interna y externa de la bacteria gram negativa. El DNA de la mayoría de estos organismos se conforma por un sólo cromosoma. Una de las principales características las gram negativas es la presencia de una membrana externa en la pared celular. Modificado de: [Rosenthal y Tan, 2011](#).

#### 2.1.2.1. Pared celular

La pared celular de las bacterias gram negativas (Figura 2.2) está conformada por una delgada capa peptidoglicano o red de mureína, un espacio periplásmico y una membrana externa. La mayor parte de la pared celular son lipoproteínas y lipopolisacáridos que representan alrededor del 80% del peso seco de la pared. La membrana externa de las bacterias gram negativas está unida a la red de mureína, esta membrana funciona como una barrera de permeabilidad selectiva, gracias a la presencia de porinas; además de proporcionar protección contra las

condiciones adversas del entorno como el sistema digestivo del hospedero, en el caso de los microorganismos patógenos. Se constituye en su mayoría por lipopolisacáridos, también llamados endotoxinas sobre las que se abundará en el siguiente apartado. En el espacio periplásmico se encuentran lipoproteínas unidas de manera covalente a la membrana externa y proteínas de unión a nutrientes que se encargan del transporte de moléculas a través de la pared.<sup>16,18</sup>



**Figura 2.2:** Estructura de la pared celular de las bacterias gram negativas. La pared celular está conformada por peptidoglicano, espacio periplásmico y membrana externa. Las porinas de la membrana permiten el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas a la célula. Modificado de: [Rosenthal y Tan, 2011](#).

### 2.1.2.2. Lipopolisacárido

Los lipopolisacáridos juegan un papel importante en la patogenicidad de las bacterias pues participan en la interacción del microorganismo con el sistema inmune del hospedero. La estructura general del lipopolisacárido (Figura 2.3) es un heteropolisacárido fosforilado, unido de manera covalente a un lípido de la membrana externa que está conformado por una molécula de disacárido difosfato y ácidos grasos que conectan con la membrana externa, esta región se denomina lípido A y es responsable de las propiedades patofisiológicas de los lipopolisacáridos. En el hospedero, las actividades biológicas de mayor relevancia son la activación de macrófagos y la producción de citocinas y otros mediadores del sistema inmune<sup>20</sup>.

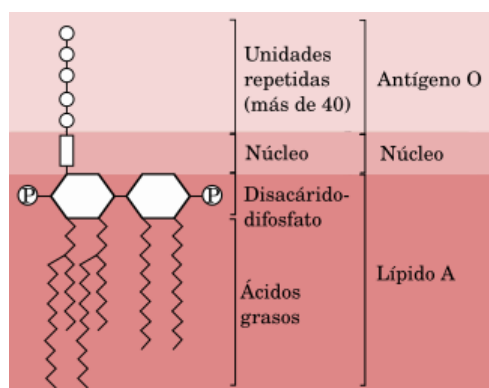
La otra región se encuentra fuera de la membrana externa y se divide en núcleo y antígeno O. El antígeno O está compuesto por un polisacárido lineal conformado por entre 50 y 100 subunidades de azúcares repetidas. El antígeno O es la porción del lipopolisacárido que interactúa con el sistema inmune del hospedero<sup>20</sup>.

### 2.1.2.3. Formación de la pared celular

El peptidoglicano es el componente principal de la pared celular bacteriana, el esqueleto de peptidoglicano está compuesto por largas cadenas de glúcidos, formadas a partir de la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina, a menudo abreviadas como

## 2. MARCO TEÓRICO

---



**Figura 2.3:** Estructura general del lipopolisacárido presente en las bacterias gram negativas. El lipopolisacárido está dividido en lípido A, núcleo y antígeno O, siendo esta última región la que interactúa con el sistema inmune del hospedero. Modificado de: [Rojas-Campos, 2009](#).

NAM y NAG, respectivamente. Inicialmente, estos componentes se sintetizan al interior de la célula y son transportados hacia el espacio periplásmico<sup>19,21</sup>.

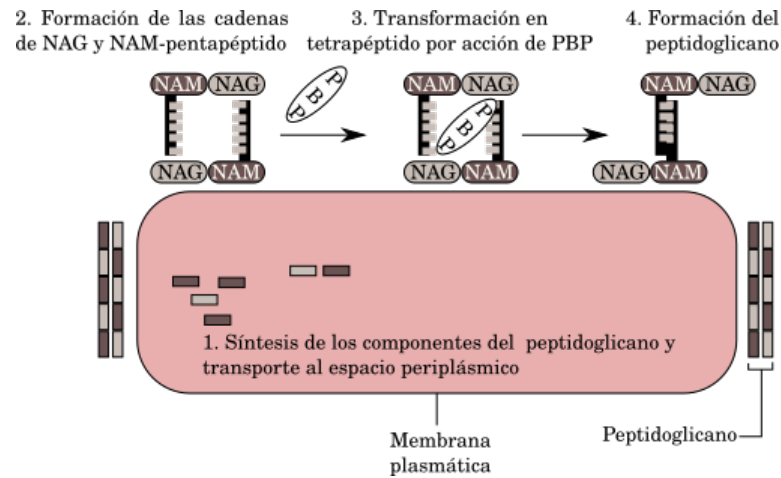
La formación del peptidoglicano (Figura 2.4) consiste en la unión de NAM y NAG para la formación de cadenas de pentapéptidos. Los pentapéptidos pierden uno de sus aminoácidos terminales y pasan a convertirse a tetrapéptidos, en este paso interviene una enzima llamada transpeptidasa o proteína de unión a penicilinas (PBP). Este es el último paso de la formación de la pared celular y es el principal blanco de las penicilinas<sup>19</sup>, como veremos en el apartado 2.4.3

### 2.1.3. Genética microbiana

El nucleóide es la región que contiene el material genético de las bacterias, está compuesto en su mayoría por DNA, pero también contiene RNA mensajero y proteínas que funcionan como factores de transcripción. El genoma bacteriano suele estar conformado por una única molécula circular de DNA de doble cadena y está organizada en un solo cromosoma. El genoma de las bacterias suele ser pequeño, variando de entre 139 a 13,000 kpb, por lo que se considera que la mayoría del genoma bacteriano (85 %-90 %) está conformado por regiones codificantes, mientras que el porcentaje restante contiene los factores necesarios para coordinar la expresión génica. Las proteínas encargadas de mantener el plegamiento del nucleóide se conocen como proteínas asociadas al nucleóide y son diferentes de las histonas porque no forman nucleosomas, sino que, en su lugar, hacen uso de otros mecanismos como la formación de bucles que promueven el superenrollamiento negativo del DNA.<sup>17</sup>

#### 2.1.3.1. Replicación

El cromosoma bacteriano se replica a partir de un único origen donde se forma una horquilla de replicación. La replicación en bacterias puede ser unidireccional o bidireccional, dependiendo



**Figura 2.4:** Formación de la pared celular bacteriana. NAM = Ácido N-acetilmurámico, NAG = Ácido N-acetilglucosamina, PBP = Proteína de unión a penicilina. Modificado de: [Suárez y Gudiol, 2009](#)

del número de horquillas que se forman en el origen, generalmente la replicación del genoma es bidireccional, mientras que algunos plásmidos se replican de manera unidireccional. Las enzimas que participan en los procesos de replicación son la DNA polimerasa III, la DNA girasa y la helicasa<sup>21</sup>.

El proceso de replicación (Figura 2.5) consta de tres fases, iniciación, enlogación y terminación. Durante la iniciación se da lugar a la formación de las horquillas de replicación por acción de las DNA girasas y las helicasas que dividen el DNA en dos porciones monocatenarias que serán estabilizadas por las proteínas de unión al DNA, estas proteínas impiden la formación de puentes de hidrógeno. Se da la síntesis de un oligonucleótido corto llamado cebador sobre el que la DNA pol III agregará los nucleótidos<sup>17</sup>.

En la etapa de la enlogación, la horquilla de replicación avanza a la par que se van agregando nucleótidos a la cadena recién sintetizada por complementareidad de bases, el principal actor de esta etapa es la DNA pol III, la enlogación ocurre en dirección 5' a 3'<sup>21</sup>.

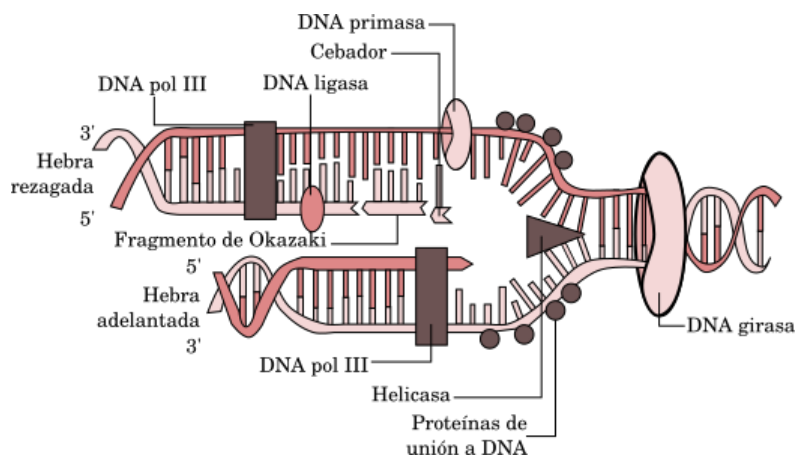
Finalmente, la terminación se da cuando ambas horquillas de replicación han cubierto su mitad del cromosoma correspondiente y llegan a la región terminal del genoma, donde hay secuencias de DNA que dan las instrucciones para que termine la replicación<sup>17,21</sup>.

#### 2.1.4. Las bacterias y el hombre

Las bacterias fueron los primeros colonos del planeta Tierra hace más de 3,300 millones años, por lo que han desarrollado la capacidad de crecer en los ambientes más diversos, tanto en la superficie terrestre como en el aire y en general, en casi cualquier región del planeta. Algunas bacterias pueden vivir de manera individual, pero también las hay que viven asociadas a otros organismos. Existen bacterias que viven en los nódulos de las plantas, en simbiosis; y por supuesto, hay bacterias que habitan de manera permanente en el cuerpo humano<sup>22</sup>.

Tomando ventaja de su gran cantidad de adaptaciones y diversidad de las bacterias, así como de su participación en el funcionamiento de los ecosistemas, el hombre ha empezado a





**Figura 2.5:** Etapas de la replicación del DNA, ésta consiste en las etapas de iniciación, enlongación y terminación. Durante la iniciación participan la helicasa, la DNA girasa y la DNA primasa; en la enlongación interviene la DNA pol III y en la etapa de terminación, la DNA ligasa. Modificado de: [Betancor et al., 2002](#).

explotarlas tanto para la biorremediación y tratamiento de aguas residuales, como para todo tipo de aplicaciones biotecnológicas que van desde la preparación de yogur, suplementos vitamínicos y bebidas alcohólicas, hasta la producción de enzimas capaces de ablandar telas, la fabricación de plásticos biodegradables y la creación de fertilizantes biológicos<sup>23</sup>.

Más allá de lo anterior, las bacterias han prestado servicios al hombre desde antes que éste tuviera uso de la razón. Las bacterias que han colonizado el cuerpo humano, forman parte de la microbiota del mismo y cumplen funciones biológicas muy importantes. El intestino grueso por ejemplo, es considerado un biorreactor, pues contiene bacterias que degradan en compuestos de fácil asimilación algunos alimentos que el cuerpo no sería capaz de digerir por su cuenta. En esta parte del cuerpo, pueden encontrarse cepas de *E. coli*, así como de los géneros *Bifidobacterium* y *Faecalibacterium*<sup>24</sup>.

En el escenario ideal, una microbiota que se encuentra en equilibrio, contiene toda clase de microorganismos que funcionan en conjunto con el cuerpo humano, sin producir ningún tipo de daño, e incluso, reforzando la inmunidad del paciente contra infecciones por bacterias patógenas. Sin embargo, cuando dicho equilibrio se rompe, los microorganismos patógenos y oportunistas colonizan al individuo y evitan que los comensales se establezcan y ocupen los recursos. Es en este último escenario, cuando se produce la enfermedad y ciertas bacterias pasan a convertirse en una amenaza para la salud<sup>24</sup>.

### 2.2. Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud

El papel de las bacterias como agentes patógenos ha sido una de las principales áreas de interés de la medicina. La cualidad de las bacterias como causantes de peligrosas enfermedades es de por sí uno de los roles naturales de estos seres vivos, pero existen múltiples condiciones que han facilitado el desarrollo y propagación de las enfermedades, convirtiéndolas en amenazas

cada vez más graves. Uno de estos escenarios, y que concierne a este trabajo, es el que se ha dado en los hospitales con la aparición de las Infecciones Asociadas a la Atención Salud.

### 2.2.1. Panorama general de las IAAS

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud<sup>10</sup>, las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS), también pueden ser llamadas infecciones nosocomiales u hospitalarias. Estas infecciones son contraídas por un paciente durante su tratamiento en un hospital u otro centro hospitalario. Para que la infección sea considerada como IAAS, debe darse el caso de que el paciente no la hubiera estado incubando al momento de su ingreso. Las IAAS también pueden aparecer tiempo después de que el paciente sea dado de alta; además dentro de las IAAS se incluyen infecciones ocupacionales contraídas por el personal sanitario. Son un evento adverso muy frecuente en todos los países durante la prestación de la atención sanitaria, aunque su carga es mayor en países de ingresos bajos y medianos en comparación con los de ingresos altos. Las IAAS significan un grave impacto en los costos de la atención médica, especialmente por el aumento de días cama que conlleva la contracción de este tipo de infecciones<sup>10</sup>.

Existen una serie de factores que aumentan el riesgo del desarrollo de infecciones durante la prestación de la atención. Estos factores son, en general, el modo de transmisión de los agentes infecciosos, el cuidado que se tenga durante la atención a la salud y las condiciones inmunológicas del paciente. Otros factores son la duración de la exposición, la cantidad del inóculo y la patogenicidad del agente infeccioso, así como las intervenciones en el paciente: la utilización de dispositivos invasivos, la permanencia en servicios de cuidado crítico, la exposición a antimicrobianos y la terapia inmunosupresora. Se considera que las Unidades de Cuidados Intensivos son el principal foco de propagación de las IAAS, ya que el riesgo de contraerlas es de 5 a 10 veces mayor con respecto a otras zonas del hospital<sup>25,26</sup>.

Una de las principales medidas para el control de las IAAS es la vigilancia epidemiológica por parte de profesionales en área clínica. Para ello se han llevado a cabo programas de control de infecciones que consisten en la programación ordenada de las acciones destinadas a controlar y prevenir los riesgos de infección de los pacientes, sus familias y el personal de salud, identificando y priorizando los riesgos de infección, desarrollando estrategias para reducir las infecciones<sup>27</sup>.

De esta manera, la vigilancia epidemiológica permite a los hospitales contar con información suficiente que haga posible la generación de medidas para la contención de las IAAS. Con esta información, es posible explicar la ocurrencia de este tipo de infecciones en los centros hospitalarios y se facilita la identificación de la magnitud del problema en su contexto. Para esto se incluyen datos acerca de la distribución de las IAAS por tipo de paciente, el patógeno causante, la unidad de tratamiento y el período de tiempo de la infección. El conocimiento de estos datos es crucial para centrar los esfuerzos en los problemas y riesgos más serios de IAAS, obtener el apoyo del personal y entregar retroalimentación acerca del resultado de cambios preventivos, además puede usarse para identificar epidemias, evaluar la eficacia de las medidas de control, reforzar prácticas adecuadas de prevención y cuidado, para estudios comparativos y para reducir los riesgos de resultados adversos<sup>28</sup>.

### 2.2.2. Casos de IAAS en México

La prevalencia de las infecciones asociadas con la atención de la salud en el mundo es variable; en países europeos se reportan cifras de 3 a 6 % mientras que en México hay reportes que van de 5 hasta 19.9 %<sup>26</sup>.

La Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHoVE) es el sistema de vigilancia de las IAAS en México, forma parte de la Secretaría de Salud y está encargada de unificar los criterios para la recopilación dinámica, sistemática y continua de la información generada por cada unidad de atención médica hospitalaria afiliada a la RHoVE para la vigilancia, prevención y control de las infecciones nosocomiales, con el objetivo de generar información de calidad de uso clínico y epidemiológico<sup>29</sup>.

Por otra parte, el Subsistema Automatizado de Egresos Hospitalarios (SAEH), también forma parte de la Secretaría de Salud y tiene como función generar información acerca de la atención brindada durante la estancia del paciente en el área de hospitalización. Esto, con la finalidad de evaluar la situación de la salud y la demanda de atención hospitalaria, para la administración y planeación de los servicios de salud<sup>30</sup>.

Rodríguez-Salgado<sup>31</sup>, basándose en datos de la RHoVE y el SAEH, señaló que la tasa de incidencia de estas infecciones fue del 4.7% y la tasa de letalidad del 5.8%, reportándose un número de defunciones asociadas a IAAS de 3,624, en unidades adscritas a la RHoVE. Mientras que en el SAEH, se estimó una tasa incidencia de 1.6 por cada 100 egresos con estancia hospitalaria mayor a dos días; siendo que el promedio de días que permanecieron hospitalizados los pacientes fue de 21.5 días y cumpliéndose cerca del 20% de egresos por defunción. Los rangos de edad más afectados por esta problemática fueron los menores de cinco años y los individuos de entre 40 y 64 años de edad. La mayor incidencia de IAAS reportada ocurrió en el Estado de México, la Ciudad de México, Guanajuato y Tlaxcala. La autora también hace incapié que la información reportada al Sistema Nacional de Información en Salud por parte de los hospitales fue deficiente, por lo que las cifras reportadas difícilmente corresponden con los datos reales y sugiere fomentar el registro de la información de forma consistente y completa con el fin de llevar a cabo una correcta práctica de vigilancia epidemiológica.

### 2.2.3. Principales agentes etiológicos

Las IAAS pueden ser causadas por gran cantidad de microorganismos, pero las principales especies patógenas causantes de este tipo de infecciones y con mayor resistencia bacteriana han sido a menudo asociadas al denominado grupo ESKAPE, este grupo está integrado por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Esta clasificación tiene alcance mundial, aunque es importante conocer como se distribuyen los agentes causantes de IAAS en el país<sup>32</sup>.

La Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica<sup>11</sup>, en su último informe anual, publicó una lista en la que se identifican a los principales agentes etiológicos de IAAS reportados en unidades de la RHoVE en México. Este informe menciona que, del total de IAAS notificadas, fue posible identificar el 56.3%. Los principales agentes aislados están descritos en la Tabla 2.1, entre estos agentes podemos observar que los más recurrentes fueron *Escherichia coli* (18.8%), *Pseudomonas aeruginosa* (12.4%), *Klebsiella pneumoniae* (9.5%), *Staphylococcus aureus* (7.0%) y *Acinetobacter baumannii* (6.6%). Estos microorganismos, a su vez, han sido identificados con altos perfiles de resistencia antimicrobiana.

La presencia de resistencia antibióticos en los microorganismos de este grupo agrava aun más el peligro que representan para la salud humana. Por si fuera poco, esta resistencia está en aumento. Velázquez et al.<sup>33</sup> reportó que de 2003 a 2015 ocurrió un incremento sostenido en la resistencia a antibióticos del 18% al 48%. Un reporte del 2018<sup>34</sup> en Inglaterra indicó un aumento en la resistencia del 35% en infecciones del torrente sanguíneo provocadas por microorganismos resistentes a antibióticos, entre los años 2013 y 2017.

**Tabla 2.1:** Principales 10 agentes etiológicos de IAAS en México<sup>11</sup>

Agente etiológico	Aislamientos	Porcentaje
<i>Escherichia coli</i>	6,550	18.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,342	12.4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,310	9.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,459	7.0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2,290	6.6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,191	6.3
<i>Candida albicans</i>	1,183	5.2
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,311	3.8
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,112	3.2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	895	2.6

## 2.3. Microorganismos seleccionados para este trabajo

El aislamiento constante de microorganismos del grupo ESKAPE y su persistente resistencias a antibacterianos agrava la problemática para la salud humana que representan las IAAS, y al mismo tiempo, facilita el estudio de estos microorganismo, convirtiéndolos en los principales blancos de la microbiología clínica, por lo que la información disponible sobre estas especies es sumamente abundante. En este apartado, se revisarán algunas características de los microorganismos elegidos para este estudio: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

### 2.3.1. *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* es un bacilo gram negativo, no móvil, capaz de fermentar la lactosa, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Dentro del género *Klebsiella*, es considerada la especie de mayor importancia clínica y más estudiada. La mayoría de los aislados de esta especie produce colonias mucoides, en agar MacConkey, las colonias suelen ser de tonalidades rojizas debido a la fermentación de la lactosa. Las cepas de *K. pneumoniae* son ubicuas en la naturaleza, aunque se suelen encontrar asociadas a las mucosas de los mamíferos, específicamente en el humano, se encuentran en la mucosa de la nasofaringe y del intestino; también puede ser parte de la biota transitoria de la piel, siendo muy pocas veces aislada de ésta porque no encuentra las condiciones adecuadas. Otra de sus características habituales es la resistencia a múltiples antibióticos, así como la resistencia intrínseca a la ampicilina y la carbenicilina<sup>35,36</sup>.

### 2.3.1.1. Infecciones asociadas a *K. pneumoniae*

*K. pneumoniae* es un patógeno oportunista que ha sido a menudo asociado con las infecciones nosocomiales, atacando sobre todo a pacientes inmunocomprometidos, su mayor morbilidad y mortalidad se da en Unidades de cuidados intensivos pediátricos y servicios quirúrgicos. *K. pneumoniae* puede causar enfermedades tales como la sepsis, neumonía, infecciones de los tejidos blandos y del tracto urinario, siendo esta última la más común. Es también causa de bacteriemia, infecciones de sitio quirúrgico, infecciones del tracto biliar, peritonitis y meningitis<sup>35,37</sup>.

### 2.3.1.2. Factores de patogenicidad

*K. pneumoniae* tiene múltiples características que le permiten aumentar su patogenicidad. Usualmente desarrolla una cápsula de polisacárido que le da su consistencia mucóide y que es característica de las colonias de esta especie, pero que además, la protege de la fagocitosis por parte de los macrófagos, así como de los factores bactericidas séricos. De acuerdo con sus determinantes antígenos, *K. pneumoniae* se puede clasificar en 77 serotipos diferentes<sup>35</sup>.

Durante el proceso infeccioso, las células de este microorganismo se adhieren al hospedero por medio de *pilus*, asociados con la patogénesis de infecciones del tracto urinario y respiratorio. Los principales reservorios para la transmisión de esta bacteria en los hospitales son el tracto gastrointestinal de los pacientes y las manos del personal sanitario<sup>35</sup>.

Muchas cepas de *K. pneumoniae* producen agentes quelantes llamados sideróforos que le permiten al microorganismo capturar hierro disponible a partir de las proteínas del hospedero. También es capaz de producir citotoxinas y enterotoxinas que, en el caso de esta especie, se ha observado que su papel en la patogenicidad es menor<sup>35</sup>.

Como se ha mencionado antes, una de las principales características de *K. pneumoniae* es la resistencia a múltiples antibióticos, presentando resistencia intrínseca a ampicilina por medio de la enzima SHV-1 de origen cromosómico. Otra enzima que caracteriza a este microorganismo es la carbapenemasa tipo KPC, se ha observado que esta enzima presenta actividad contra un múltiple espectro de  $\beta$ -lactámicos, entre los que se encuentran las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, aztreonam e incluso carbapenémicos; siendo esta especie, la principal productora de KPC<sup>38</sup>.

### 2.3.2. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, fermentador de lactosa y glucosa, anaerobio facultativo que forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*. Cuenta con flagelos periféricos que le permiten movilidad y es capaz de dividirse a temperaturas que van de los 6 a los 50 °C, siendo su temperatura óptima de 37 °C. *E. coli* coloniza el intestino del ser humano pocas horas después de su nacimiento, por lo que se le considera parte de la microbiota y es necesaria durante el proceso digestivo, para la producción de vitaminas B y K. Sin embargo, existen cepas que producen endotoxinas, ya sea propias o adquiridas por intercambio genéticos, lo que las convierte en patógenas. Además de los intestinos de los animales, estas bacterias pueden encontrarse en productos de origen animal y derivados que no hayan sido cocinados correctamente, así como en las frutas o verduras que hayan sido lavadas o regadas con agua contaminada<sup>39-41</sup>.

### 2.3.2.1. Infecciones asociadas a *E. coli*

Las cepas de *E. coli* han sido asociadas con el desarrollo de cuadros graves de diarrea, sobre todo en niños menores de cinco años, personas mayores a 65 años y personas inmunodeprimidas. Los síntomas en adultos sanos suelen ser a menudo diarrea sanguinolenta, acompañada de cólicos abdominales y puede o no presentarse fiebre. Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* patógenas se clasifican en los siguientes seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC). Siendo el grupo más frecuente el enterotoxigénico<sup>39,40</sup>.

### 2.3.2.2. Factores de patogenicidad

Las cepas de *E. coli* a menudo se adhieren a las células de los enterocitos con la ayuda de *pilus*, flagelos o fimbrias, dependiendo de la variedad, la unión también puede estar mediada por intimina o adhesinas e incluso por la formación de microcolonias<sup>39</sup>.

Los patógenos son capaces de producir enterotoxinas, proteínas de cadena simple que le confieren a la bacteria toxicidad contra su hospedero. En *E. coli* están presentes las enterotoxinas LT Y ST. También son capaces de producir citotocinas, como pueden ser las STX y la citolisina A. Otro mecanismo adicional es la estimulación de citocinas proinflamatorias, como pueden ser IFN- $\gamma$ , FNT- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ <sup>39,42</sup>.

*E. coli* tiene la facultad de llevar a cabo la translocación de señales intracelulares, mediante el ingreso de proteínas efectoras al enterocito. Este mecanismo contribuye al daño celular mediante la formación de conductos y poros para la traslocación de proteínas en la membrana del enterocito, así como cambios en el potencial de la membrana de la mitocondria<sup>42</sup>.

### 2.3.3. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista aerobio, a menudo asociado a infecciones hospitalarias. Las colonias de esta especie se caracterizan por presentar, la mayoría, un color verdoso brillante que se debe a la producción de dos pigmentos uno llamado piocianina, de color azul, y otro que es la pioverdina, de color amarillo fluorescente; ambos pigmentos, en conjunto, le dan la coloración característica. También existen variedades de color rojizo o negro que producen piorrubina y piomelina, respectivamente. *P. aeruginosa* es un bacilo gram negativo, no fermenta la lactosa, es oxidasa positivo y puede crecer en temperaturas que van de los 4 a los 42 °C, pero soporta temperaturas superiores a los 42 °C. Estas bacterias habitan en la naturaleza en aguas, suelos y plantas, mientras que en los hospitales se encuentran en respiraderos, humidificadores, vertederos, duchas y en ocasiones hasta en las manos de los trabajadores de salud; también puede formar parte natural de la microbiota del humano. Es un microorganismo muy versátil pues, a pesar de ser aerobio, puede tolerar condiciones bajas de oxígeno, además sobrevive con bajos nutrientes<sup>43-45</sup>.

#### 2.3.3.1. Infecciones asociadas a *P. aeruginosa*

Como ya se ha mencionado antes, *P. aeruginosa* es uno de los microorganismos de mayor impacto en infecciones hospitalarias, con una mortalidad que va desde el 35 al 70%. Este microorganismo ataca principalmente a pacientes con inmunosupresión, y también a pacientes que

han sufrido quemaduras severas, neutropenia inducida por quimioterapia o bien, enfermedades pulmonares subyacentes. El cuadro clínico de la mayoría de los pacientes que sufren infección por esta bacteria es el de un paciente febril e incluso con hipotermia. Las vías respiratorias bajas son el lugar más frecuente de infecciones por esta bacteria. Es capaz de provocar infecciones en casi todo el cuerpo y es causante de diferentes cuadros clínicos entre los que destacan la infección del tracto respiratorio en forma de neumonía, las infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística, y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. También puede producir infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel y de tejido blandas, del oído, oculares, infecciones del torrente sanguíneo y bacteriemias, siendo por esta última razón uno de los microorganismos más temidos en los hospitales<sup>43,46,47</sup>.

### 2.3.3.2. Factores de patogenicidad

*P. aeruginosa* cuenta con diversos y variados factores de patogenicidad, como pueden ser la adherencia por flagelos, adhesinas o por un *pili*, la formación de una matriz de exopolisacáridos o biopelícula o la producción de endotoxinas, pigmentos difusibles y exoenzimas<sup>46</sup>.

En algunas cepas, la producción de alginato, un polímero de polisacáridos, facilita la adherencia a la superficie epitelial pulmonar, actúa como barrera contra la fagocitosis, para los antibióticos, la inhibición de anticuerpos y para atenuar la respuesta inmune del hospedero. La producción de esta endotoxina provoca daño en el epitelio alveolar y las células endoteliales pulmonares, inhibe la síntesis de proteínas de la célula hospedera y afecta la respuesta del hospedero a la infección. También existe la secreción de exotoxinas *exoS* y *exoT* que desorganiza el citoesqueleto de actina de la célula hospedera, bloquea la fagocitosis y causa la muerte celular. Por otra parte, *exoU* favorece la inflamación excesiva e incrementa el daño tisular, provocando muerte celular<sup>43</sup>.

*P. aeruginosa* cuenta con resistencia intrínseca a la mayoría de las penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamida y ácido nalidíxico. El principal factor de resistencia de estas cepas está dado por su membrana externa, con la presencia de bombas de flujo, como *MexAB-OprM*, que es capaz de expulsar antibióticos  $\beta$ -lactámicos, tetraciclina, cloranfenicol, macrólidos, fluoroquinolonas, sulfonamidas y trimetoprima<sup>45,46</sup>.

Los principales mecanismos de resistencia a antibióticos por parte de este microorganismo son la pérdida de porinas de la membrana externa, las bombas de expulsión activa, las  $\beta$ -lactamasas *AmpC* de origen cromosómico, al igual que las  $\beta$ -lactamasas de origen plasmídico, estas últimas pueden ser de varios tipos, como *KPC*, *MBL*, y *OXA*<sup>46</sup>.

### 2.3.4. *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* es un bacilo o cocobacilo gram negativo no fermentador, muchas veces dispuesto en parejas, es catalasa positivo, no cuenta con movilidad y es aerobio estricto. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra alrededor de los 35 °C. Rara vez se encuentra en la naturaleza, pero en seres humanos, se ha aislado de personas sanas a partir de la piel, faringe y varios otros sitios, siendo parte de la microbiota de la piel. En hospitales, ha sido aislado de humidificadores, equipos de ventilación, la piel del personal de salud, colchones, cojines y otros equipamientos; se ha reportado que tiene un sobrevivencia en hospitales de hasta 25 días. Es un microorganismo oportunista y tiene gran importancia en el ambiente hospitalario, debido a la variedad de cuadros clínicos que produce y su resistencia a múltiples antibióticos, lo que complica el manejo de infecciones por esta bacteria<sup>48-51</sup>.



#### 2.3.4.1. Infecciones asociadas a *A. baumannii*

*A. baumannii* es un patógeno nosocomial que infecta por lo general a pacientes con enfermedades graves y diferentes comorbilidades. Entre las infecciones que puede provocar se encuentran las infecciones del torrente sanguíneo y las neumonías asociadas a ventilador mecánico, siendo la primera causa de esta enfermedad. Otras infecciones que puede provocar este microorganismo son bacteriemia, meningitis, infecciones del tracto urinario, peritonitis, infecciones de la piel y de tejidos blandos. Las infecciones del tracto urinario son también frecuentes, aunque su curso clínico suele ser más benigno. Además puede presentarse endocarditis, relacionada a uso de prótesis valvulares y endoftalmitis, relacionadas con el uso de lentes de contacto o tras cirugía oftalmológica; siendo ambos casos más bien excepcionales<sup>49,51,52</sup>.

#### 2.3.4.2. Factores de patogenicidad

Las especies de *A. baumannii* se consideran por lo general microorganismos de baja patogenicidad, salvo en pacientes muy enfermos o inmunocomprometidos. La proteína OmpA, que se encuentra en la membrana externa es una de sus principales determinantes en la gravedad de estos microorganismos, al facilitar la unión con la célula epitelial y a las mitocondrias del hospedero, produciendo daño a las células. *A. baumannii* tiene la capacidad de formar biopelículas que permiten su supervivencia en condiciones ambientales desfavorables en superficies como vidrio y material inerte de equipos médicos; también produce lipopolisacáridos que, en conjunto con las fimbrias, le facilitan la unión a las células epiteliales humanas. Las fosfolipasas de *A. baumannii* catalizan la escisión de fosfolípidos, por lo que se considera que estas enzimas favorecen la lisis de las células del hospedero, y facilitan la entrada del microorganismo mediante la degradación de los fosfolípidos presentes en las barreras mucosas. La producción de sideróforos por algunas cepas le permite a este microorganismo capturar el hierro del cuerpo humano para poder sobrevivir<sup>50</sup>.

Adicionalmente, *A. baumannii*, cuenta con diversos mecanismos de resistencia que pueden resumirse en la disminución de la permeabilidad del antibiótico en la membrana externa mediante la baja expresión de porinas, la expulsión del antibiótico mediante bombas de flujo, la alteración del sitio de acción del antibiótico, como puede ser la modificación de las proteínas de unión a penicilina, y finalmente, la expresión de enzimas  $\beta$ -lactamasas para la degradación del antibiótico. Estos mecanismos le confieren a *A. baumannii*, resistencia a múltiples antibióticos entre los que figuran los carbapenémicos<sup>50</sup>.

## 2.4. Antibióticos

Para responder a la amenaza contra la salud humana que significan los microorganismos se han desarrollado los antibióticos. Los antibióticos son sustancias que inicialmente fueron descubiertas como extractos de plantas y hongos, estas sustancias tienen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano o matarlas por completo. Los antibióticos son de amplio uso debido a su toxicidad selectiva, lo que quiere decir que el daño que provocan a las bacterias es mayor que el que provocan al hospedero. El primer antibiótico en ser descubierto y administrado fue la penicilina, que pertenece al grupo de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.



### 2.4.1. $\beta$ -lactámicos


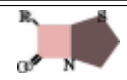
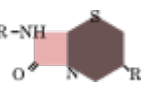
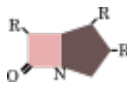
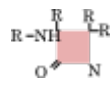

Los antimicrobianos son moléculas de origen biológico, sintéticas o semisintéticas, capaces de inducir la muerte o detención del crecimiento de bacterias u hongos. El término antibiótico es utilizado para referirse a un subgrupo de antimicrobianos con actividad bacteriana. De acuerdo con la interacción del antibiótico con el microorganismo, pueden dividirse en bactericidas, los cuales son letales y su mecanismo de acción culmina con la lisis de la célula bacteriana; y los bacteriostáticos, que en determinadas concentraciones en el suero o tejidos, impiden el desarrollo y división bacteriana sin llegar a eliminar a las células, de manera que el microorganismo puede retomar sus procesos vitales al retirarse el antibiótico<sup>53</sup>.

En el grupo de los antibióticos bacterostáticos se encuentran las sulfamidas, la clindamicina, los macrólidos, las tetraciclinas y el cloranfenicol. Mientras que en los bactericidas podemos identificar los aminoglucósidos, glicopéptidos, quinolonas, la fosfomicina y los  $\beta$ -lactámicos. Los principales grupos de antibióticos se muestran en la Lista 2.1<sup>54</sup>.

**Lista 2.1:** Categorías de antibióticos

I. Bactericidas	II Bacteriostáticos
I. $\beta$ -lactámicos	I. Sulfamidas
a) penicilinas	II. Clindamicina
b) cefalosporinas	III. Macrólidos
c) carbapenémicos	IV. Tetraciclinas
d) monobactámicos	V. Cloranfenicol
II. Aminogucósidos	
III. Glicopéptidos	
a) vancomicina	
b) teicoplanina	
IV. Quinolonas	
V. Fosfomicina	

La principal característica que define químicamente a los  $\beta$ -lactámicos es la presencia de un anillo  $\beta$ -lactámico (Tabla 2.2), el cual está conformado por un anillo heterocíclico de tres átomos de carbono y uno de nitrógeno que determina el mecanismo de acción y la escasa toxicidad directa de este grupo de antibióticos. No obstante, para que el antibiótico sea activo es preciso que esté unido a otros radicales que generalmente son otros anillos, siendo las más relacionadas con su actividad antimicrobiana, farmacocinética y toxicidad. Además de modificar las propiedades del compuesto, los anillos complementarios dan lugar a los diferentes grupos de  $\beta$ -lactámicos<sup>19,55,56</sup>.

 Anillo $\beta$ -lactámico + anillo secundario = Núcleo del $\beta$ -lactámico $\rightarrow$ Grupo			
	Anillo tiazolidínico	Ácido 6-aminopenicililánico	Penicilinas
	Anillo dihidrotiacínico	Ácido 7 $\alpha$ -cefalosporínico	Cefalosporinas
	Anillo pirrolínico	Carbapenemo	Carbapenémicos
	Ninguno	Monobactamo	Monobactámicos
	Anillo oxazolidínico	Clavamo/oxapenamo	Ácido clavulánico

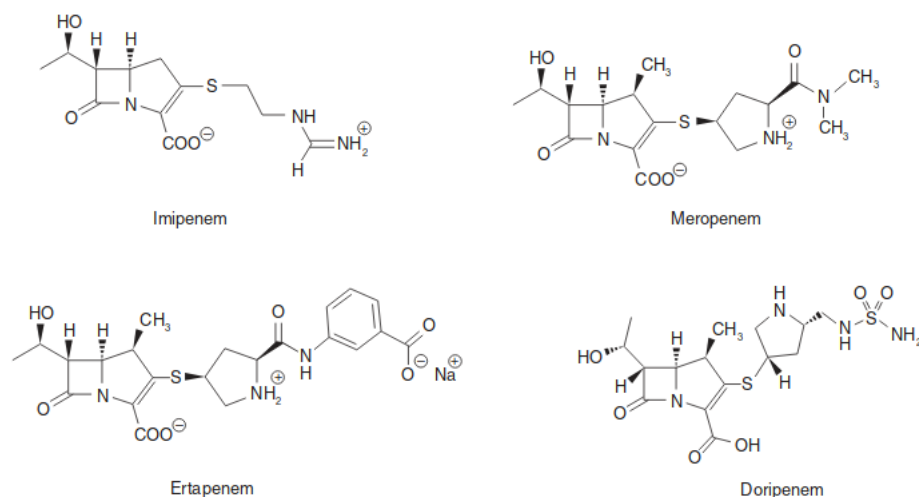
**Tabla 2.2:** Estructura química de los subgrupos de  $\beta$ -lactámicos. Modificado de: [Suárez y Gudiol, 2009-](#)

## 2.4.2. Carbapenémicos

Los carbapenémicos son un derivado de la tienamicina, metabolito de la bacteria *Streptomyces cattleya*. El primer carbapenémico sintetizado fue el N-formimidol tienamicina o imipenem. La principal característica de los carbapenémicos, que los distingue del resto de los  $\beta$ -lactámicos es la presencia de un anillo pirrolidínico no saturado de cinco átomos, condensado con el anillo  $\beta$ -lactámico. El anillo pirrolidínico cuenta con un átomo de carbono en la posición uno y un enlace no saturado entre las posiciones dos y tres. Además, los carbapenémicos tienen en posición seis un grupo hidroxietilo en configuración *trans* que protege al anillo  $\beta$ -lactámico de muchas serino- $\beta$ -lactamasas, y en posición tres un radical carboxilo, indispensable para que el anillo pirrolidínico active al  $\beta$ -lactámico. Los distintos tipo de carbapenémicos mostrados en la Figura 2.6, son derivados de sustituciones en las posiciones 1 y 2<sup>57,58</sup>.

### 2.4.2.1. Imipenem

El imipenem se suele suministrar en conjunto con cilastina, para evitar la degradación del fármaco por la enzima dehidropeptidasa renal humana. Este antibiótico presenta un amplio espectro de actividad que incluye a la mayoría de los microorganismos patógenos gram positivos y gram negativos tanto aerobios como anaerobios y posee una marcada actividad contra especies productoras de  $\beta$ -lactamasas. Es particularmente beneficioso en casos donde el microorganismo patógeno no ha sido todavía identificado, estando indicado en el tratamiento empírico de infecciones nosocomiales graves, de infecciones graves en pacientes de unidades de cuidados intensivos y episodios febriles en pacientes neutropénicos inmunodeprimidos<sup>59</sup>.



**Figura 2.6:** Estructura química de los carbapenémicos. Recuperado de: [Moreno, 2013](#).

#### 2.4.2.2. Meropenem

Meropenem es un compuesto químicamente similar a imipenem, con un grupo metilo en el carbono 1 y un grupo dimetilcarbamoylpirrolidintio en el carbono 2 que sustituye a la cadena lateral tio-alquílica del imipenem. Es precisamente esta sustitución la que incrementa la actividad del meropenem respecto a imipenem frente a bacilos gramnegativos. Otra ventaja de este antibiótico radica en una de sus propiedades farmacocinéticas: alcanza concentraciones terapéuticas en el líquido ceforraquídeo (LCR) sin producir convulsiones y se tolera muy bien cuando se administra en bolo intravenoso (1 g en cinco minutos), al contrario que imipenem-cilastatina, cuya administración rápida se asocia con náuseas y vómitos. Dispone de un amplio espectro antibacteriano, con actividad frente a bacterias aerobias y anaerobias gram positivas y gram negativas, incluidas las productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y las gram negativas no fermentadoras, por lo que puede indicarse en el tratamiento de infecciones polimicrobianas en las que predominen estos agentes patógenos<sup>60,61</sup>

#### 2.4.2.3. Ertapenem

Ertapenem es un 1- $\beta$ -metil carbapenem, estable a las dihidropeptidasas renales por lo que no requiere coadministración de cilastatina como inhibidor, tiene un grupo hidroxietilo en el carbono 6, similar a imipenem y meropenem, confiriéndole estabilidad frente a hidrólisis por  $\beta$ -lactamasas. A diferencia de otros carbapenémicos, el ertapenem cuenta con un grupo metilo en el carbono 4, una cadena sulfhidrido y una cadena lateral aniónica benzoato que modifica la carga molecular global, aumentando la unión a proteínas plasmáticas y alargando su vida media. Tiene una alta tasa unión a proteínas plasmáticas  $> 95\%$  (reversible) con una vida media de  $4.9 \pm 0.7$  horas lo que permite dosificación una vez al día en administración endovenosa o intramuscular. La depuración total es 10 a 18% mayor que la filtración glomerular sugiriendo una posible vía secretoria de eliminación. El ertapenem reconstituido con lidocaína al 1% es absorbido prácticamente en su totalidad luego de su administración intramuscular,

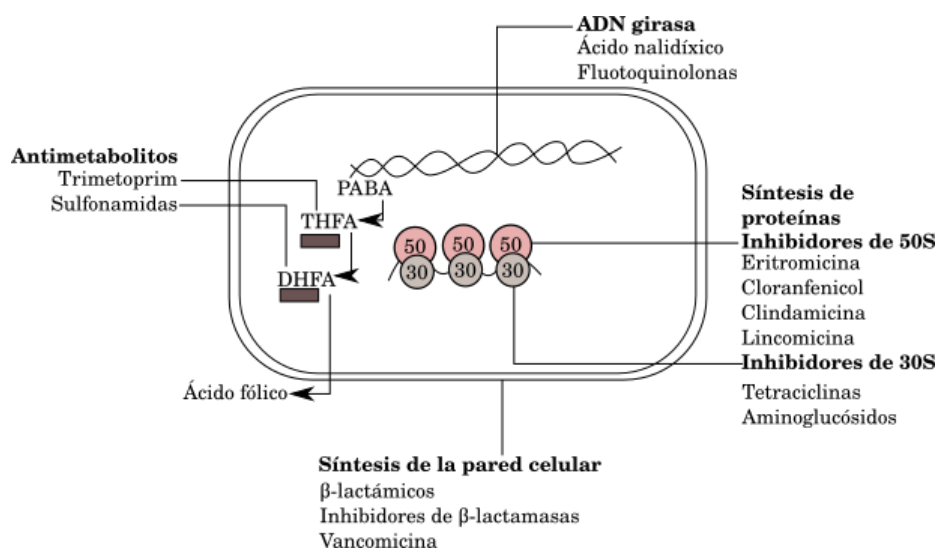
con una biodisponibilidad promedio del 90%. El pico de concentración plasmática seguido de 1 g intramuscular se alcanza aproximadamente a las 2.3 horas<sup>62</sup>.

#### 2.4.2.4. Doripenem

La estructura química del doripenem se diferencia de los carbapenémicos en que cuenta con una sustitución del carbono de la posición 1 por un átomo de azufre. Además, la cadena secundaria de 1- $\beta$ -metil en este antibiótico previene la hidrólisis mediante la enzima dehidropeptidasa renal humana, característica que comparte con ertapenem y meropenem. El doripenem tiene un espectro de actividad similar al imipenem-cilastina. Este carbapenémico ha sido clasificado para el tratamiento de infecciones intrabdominales y de infecciones del tracto urinario. También se utiliza para tratar neumonía hospitalaria y bacterias provenientes de infecciones asociadas a catéter<sup>63</sup>.

#### 2.4.3. Mecanismo de acción

Los antibióticos pueden actuar en distintos sitios de la célula bacteriana (Figura 2.7), ya sea para inhibir la síntesis de proteínas en las subunidades 30S o 50S, para inhibir la actividad del DNA, los metabolitos de la célula, las DNA girasas o la síntesis de la pared celular<sup>64</sup>.



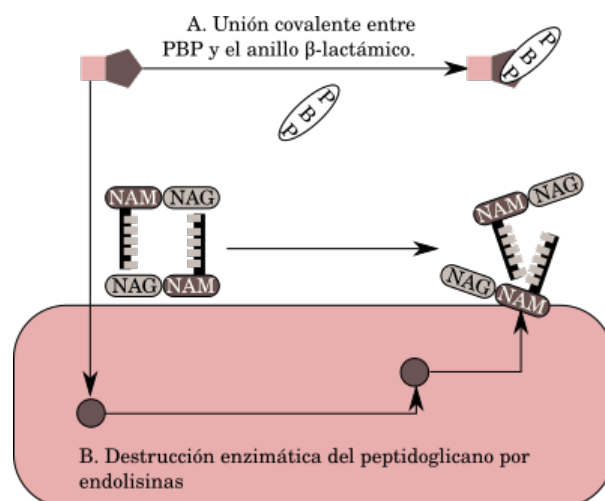
**Figura 2.7:** Mecanismos de acción de los antibióticos. Existen distintos sitios de acción, dependiendo del tipo de antibiótico, los  $\beta$ -lactámicos ejercen su mecanismo al inhibir la síntesis de la pared celular. Modificado de: [Herrera et al., 2015](#).

Los  $\beta$ -lactámicos actúan sobre la síntesis de la pared celular bacteriana que, como vimos en el apartado 2.1.2.1, está compuesta por peptidoglicano, que a su vez está conformado por N-acetil-murámico, N-acetil-glucosamina y una cadena lateral conformada por un pentapéptido. Los  $\beta$ -lactámicos también actúan activando la autólisis que destruye el peptidoglicano. Las cepas que carecen de autolisina inhiben su crecimiento en presencia del  $\beta$ -lactámico, pero no

## 2. MARCO TEÓRICO

---

se destruyen completamente. El mecanismo de acción de los  $\beta$ -lactámicos está descrito en la Figura 2.8<sup>19</sup>.



**Figura 2.8:** Mecanismos de acción de los  $\beta$ -lactámicos. El  $\beta$ -lactámico actúa inhibiendo la formación de la pared celular (A) y activando endolisinas que degradan el el peptidoglicano (B). La falta de pared celular desemboca en la muerte bacteriana. NAM = Ácido N-acetilmurámico, NAG = Ácido N-acetilglucosamina, PBP = Proteína de unión a penicilina. Modificado de: [Suárez y Gudiol, 2009](#).

Los carbapenémicos comparten el mecanismo de acción de los  $\beta$ -lactámicos, inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana al formar un complejo con las proteínas de unión a penicilina (PBP), tales como las proteínas de elevado peso molecular PBP1a, 1b 2 y 3. La inhibición de PBP2 induce a la formación de esferoplastos sin filamentación preliminar y rápida muerte de la bacteria. La inhibición de PBP3 tiende a generar formas filamentosas. En *E. coli* se ha detectado la afinidad de los carbapenémicos con las variedades de PBP, en PBP1 y 1b, el imipenem se une de dos a cuatro veces más sólidamente que el resto de carbapenémicos, PBP forma enlaces firmes con todos los carbapenémicos, especialmente con doripenem; en PBP3, el carbapenémico con mayor afinidad es meropenem, mientras que PBP5 y 6 presentan buena afinidad para todos los carbapenémicos. Además, doripenem y meropenem tienen mayor afinidad por PBP2 y 3 en *Pseudomonas aeruginosa* que el imipenem<sup>65</sup>.

### 2.5. Resistencia bacteriana

A medida que se fueron desarrollando los antibióticos, quedó constancia de la resistencia bacteriana a los mismos, que hasta ese momento, había pasado desapercibida. La resistencia bacteriana a los antibióticos es un producto evolutivo, desarrollado por las bacterias durante millones de años, para hacer frente a los antibióticos desarrollados por otras especies. En las últimas décadas, y en gran medida, debido al abuso de los antibióticos, el crecimiento de la resistencia bacteriana se ha convertido en un grave problema para la salud a nivel mundial.

### 2.5.1. Origen de la resistencia

Existe un evidente paralelismo entre la incorporación de los antibióticos al tratamiento de infecciones bacterianas y la identificación de bacterias resistentes a estos fármacos. A medida que la industria farmacéutica fue modificando la estructura química de los antibióticos y buscando nuevas moléculas para evitar la resistencia bacteriana, los microorganismos fueron desarrollando nuevos mecanismos de resistencia. Se ha detectado un patrón norte-sur en lo que respecta a la prevalencia de resistencia a antibióticos para la mayoría de microorganismos analizados, presentándose mayor tasa en los países mediterráneos y menor en los nórdicos, cosa que, a su vez, concuerda con los datos del consumo de antibióticos por región<sup>66</sup>.

La resistencia a antibióticos en bacterias aparece cuando son suministradas dosis no letales que promueven la selección de cepas resistentes, ya sea que obtengan esta resistencia por mutaciones o por transferencia horizontal de material genético. Los principales focos de origen y dispersión de genes responsables de resistencia son ambientes donde convergen una alta densidad de microorganismos, genes de resistencia y presión selectiva. La reserva de genes de resistencia es significativa en el agua residual, suelo fertilizado con abono e incluso en la microbiota humana. Asimismo, se ha encontrado una alta diversidad de genes codificantes con el potencial de funcionar como mecanismos de resistencia, lo que se denomina resistoma, en sitios como suelo no perturbado o cuevas de millones de años de antigüedad, mientras que los microorganismos que pertenecen a estos ambientes presentan baja resistencia<sup>67</sup>.

Se identifican dos tipos de resistencia: resistencia intrínseca y resistencia adquirida. La resistencia intrínseca es un carácter constante en cepas de una misma especie bacteriana y es un mecanismo permanente, determinado por la genética de la especie y sin correlación con la dosis de antibiótico. La resistencia adquirida sucede cuando una especie bacteriana es susceptible por naturaleza a un antibiótico, pero que debido a cambios en su genoma, ya sea por mutaciones o por adquisición de genes de resistencia, adquiere resistencia a antibióticos. Este último tipo de resistencia es de origen evolutivo y su frecuencia depende de la utilización de los antibióticos<sup>5</sup>.

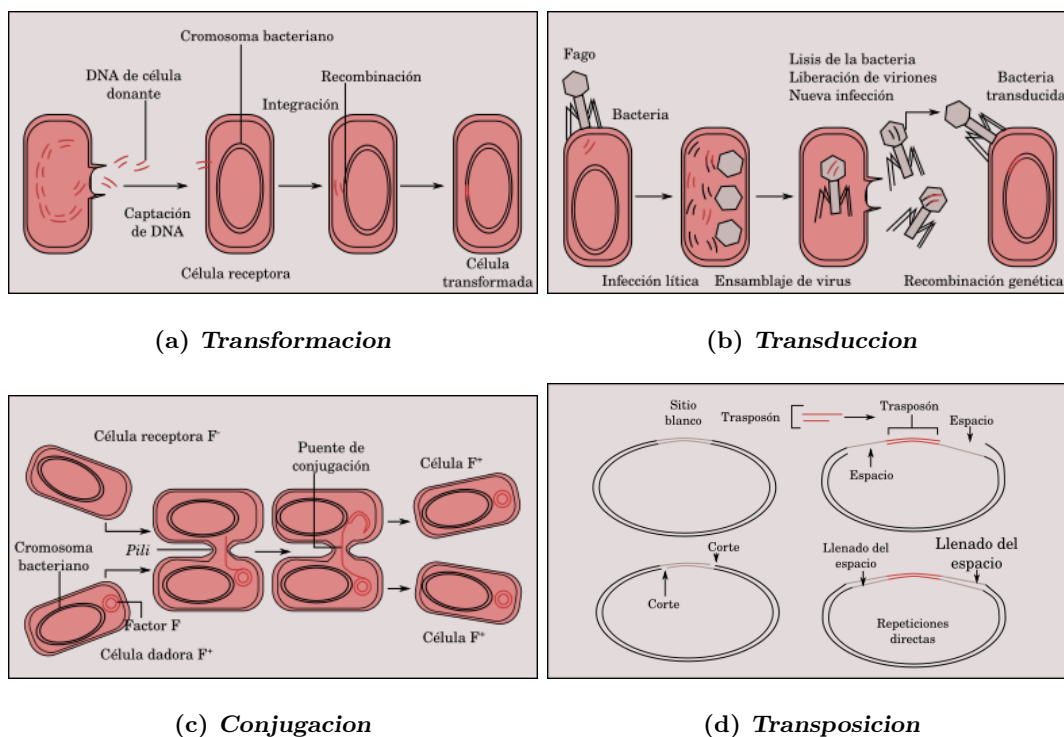
### 2.5.2. Propagación de la resistencia

Las mutaciones y el intercambio horizontal de genes son propiedades universales de las bacterias que han ocurrido durante millones de años como parte de la evolución. La frecuencia de mutaciones que dan origen a resistencia a antibióticos varía dependiendo del antibiótico y la bacteria. Este fenómeno ocurre con mayor frecuencia en bacterias con deficiencias en el sistema de reparación del DNA<sup>68</sup>.

El intercambio de genes de resistencia se da a través de los mecanismos intrínsecos de reproducción sexual: las bacterias que son la transformación, la transducción y la conjugación, asimismo la transposición también funge como una fuente importante de variabilidad genética en las bacterias (Figura 2.9). La transformación es la incorporación por una bacteria del DNA extracelular libre procedente de la lisis de otras bacterias. La transducción es la transferencia de DNA cromosómico o plasmídico de una bacteria a otra mediante un bacteriófago. La transposición es el movimiento de una sección de DNA, denominada trasposón, que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos. Y la conjugación consiste en el intercambio de material genético entre dos bacterias a través de un *pili* sexual<sup>69</sup>.

El primer paso para la transferencia de la resistencia es la adquisición de estos genes a partir del resistoma mediante los mecanismos descritos previamente, a bacterias comensales y patógenas. Estas bacterias patógenas, tienen más posibilidades de transmitir los genes, al tener una mayor exposición a antibióticos. Esto, aunado a la repetición de los mecanismos de

## 2. MARCO TEÓRICO



**Figura 2.9:** Transferencia lateral de genes en bacterias. Modificado de: Calderón-Rojas y Aguilar-Ulate, 2016.

transferencia lateral, favorecen la diseminación de genes de resistencia entre bacterias, debido a que los organismos resistentes son evolutivamente más competitivos en los ambientes donde existe una elevada presión selectiva debido al uso excesivo de antibióticos<sup>68</sup>.

### 2.5.3. Mecanismos de resistencia

Para que un antibiótico pueda ejercer su mecanismo de acción, es necesario su ingreso a la célula bacteriana y que se mantenga intacto hasta llegar a su sitio blanco para ejercer su función, ya sea bacteriostático o bactericida. La resistencia bacteriana actúa en el mismo nivel, disminuyendo o evitando la presencia del antibiótico en su interior al modificar su permeabilidad, alterando sus mecanismos de transporte activo de la membrana celular o generando mecanismos de eliminación activa del antibiótico<sup>70</sup>.

De tal manera que los mecanismos de resistencia evitan que el antibiótico ejerza su mecanismo de acción, esto puede darse mediante la modificación del sitio blanco del antibiótico, entre las que se destacan la alteración de PBP en *Streptococcus pneumoniae* y la adquisición de genes que codifican para sustitutos de los blancos originales en especies de *Staphylococcus* meticilinoresistentes. Las alteraciones en la permeabilidad evitan el paso del antibiótico, y las más comunes son las alteraciones en la membrana de las gram negativas, que no permiten el paso de sustancias hidrofílicas más que por porinas; las alteraciones en la entrada de antibióticos

dependiente de energía y el aumento de la salida de antibióticos mediante bombas de eflujo. Las biopelículas producidas por las bacterias, además de protegerlas contra la luz ultravioleta, la deshidratación, los mecanismos de defensa del hospedero y otras amenazas ambientales, también pueden conferir resistencia a la acción de los antibióticos. Y finalmente, la inactivación enzimática, que ocurre principalmente mediante hidrólisis, pero también puede darse por acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones<sup>69,71</sup>.

### 2.5.3.1. $\beta$ -lactamasas

En bacterias gram negativas, el mecanismo de resistencia más extendido es la resistencia por inactivación enzimática, más específicamente, por la producción de  $\beta$ -lactamasas.

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas capaces de romper el anillo  $\beta$ -lactámico y, de esta manera, inactivar a este tipo de antibióticos. Estas enzimas son ubicuas en las bacterias gram negativas y los genes que las codifican pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, lo que permite su transferencia a otras bacterias. Existen diversos tipos de  $\beta$ -lactamasas, entre las que destacan las AmpC, capaces de hidrolizar cefalosporinas de espectro reducido de tercera generación, aztreonam e inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas. Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que han sido reportadas de manera frecuente en especies de *Klebsiella* y *Escherichia*, los microorganismos con estas enzimas son resistentes a las oximino-cefalosporinas, el aztreonam, las penicilinas y las cefalosporinas de espectro reducido, siendo incapaces de hidrolizar cefamandolam y carbapenémicos. Y finalmente las carbapenemasas, un grupo de  $\beta$ -lactamasas sobre el que se abundará en el siguiente apartado<sup>72</sup>.

## 2.6. Carbapenemasas

Las carbapenemasas son un tipo específico de  $\beta$ -lactamasas con elevada eficiencia catalítica para la hidrólisis de los antibióticos carbapenémicos, aunque también son capaces de hidrolizar a la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos. La identificación de aislados bacterianos con este tipo de enzimas ha ido en aumento, lo que también acrecienta la amenaza que significan estos organismos para la salud humana.

### 2.6.1. Generalidades de las carbapenemasas

Las primeras carbapenemasas fueron identificadas desde la introducción del imipenem en 1980, en los microorganismos *Bacillus cereus*, *Bacteroides fragilis* y *Stenotrophomonas maltophilia*. En el caso de *Enterobacteriaceae*, las primeras carbapenemasas identificadas fueron SME-1, en *Serratia marcescens* e IMI-1, en los años 1982 y 1984, respectivamente. Y durante la primera década del siglo XXI, se produjo una diseminación rápida y extensa de *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC en el noroeste de los Estados Unidos, mientras que surgieron las variantes KPC-2 y KPC-3 en Nueva York<sup>73</sup>.

Las carbapenemasas representan a la familia más versátil de  $\beta$ -lactamasas, ya que son capaces de hidrolizar tanto a carbapenémicos, como a otros  $\beta$ -lactámicos. Adicionalmente, cuentan con la ventaja de ser resistentes a la acción de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Los genes que codifican a las carbapenemasas pueden estar presentes, tanto en el cromosoma como en plásmidos, siendo su principal dispersión por transferencia horizontal. Las especies portadoras de

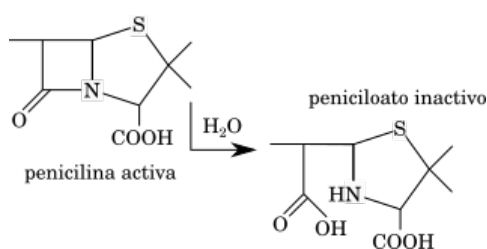


## 2. MARCO TEÓRICO

---

carbapenemasas, a menudo contienen también otros genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, por lo que presentan fenotipos complejos de resistencia a estos antibióticos<sup>9,57</sup>.

Se ha propuesto que las  $\beta$ -lactamasas, grupo al que pertenecen las carbapenemasas, originalmente cumplían alguna función en la síntesis de la pared celular bacteriana. Las carbapenemasas actúan hidrolizando el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico, rompiendo de esta manera el anillo e inactivando la molécula del carbapenémico, antes de que éste llegue a su sitio de acción (Figura 2.10)<sup>74</sup>.



**Figura 2.10:** Hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico. Las carbapenemasas hidrolizan el enlace amida del anillo, lo que resulta en una inactivación del carbapenémico. Modificado de: [Paciel et al., 2011](#).

### 2.6.2. Clases de carbapenemasas

Las carbapenemasas están ubicadas en las clases A B y D de Ambler. Las de las clases A y D son serin- $\beta$ -lactamasas y las de la clase B son metalo- $\beta$ -lactamasas. En general, las carbapenemasas de la clase A pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico o por ácido fenilborónico, las de clase B no hidrolizan a los monobactámicos como el aztreonam y son inhibidas por agentes quelantes del zinc como el EDTA y el ácido dipicolínico. Entre las carbapenemasas de clase D se encuentran las oxacilinasas (OXA) que son inhibidas parcialmente por el ác. clavulánico y no afectan a los monobactámicos, producen una alta resistencia a temociclina y presentan baja eficiencia hidrolítica frente a cefalosporinas de tercera y cuarta generación y también frente a los carbapenémicos, siendo en ocasiones identificadas como susceptibles a los mismos. Las carbapenemasas más importantes de la clase A y B son las tipo VIM, NDM y KPC, mientras que en la clase D, son las de tipo OXA<sup>9</sup>.

#### 2.6.2.1. VIM

Las enzimas tipo VIM son metalo- $\beta$ -lactamasas pertenecientes a la clase B de Ambler y tienen efecto hidrolítico en penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y carbapenémicos, siendo inhibidas por EDTA y ác. clavulánico. VIM es denominada por sus siglas en inglés *Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamases*, fue descrita por primera vez en 1999 en Verona, Italia. Se considera a Grecia como el epicentro de dispersión de Enterobacterias productoras de VIM<sup>75</sup>.

### 2.6.2.2. NDM

Las enzimas tipo NDM también pertenecen a la clase B de Ambler, por tanto son metalo- $\beta$ -lactamasas inhibidas por EDTA y ác. dipicolínico, su mayor espectro de actividad es en penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y carbapenémicos. Se ha reportado que NDM no hidroliza monobactámicos, sin embargo, la mayoría de las cepas productoras de NDM también expresan enzimas capaces de hidrolizar a los mismos. Sus siglas, NDM, vienen de *New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase*, ya que inicialmente fue reportada en un hospital de Nueva Delhi, India, en el año 2009, presente un aislado de *Klebsiella pneumoniae*<sup>76</sup>.

### 2.6.2.3. KPC

Las enzimas tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) pertenecen a la clase A de Ambler, son serin- $\beta$ -lactamasas cuyos principales sustratos son las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y carbapenémicos. Son inhibidas por el clavunato, el tazobactam, el sulbactam y el ácido borónico. El primer reporte de KPC se realizó en Carolina del Norte en 1996, en un aislado de *Klebsiella pneumoniae*, esta enzima se ha diseminado a otros miembros de *Enterobacteriaceae* e incluso se ha determinado la presencia de KPC en bacilos gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Flavobacterium odoratum*.<sup>38</sup>

### 2.6.2.4. OXA

Las oxacilinasas o enzimas tipo OXA son serin- $\beta$ -lactamasas que pertenecen a la clase D de Ambler, son capaces de hidrolizar penicilinas, inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, y en menor grado, carbapenémicos, siendo los microorganismos con fenotipo OXA, en ocasiones reportados como susceptibles a este último antibiótico. En 2003, fueron identificados aislados de *Klebsiella pneumoniae* productores de OXA-48, desde entonces se han encontrado a lo largo del mundo, pero su mayor prevalencia es en Europa y en países ubicados al sur y al este del mar Mediterráneo<sup>77</sup>.

## 2.6.3. Carbapenemasas en microorganismos de interés

Las carbapenemasas se han extendido a una gran cantidad de microorganismos de interés hospitalario. En la Tabla 2.3 se muestran las carbapenemasas que han sido identificadas en *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Las enzimas de la clase A, están representadas por las KPC, estas enzimas se han identificado en *K. pneumoniae* y *E. coli*. Las enzimas de la clase B, son metalobetalactamasas, la mayoría ha sido hallada principalmente en *Pseudomonas aeruginosa*, siendo predominantes las tipo VIM e IMP; estas enzimas también están presentes en las otras tres especies. Por último, las enzimas de la clase D son las oxacilinasas, en *K. pneumoniae* se han identificado OXA-48 y OXA-181, en *E. coli* se ha identificado solo OXA-48, mientras que en *A. baumannii* no se han reportado estas dos enzimas, pero sí se han encontrado otras oxacilinasas entre las que destacan OXA-51 y OXA-59<sup>38,46,51,78-82</sup>.

**Tabla 2.3:** Carbapenemasas presentes en microorganismos de interés hospitalario <sup>38,46,51,78-82</sup>

Especie	Clase de Ambler	Enzima
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Clase A	KPC
	Clase B	NDM-1, IMP VIM
	Clase D	OXA-48, OXA-181
<i>Escherichia coli</i>	Clase A	KPC-2
	Clase B	VIM, NDM IMP
	Clase D	OXA-48
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clase B	IMP, VIM NDM-1, SIM GIM, AIM DIM, KHM SPM
	Clase D	IMP-1, IMP-2 IMP-4, IMP-5 VIM-1, VIM-2 OXA-23, OXA-24 OXA-25, OXA-26 OXA-27, OXA-40 OXA-49, OXA 51 OXA-58, OXA 69

KPC = *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, NDM = New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase, IMP = Imipenemase, VIM = Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase, SIM = Seoul imipenemase, GIM = German imipenemase, AIM = Australia imipenemase, DIM = Dutch imipenemase, KHM = (Kyorin Health Science metalo- $\beta$ -lactamase, SPM = São Paulo metallo- $\beta$ -lactamase, OXA = oxacillinase.

## 2.7. Pruebas de detección de carbapenemasas

Con el fin de llevar a cabo la vigilancia epidemiológica en los centros sanitarios e identificar a los microorganismos con fenotipo de resistencia bacteriana, se han desarrollado diversas pruebas de detección de resistencia a antibióticos, que pueden ser tanto fenotípicas, como moleculares. Algunas pruebas fenotípicas son las pruebas de difusión en agar y las pruebas colorimétricas. Las moleculares pueden ser de hibridación de DNA, de secuenciación y más generalmente, PCR. Es importante considerar que ninguna prueba otorga la respuesta absoluta sobre los mecanismos de resistencia que se desarrollan en estos microorganismos, pues varios factores pueden estar interviniendo en este proceso, por lo que la combinación de distintas metodologías es necesaria para obtener una interpretación más acertada de los mecanismos acontecidos durante la resistencia bacteriana.

### 2.7.1. Pruebas de difusión en agar

Las pruebas de difusión están basadas en el método de Kirby-Bauer y son de las técnicas más antiguas para estudiar la susceptibilidad de los microorganismos a los antibióticos, siendo aún muy extendido su uso en los laboratorios, debido a que resultan adecuadas para la mayoría de los microorganismos patógenos y no requieren de material adicional para su aplicación. La difusión en agar, a grandes rasgos, consiste en la inoculación de una cantidad estandarizada de un microorganismo sobre una placa de agar Müller-Hinton y la colocación del disco de antibiótico que se desea probar<sup>83,84</sup>.

#### 2.7.1.1. Prueba de 12 Discos

La prueba de doce discos es un antibiograma que consiste en la difusión de doce discos de antibiótico en una placa de agar Mueller-Hinton de 16 cm de diámetro por 5-6 mm de profundidad. Los discos de antibióticos utilizados son Aztreonam, Ceftazidima, Ceftazidima/Clavulanato, Cefotaxima, Cefotaxima/Clavulanato, Cefoxitina, Cefotetan, Ceftriaxona, Cefepima, Ertapenem, Imipenem y Meropenem. La susceptibilidad puede entonces ser evaluada de acuerdo con la presencia o ausencia de crecimiento alrededor del disco, lo que se conoce como halo de inhibición. La interpretación de esta prueba se realiza mediante la medición de los halos de inhibición, y esto está detallado en el Apéndice A<sup>85</sup>.

### 2.7.2. Pruebas colorimétricas

Las pruebas de detección colorimétricas pueden detectar la actividad de enzimas responsables de resistencia a antibiótico mediante un cambio de color dado por un indicador. Algunas pruebas colorimétricas son la rezasurina, que reduce la actividad metabólica del microorganismo y cuya forma oxidada es distinguible fotométricamente de su forma reducida, por lo que puede ser evaluada mediante espectrofotometría, colorimetría o fluorimetría, sin embargo, la rezasurina no es metabolizada por bacilos gram negativos no fermentadores. Otra prueba consiste en la incubación de la bacteria en presencia de iones  $\text{NO}_3^-$  y antibiótico, si ocurre la hidrólisis del antibiótico se generan iones  $\text{NO}_2^-$ , cambio que puede ser evaluado con los reactivos de Gries<sup>86</sup>. Y finalmente la prueba Carba NP, de la cual se hablará a continuación.

### 2.7.2.1. Carba NP

La prueba Carba NP es un ensayo rápido, desarrollada con el propósito de detectar carbapenemasas en *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Con esta prueba es posible detectar la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico del carbapenémico mediante el cambio de pH y la coloración dada por el indicador rojo de fenol. Sus ventajas son la rápida detección de carbapenemasas a partir de aislados bacterianos, en un intervalo que va desde los 30 minutos a las 2 horas, además de su buena especificidad para la detección de carbapenemasas. Su desventaja es que presenta baja sensibilidad para la detección de enzimas tipo OXA<sup>9,77</sup>.

**Tabla 2.4:** Interpretación de la prueba Carba NP<sup>77</sup>

Tubo A	Tubo B	Interpretación
Rojo o rojo-anaranjado	rojo o rojo-anaranjado	Negativo
Rojo o rojo-anaranjado	naranja claro o amarillo	Positivo
Rojo o rojo-anaranjado	naranja	Inválido
Naranja o amarillo	cualquier color	Inválido

### 2.7.3. Pruebas moleculares

Las técnicas moleculares permiten la detección de material genético, ya sea en su forma de DNA o de RNA. Algunas técnicas moleculares pueden ser la secuenciación y la hibridación de DNA, pero una de las más extendidas en el diagnóstico es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Para llevar a cabo una PCR convencional se necesitan alrededor de 12 horas. El proceso consta de tres etapas, la primera de ellas es la extracción del material genético. La segunda etapa es la amplificación del DNA, en la cual se utiliza un termociclador, que permite alcanzar las temperaturas óptimas para el proceso de amplificación. La amplificación es básicamente reproducir *in vitro* el proceso de replicación que ocurre dentro de la célula, y consiste en desnaturalización del DNA, la unión de los cebadores y la acción de la DNA polimerasa. Y la tercera etapa es la detección de los amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa<sup>86</sup>.

#### 2.7.3.1. Carba R

Con el fin de reducir el tiempo de la PCR convencional se ha diseñado la PCR en tiempo real, donde la amplificación y la detección ocurren de manera simultánea. Por otra parte, el material genético del núcleo en la PCR no siempre corresponde con el que se está expresando en la célula, por lo que, una variante de la PCR hace uso de la retrotranscriptasa para medir la cantidad de RNA mensajero en la célula, esta es, la RT-PCR. En la actualidad, estas técnicas moleculares se han comercializado y automatizado en forma de kits, lo que facilita en gran medida su uso en los laboratorios de microbiología, aunque con el inconveniente de ser de plataforma cerrada, por lo que se puede evaluar un número muy limitado de genes<sup>86</sup>.

Uno de estos kits es el ensayo Xpert® Carba-R. De acuerdo al inserto del kit<sup>87</sup>, este ensayo en una prueba diagnóstica cualitativa basada en la PCR en tiempo real, y es capaz de detectar los genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* y *bla<sub>IMP</sub>* asociados con la resistencia enzimática a carbapenémicos. Las muestras que pueden ser utilizadas para la prueba son hisopados de muestra rectal y aislados puros de *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*.

## 2.8. Justificación

Las IAAS son una importante causa de mortalidad en hospitales, afectando con frecuencia a grupos vulnerables, es decir menores de cinco años y adultos mayores, además de tener una carga más grave en países en vías de desarrollo. Este tipo de infecciones está continuamente vinculado con la resistencia a antibióticos, llegándose a identificar como principales agentes etiológicos a las especies *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, entre otras. Aunque la resistencia bacteriana puede producirse por múltiples mecanismos, uno de los más importantes y diseminados es la producción de enzimas.

La principal medida para el control de las IAAS es la vigilancia epidemiológica, para llevarla a cabo es necesario un correcto diagnóstico y entendimiento de las causas de la misma. La combinación conjunta de pruebas fenotípicas y moleculares proporciona un diagnóstico más acertado y completo de estas posibles causas. La prueba de difusión en Agar proporciona un antibiograma sencillo y fácil de interpretar, para la identificación de resistencia a los antibióticos más comunes; Carba NP es una prueba rápida para la detección de carbapenemasas, además de contar con una sensibilidad y especificidad altas; los ensayos moleculares como Carba R son de carácter confirmatorio, pues se puede detectar el gen productor de la carbapenemasa, pero realizarlos implica un gran costo económico, por lo que su uso es limitado.



## Hipótesis y Objetivos

---

### 3.1. Hipótesis

Si bien, la aplicación conjunta de diversas metodologías es indispensable para un completo entendimiento de la resistencia bacteriana, Carba NP es la prueba crucial en este trabajo, pues proporciona un diagnóstico rápido sobre la presencia de carbapenemasas, lo que agiliza la toma de decisiones con respecto a la gestión de los riesgos que representan los microorganismos evaluados.

En trabajos anteriores se ha realizado la detección de carbapenemasas por Carba NP y su confirmación mediante pruebas moleculares, obteniéndose sensibilidades en promedio cercanas al 80 %. [Pasteran et al.<sup>88</sup>](#), reportaron una sensibilidad del 84 %; [Sun et al.<sup>89</sup>](#) del 66 %, sin embargo, la baja sensibilidad de esta prueba se debe a la inclusión de numerosos aislados productores de enzimas tipo OXA que, como se sabe, son difícilmente detectados por Carba NP; [Campana et al.<sup>90</sup>](#) reportaron una sensibilidad del 73 %, obteniendo falsos negativos en la detección de enzimas tipo OXA-23; [Rudresh et al.<sup>91</sup>](#) indicaron que la sensibilidad obtenida en la prueba fue del 95 %.

De acuerdo con las metodologías utilizadas en este trabajo para la detección y caracterización de carbapenemasas, se espera comprobar que el 80 % de los microorganismos identificados como positivo por Carba NP sea detectado por la metodología de Carba R como productor de al menos una carbapenemasa.



#### 3.2. Objetivos

##### GENERAL:

Detectar y caracterizar las diferentes carbapenemasas en enterobacterias y bacilos gram negativos no fermentadores, responsables de causar infecciones asociadas a la atención en salud en tres hospitales del ISSSTE, en un periodo comprendido entre los años 2012 a 2017.

##### PARTICULARES:

- Analizar las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* caracterizadas como Potencial Productor de Carbapenemasas, por métodos fenotípicos y genotípicos.
- Analizar las cepas de *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* previamente identificadas como resistentes a carbapenémicos, por métodos fenotípicos y genotípicos.
- Evaluar la frecuencia de la resistencia a carbapenémicos mediada por producción de carbapenemasas.

---

## Capítulo 4

# Metodología

---

Para este trabajo se realizó un tipo de estudio descriptivo transversal. Se utilizaron aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, recuperados de tres hospitales del ISSSTE.

Las cepas proporcionadas por los hospitales se encontraban en tubos con Agar soya-tripticaseína, los cuales fueron reactivados y sembrados por estría cruzada en placas de Agar Mac-Conkey y agar sangre. Una vez recopilados datos sobre su morfología y corroborar la pureza de los cultivos, se realizó una prueba automatizada con el equipo BD Phoenix 100™, estos microorganismos fueron guardados en el cepario del Laboratorio Central de Vigilancia Epidemiológica y Sanitaria del ISSSTE.

Las cepas aptas para el estudio fueron seleccionadas de acuerdo con los siguientes criterios:

### **Criterios de inclusión**

- Cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* que presentaron el fenotipo “Productor Potencial de Carbapenemasas” (PPC), con base en la identificación automatizada realizada por el equipo BD Phoenix 100™.
- Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, previamente identificadas como Resistentes a Carbapenémicos con base en la identificación automatizada realizada por el equipo BD Phoenix 100™.

### Criterios de exclusión

- Cepas que no pertenezcan a las especies mencionadas en los criterios de inclusión.
- Cepas que no presentan el fenotipo PPC o que no hayan sido previamente identificadas como Resistentes a Carbapenémicos con base en la identificación automatizada realizada por el equipo BD Phoenix 100™.

Donde «Productor Potencial de Carbapenemasas» se define como toda enterobacteria, evaluada en este estudio, que presenta resistencia a al menos un carbapenémico (Imipenem, Meropenem y Ertapenem).

Y se define como «Resistente a Carbapenémicos» a toda *P. aeruginosa* o *A. baumannii* resistente a por lo menos un carbapenémico (Imipenem y Meropenem).

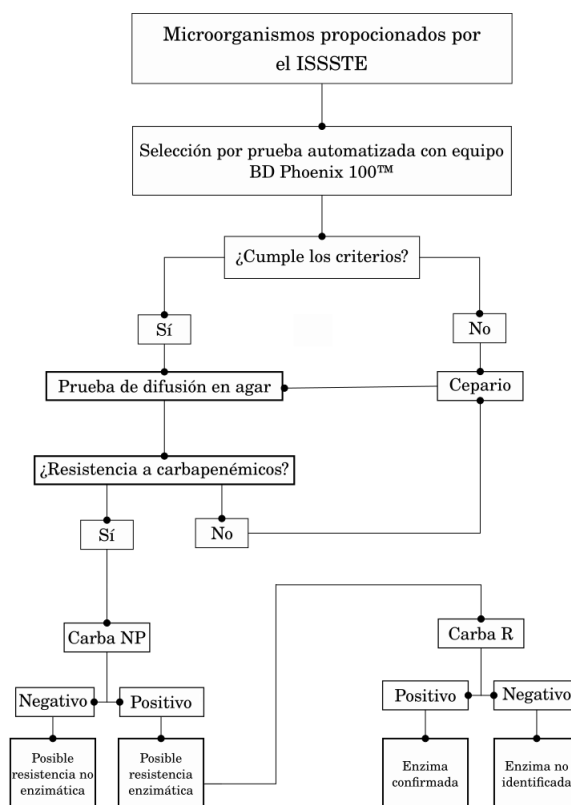
El método de obtención de cepas para este estudio se realizó mediante la reactivación de microorganismos a partir del cepario, estos fueron sembrados en placas de agar sangre.

Posterior a la selección de las cepas, se realizó la prueba de difusión en agar, como método confirmatorio, utilizándose 12 Discos en el caso de Enterobacterias; en cuanto a no fermentadores, se evaluaron tres discos para *P. aeruginosa* (Imipenem, Meropenem y Aztreonam) y dos para *A. baumannii* (Imipenem y Meropenem).

Después se aplicaron, tanto la prueba colorimétrica Carba NP, como la molecular Carba R a los microorganismos que presentaron resistencia a por lo menos dos antibióticos.

En conjunto, con estas pruebas fue posible inferir la presencia de carbapenemasas como agentes responsables de la resistencia a antibióticos detectada en ciertas bacterias. En la Figura 4.1 se muestra un diagrama con el algoritmo general seguido durante este trabajo.

Los controles de calidad utilizados durante las pruebas fueron las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, como control negativo, siendo una cepa susceptible a los



**Figura 4.1:** Algoritmo general del método utilizado en este trabajo. Las pruebas de difusión aplicadas a los microorganismos fueron: 12 Discos para Enterobacterias, 3 Discos para *P. aeruginosa* y 2 Discos para *A. baumannii* Todas las cepas de interés epidemiológico para el laboratorio fueron conservadas en el Cepario del Laboratorio Central de Vigilancia Epidemiológica y Sanitaria del ISSSTE.

antibióticos; *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 como control de calidad positivo para la producción de carbapenemasas, pues presenta el gen *bla<sub>KPC</sub>*; y *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1706, como control negativo para el gen *bla<sub>KPC</sub>* pero que cuenta con enzima tipo AmpC junto con cierre porinas.

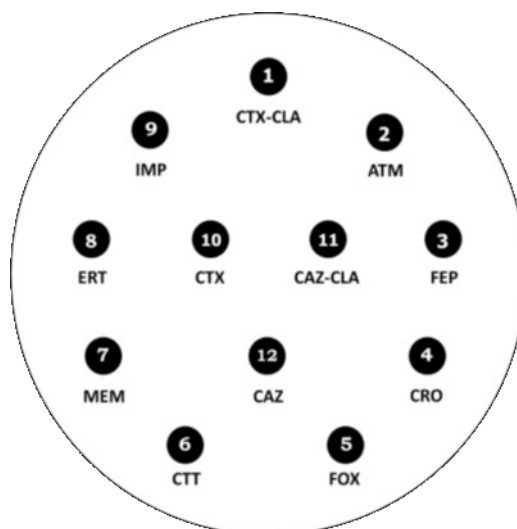
### 4.1. Prueba de 12 Discos

#### 4.1.1. Material y reactivos

- Nefelómetro
- Tubos ID Broth 4.5 mL
- Hisopos de algodón
- Placas de Agar Mueller-Hinton 150 mm
- Discos de antibióticos (Figura 4.2)
- Dispensador de 12 discos
- Incubadora
- Vernier analítico

#### 4.1.2. Procedimiento

La Prueba de 12 Discos fue realizada conforme el procedimiento descrito por Schreckenberger y Rekasius<sup>85</sup>. Esta prueba consiste en tomar el aislado bacteriano y ajustarlo al 0.5 de MacFarland en un tubo BD Phoenix® ID Broth de 4.5 mL. Posteriormente, tomar dicha suspensión con un hisopo estéril y sembrar en una placa de agar Mueller-Hinton 150 mm. Colocar en la placa 12 discos de antibióticos con ayuda de un dispensador de 12 cartuchos, como indica la Figura 4.2. Por último, incubar durante 24 h a  $35\pm 2$  °C. Los halos de inhibición deben ser medidos con un Vernier analítico. En enterobacterias se evaluaron los 12 antibióticos, siendo los de mayor interés para este trabajo los carbapenémicos (Imipenem, Ertapenem y Meropenem), y se aprovecharon los resultados de los demás discos como información de interés epidemiológico en otros trabajos. En el



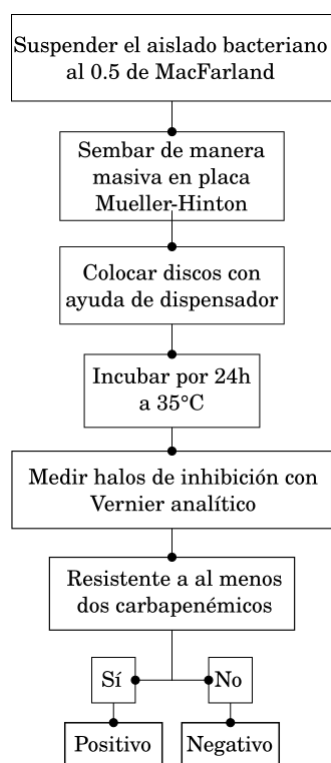
**Figura 4.2:** Esquema con la ubicación de los 12 discos de antibióticos. En el sentido de las agujas del reloj CTX=Cefotaxima, CLA=Ác. Clavulánico, ATM=Aztreonam, FEP=Cefepime, CRO=Ceftriaxona, FOX=Cefoxitina, CTT=Cefotetan, MEM=Meropenem, ERT=Ertapenem, IMP=Imipenem, CAZ=Ceftazidima.

caso de *P. aeruginosa*, se midieron Imipenem, Meropenem y Aztreonam; en *A. baumannii*, sólo se midieron Imipenem y Meropenem. El algoritmo de la prueba se detalla en la Figura 4.3.

## 4.2. Carba NP

### 4.2.1. Material y reactivos

- Criotubos
- Proteínasa K con solución amortiguadora TRIS HCl
- Homogeneizador
- Solución  $\text{ZnSO}_4$  (1.4 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 500 mL de agua destilada)
- Solución de rojo de fenol 0.5% (1.25 g rojo de fenol polvo en 250 mL de agua destilada)



**Figura 4.3:** Algoritmo para la prueba de 12 Discos en agar.

- Solución de NaOH 0.1N (20 mL NaOH 1N en 180 mL de agua destilada)
- HCl 10% v/v.
- Solución A Carba NP (Tabla 4.1)
- Solución B Carba NP (Tabla 4.2)
- Incubadora

#### 4.2.2. Procedimiento

El procedimiento de Carba NP fue realizado siguiendo los lineamientos establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>92</sup>. Esta prueba consiste en etiquetar dos tubos como “A” y “B”, respectivamente por cada muestra, en cada tubo deben ir incluidos, 100  $\mu$ L de proteinasa K con solución amortiguadora TRIS HCl, y una asada del aislado de interés. Esta mezcla se debe homogenizar durante 10 segundos. Posteriormente, agregar al tubo A 100  $\mu$ L de la solución A

cuyos reactivos están descritos en la Tabla 4.1. Y agregar al tubo B 100  $\mu\text{L}$  de la solución B cuyos reactivos están descritos en la Tabla 4.2. Ambos tubos deben ser homogenizados durante 10 segundos. Finalmente incubar las muestras a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 2 h y realizar la lectura (Figura 4.4).

**Tabla 4.1:** Reactivos necesarios para preparar la solución A de Carba NP

Cantidad	Reactivo
16.6 mL	Agua destilada
2 mL	Rojo de fenol
180 $\mu\text{L}$	Solución $\text{ZnSO}_4$
Ajustar pH 7.8	

**Tabla 4.2:** Reactivos necesarios para preparar la solución B de Carba NP

Cantidad	Reactivo
10 mL	Solución A
60 m g	Imipenem polvo

## 4.3. Carba R

### 4.3.1. Material y reactivos

- Tubo ID Broth
- Nefelómetro
- Hisopos de algodón
- Vórtex
- Micropipeta 10  $\mu\text{L}$
- Equipo GeneXpert
- Kit Xpert® Carba-R

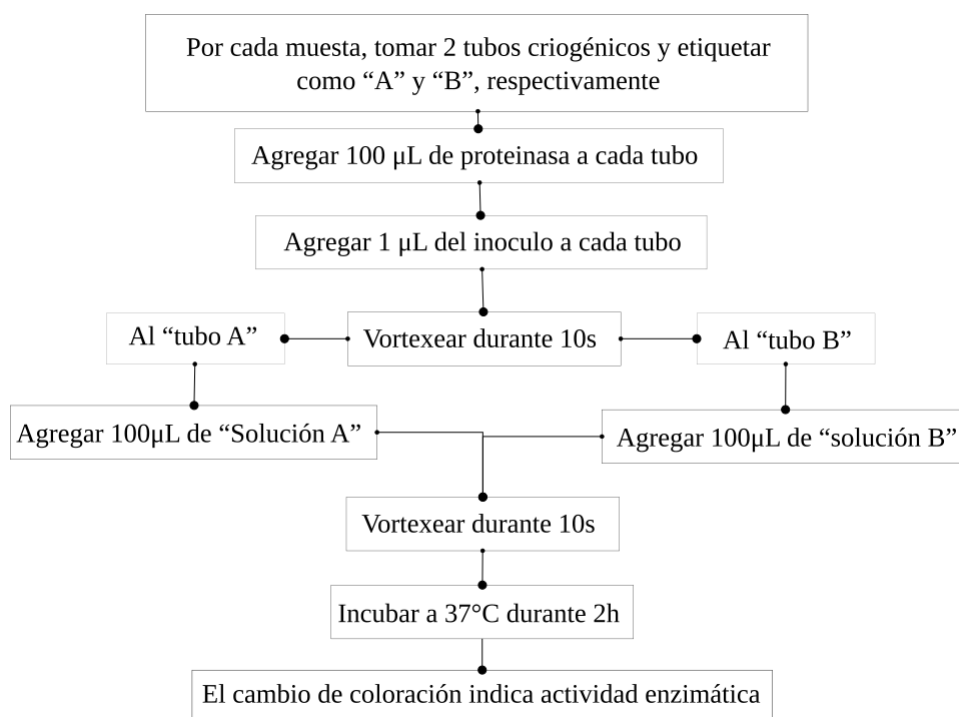
### 4.3.2. Procedimiento

Este procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en el inserto del kit Xpert® Carba-R<sup>87</sup>. Para esta prueba se preparó una suspensión del aislado al 0.5 de MacFarland, esta muestra se vortexeó durante 10 segundos. De la muestra se tomaron 10  $\mu\text{L}$  y se agregaron al vial de reactivos que viene con el Kit, esta mezcla se homegenizó. 1.7 mL del vial fueron transferidos al cartucho del ensayo



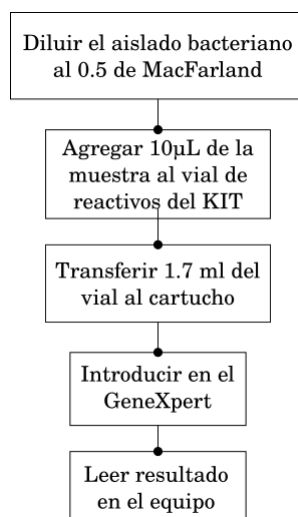
#### 4. METODOLOGÍA

---



**Figura 4.4:** Algoritmo para la prueba de Carba NP. La interpretación de resultados se detalla en la Tabla 2.4 del apartado 2.7.2.1

e introducidos en el equipo GeneXpert. Los resultados se obtuvieron 48 minutos después de que se realizó el procedimiento. El algoritmo para la realización de la prueba está descrito en la Figura 4.5



**Figura 4.5:** Algoritmo para la prueba de Carba R.



## Resultados y discusión

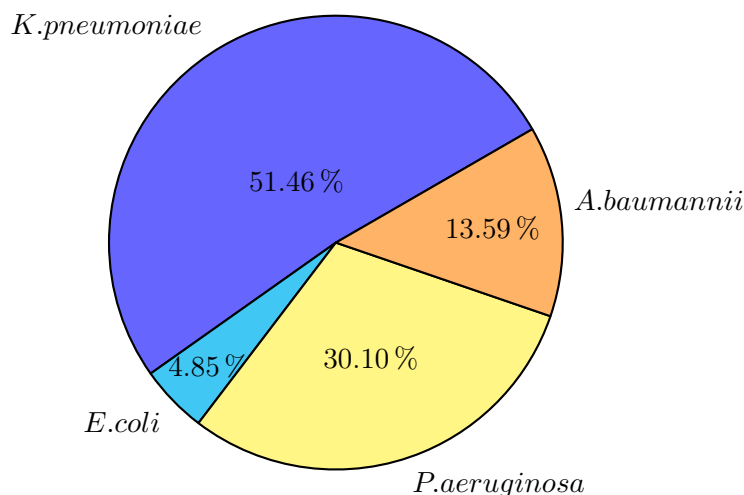
---

### 5.1. Resultados

En este trabajo se analizó un total de 103 cepas (Figura 5.1) que, de acuerdo con los resultados de la identificación automatizada, presentaron los perfiles de resistencia especificados en los criterios de inclusión de la sección 4. De este total de aislados, la resistencia a carbapenémicos ocurrió de la siguiente manera: 53 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, representaron la mayor parte de los microorganismos estudiados con resistencia y fueron también el grupo con mayor número de aislados; 31 *Pseudomonas aeruginosa* fueron el segundo grupo con mecanismos de resistencia a carbapenémicos; mientras que sólo se encontraron 14 *Acinetobacter baumannii*, siendo este un grupo especialmente reducido de microorganismos recuperados de los hospitales; y finalmente 5 *Escherichia coli* resistentes a carbapenémicos, que no presentaron resistencia enzimática.

Es de destacar el caso de *K. pneumoniae* que, como se detallará en la sección, presentó una alta resistencia por producción de carbapenemasas. En tanto a *E. coli*, a pesar de ser también microorganismos recuperados de manera abundante de los hospitales, la identificación automatizada arrojó perfiles de resistencia tipo BLEE, cuya resistencia no se extiende a los carbapenémicos, razón por la cual la mayor parte de aislados fue descartada del trabajo.

En la Figura 5.2 se detalla el número de aislamientos recuperados por año. Por

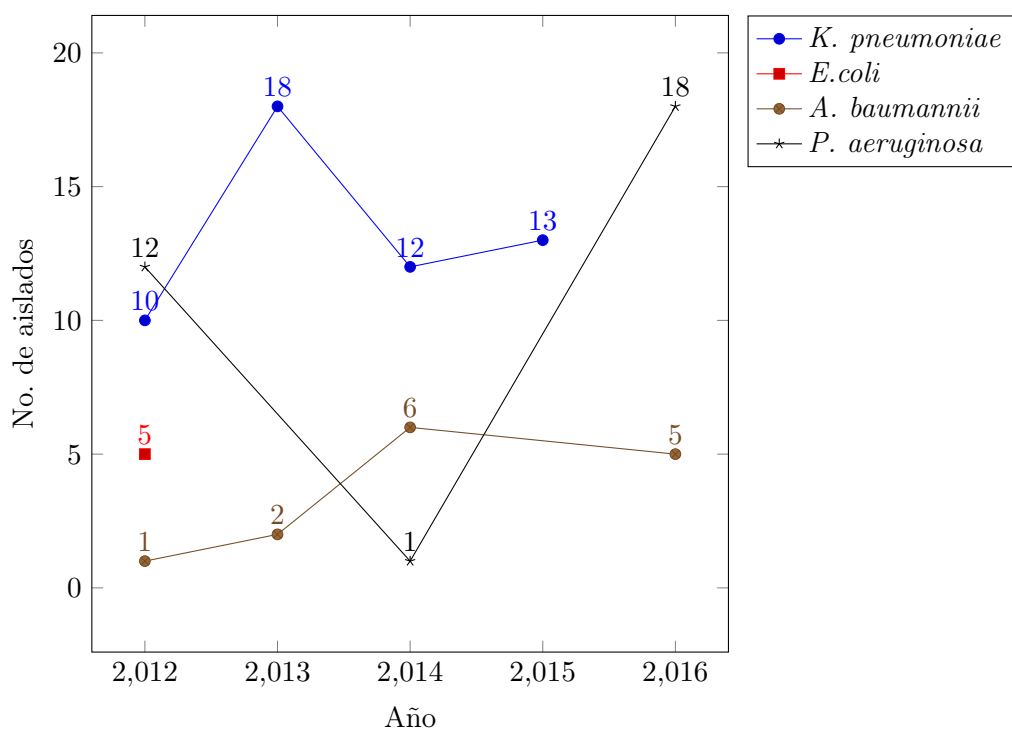


**Figura 5.1:** Microorganismos incluidos en este estudio. 53 cepas de *K. pneumoniae* (51.46 %), 5 de *E. coli* (4.85 %), 31 de *P. aeruginosa* (30.10 %) y 14 de *A. baumannii* (13.59 %).

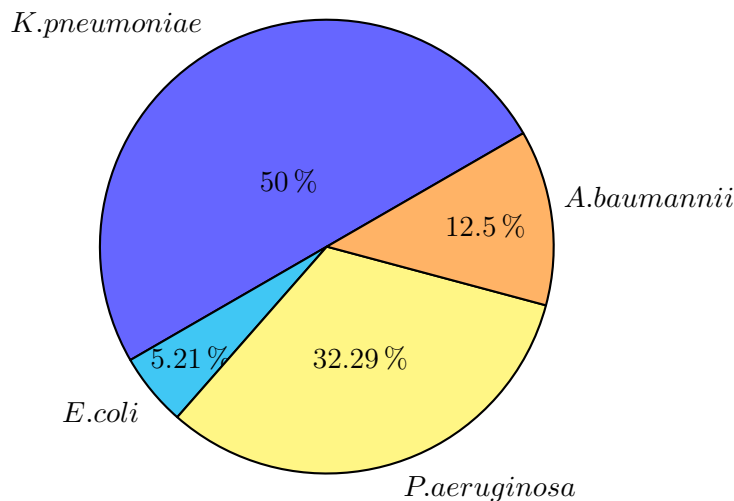
razones de insumos y del tiempo contemplado para la culminación de este trabajo, no se recuperaron cepas del año 2017. *E. coli* sólo fue recuperada durante el año 2012, puesto que los demás aislados no cumplieron los criterios de inclusión; *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* se recuperaron de manera más consistente durante el periodo, faltando aislados de *Klebsiella* en el año de 2016 y de *Pseudomonas* en el 2015; *A. baumannii* se recuperó en 2012, 2014 y 2016.

### 5.1.1. Prueba de difusión en agar

Los resultados de la prueba de difusión en agar fueron semejantes a los de identificación automatizada (Véase Apéndice B), encontrándose un 50 % de resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae*, un 32.29 % en *P. aeruginosa*, un 12.5 % en *A. baumannii* y un 5.21 % en *E. coli*; conservándose el número de aislamientos en *E. coli* y *P. aeruginosa*, pero disminuyendo en 5 para *K. pneumoniae* y en 2 para *A. baumannii*, es decir que se mantuvieron el 90 % y el 86 %, respectivamente. Los resultados de esta prueba se muestran en la Figura 5.3.



**Figura 5.2:** Número de microorganismos de acuerdo al año de aislamiento. Los puntos en los que se presentan datos corresponden con los años en que se obtuvieron aislados que cumplieran los Criterios de inclusión. En el caso de *E. coli*, sólo se cuenta con datos del 2012, mientras que *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* destacan por presentar gran número de cepas recuperadas.



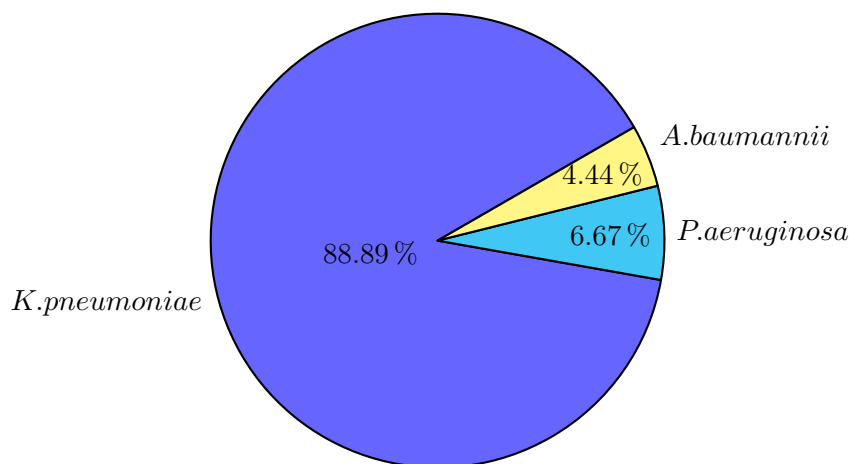
**Figura 5.3:** Resultados para la prueba de difusión en agar. 48 cepas de *K. pneumoniae* (50 %), 5 de *E. coli* (5.21 %), 31 de *P. aeruginosa* (32.29 %) y 12 de *A. baumannii* (12.5 %).

### 5.1.2. Carba NP

La prueba de Carba NP (Figura 5.4) dio el resultado de 40 aislados de *Klebsiella pneumoniae* (88.9 %) con posible resistencia enzimática, 3 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* (6.67 %), 2 de *Acinetobacter baumannii* (4.44 %) y ninguno de *Escherichia coli*. Los resultados de *K. pneumoniae* fueron relativamente cercanos a la prueba de 12 Discos (Figura 5.6), encontrándose un 80 % de aislados positivos a Carba NP, con respecto a los de 12 Discos. Las discrepancias son posiblemente explicadas con una resistencia por mecanismos distintos a la producción de enzimas, aunque no en su totalidad, como se verá en el siguiente apartado. En el caso de los demás microorganismos, se encontró una enorme discrepancia entre Carba NP y difusión en agar, lo cual se tratará en la Discusión de los resultados.

### 5.1.3. Carba R

Finalmente, en la prueba de Carba R (Figura 5.5), se encontró una elevada incidencia de genes *bla<sub>KPC</sub>* (43 aislados) por parte de *K. pneumoniae*. Encontrán-



**Figura 5.4:** Resultados para Carba NP. 40 cepas de *K. pneumoniae* (50%), 3 de *P. aeruginosa* (6.67%) y 2 de *A. baumannii* (4.44%). No fue detectada posible resistencia enzimática en *E. coli*

dose sólo un gen  $bla_{NDM}$  en esta especie. La cantidad de aislados en los cuales fue identificada resistencia enzimática confirmada fue mayor a los que se identificaron por Carba NP (44 en Carba R, contra 40 en Carba NP).

En *P. aeruginosa*, solo el 33 % de los aislados identificados presentaron resistencia enzimática, en este caso un gen  $bla_{VIM}$ , porcentaje que difiere del 80 % propuesto por la hipótesis. Cabe mencionar que hubo un caso particular en esta especie en que el gen productor de carbapenemasas no pudo ser identificado por el equipo (Resultado indeterminado), aun realizándose repeticiones de la prueba, esto puede deberse a la presencia de inhibidores de la PCR en el aislamiento. En cuanto a *A. baumannii* y *E. coli*, ninguno se identificó como productor de algún tipo de enzima por esta prueba.

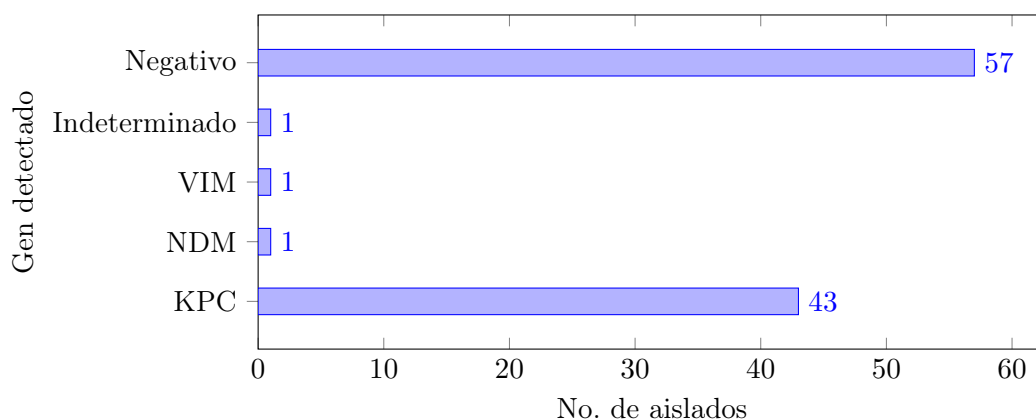
#### 5.1.4. Resultados globales

En la Figura 5.6 puede observarse una comparación entre los resultados obtenidos para las diferentes pruebas. Se observa que la mayor parte de las cepas de



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



**Figura 5.5:** Resultados para Carba R. En *K. pneumoniae* fueron detectados los genes  $bla_{KPC}$  y  $bla_{NDM}$ , mientras que *P. aeruginosa*, se detectó el gen  $bla_{VIM}$  y no fue posible determinar uno de los genes.

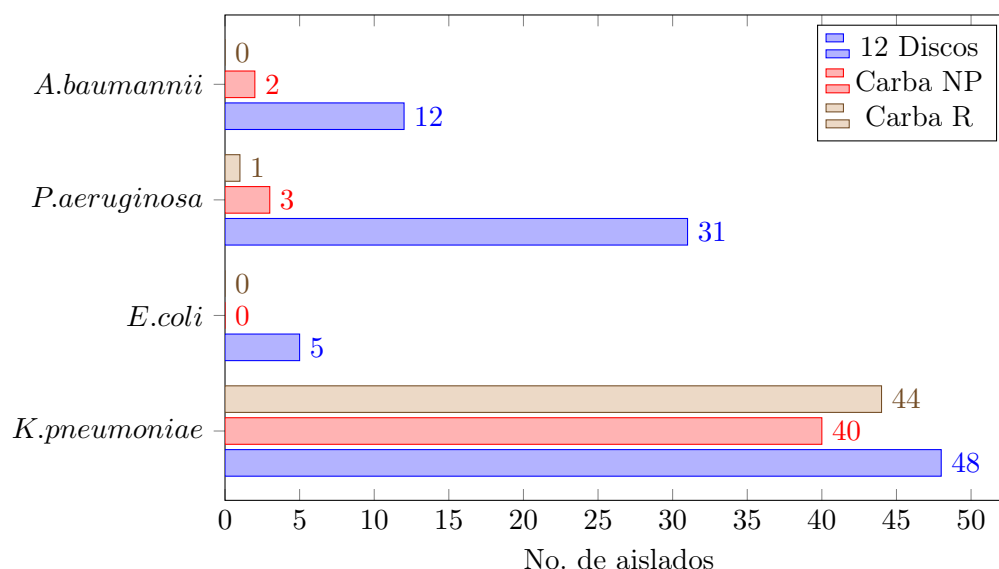
*K. pneumoniae* estudiadas presentaron una resistencia a carbapenémicos mediada por enzimas, mientras que este tipo de resistencia disminuyó para el resto de microorganismos. Las cepas de *E. coli* no presentaron resistencia a carbapenémicos confirmada y la prueba de Carba R descartó a los pocos aislamientos de *A. baumannii* como productores de enzimas. Tan solo se identificó una carbapenemasa tipo VIM en *Pseudomonas aeruginosa*. Carba NP descartó la producción de enzimas en *E. coli*, y sugiere resistencia enzimática a carbapenémicos en algunos aislados de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

La tabla 5.1 muestra los porcentajes de productores de carbapenemasas confirmados en este trabajo, según los años en que estos fueron aislados. Se puede observar que el promedio de productores de enzimas de *K. pneumoniae* con respecto a su resistencia a carbapenémicos fue del 81.01 %, encontrándose el porcentaje más bajo durante 2014 (75 %) y el más elevado durante 2013 (88.89 %). En *P. aeruginosa*, el único aislado productor de carbapenemasa correspondió con el resistente a carbapenémicos del año 2014, pero, al ser el único de la muestra, representó solo el 0.03 % de los aislamientos totales.

**Tabla 5.1:** Microorganismos resistentes a carbapenémicos y porcentaje de productores de carbapenemasas identificados.

Microorganismo	Año	Resistente a carbapenémicos	Productor de carbapenemasa
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2012	10	8 (80 %)
	2013	18	16 (88.89 %)
	2014	12	9 (75 %)
	2015	13	11 (84.62 %)
	Total	53	44 (81.01 %)
<i>Escherichia coli</i>	2012	5	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2012	1	0
	2013	2	0
	2014	6	0
	2016	5	0
	Total	14	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2012	12	0
	2014	1	1 (100 %)
	2016	18	0
	Total	31	1 (0.03) %

Los porcentajes mostrados son de acuerdo con el año en que fue aislado el microorganismo. Es evidente que *K. pneumoniae* es el microorganismo en el que se encontró mayor porcentaje de resistencia enzimática, siendo que en el 81 % de aislados de esta especie que cumplieron con los criterios se pudo determinar el gen productor de enzima. La única otra especie en que se detectó un gen de resistencia fue *P. aeruginosa*, con un solo caso, que representa el 0.03 % dentro de su especie.



**Figura 5.6:** Comparativa de los resultados positivos para las tres pruebas. *K. pneumoniae* destaca por presentar gran número de microorganismos recuperados y resultados positivos a lo largo de todas las pruebas; en el caso *P. aeruginosa*, a pesar de obtenerse bastantes aislados, las pruebas posteriores descartaron la resistencia enzimática.

## 5.2. Discusión

El número total de organismos utilizados (Figura 5.1) para la realización de este trabajo coloca a *K. pneumoniae* como el microorganismo con mayor porcentaje de aislamientos (51.46%), seguido por *P. aeruginosa* (30.10%), *A. baumannii* (13.59%) y *E. coli* (4.85%). Si se comparan estos resultados con la Tabla 2.1 del apartado 2.2.3, puede observarse que las frecuencias de aislamientos relacionadas con IAAS no corresponden con las de resistencia a carbapenémicos, siendo que para el principal agente etiológico de IAAS (*E. coli*), se recuperaron muy pocas cepas resistentes a estos antibióticos, de las cuales no fue detectado ningún gen, existiendo la posibilidad de que la resistencia se deba a la  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido AmpC y a mecanismos no enzimáticos, como la pérdida de la proteína OMP<sup>93</sup>. El tercer agente etiológico de IAAS, *K. pneumoniae* resultó el

microorganismo con mayor resistencia a carbapenémicos y con mayor número de resistencia enzimática, esta información coincide con lo reportado por diversos autores<sup>94-97</sup> quienes indican que este es el microorganismo que más destaca en *Enterobacteriaceae* por sus resistencia enzimática a carbapenémicos, siendo este fenómeno menos frecuente en el resto de las especies de esta familia.

El porcentaje de microorganismos totales positivos a Carba R con respecto a Carba NP, fue del 91 %, lo cual se encuentra por encima del 80 % propuesto en la hipótesis. En todos los aislamientos de *K. pneumoniae* positivos para Carba NP se detectó un gen productor de carbapenemasa. Sin embargo, sólo el 33 % en *P. aeruginosa* fue detectado por Carba R y ninguna *A. baumannii* fue detectada como positiva por Carba R.

De los genes de resistencia enzimática identificados en la Figura 5.5, se encontraron *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>* en *K. pneumoniae*, así como *bla<sub>VIM</sub>* en *P. aeruginosa*, al contrastar estos resultados con la Tabla 2.3 del apartado 2.6.3 se encontró que los genes detectados corresponden con los reportados en la literatura, teniéndose un resultado satisfactorio para *K. pneumoniae* y con la posibilidad de la no identificación de algunos genes de resistencia para *P. aeruginosa*, al considerar que la prueba sólo es capaz detectar los genes *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>* reportados para esta especie. En *A. baumannii* la nula detección de este tipo de genes puede explicarse por la misma limitación del equipo mencionada antes, añadiendo la ausencia de librerías para los genes *bla<sub>OXA</sub>* de esta especie (Véase el apartado 2.7.3.1). De acuerdo con los resultados, se encontró que Carba R presentó mayor detección para *Klebsiella pneumoniae* que para bacilos gram negativos no fermentadores.

Durante los diferentes años en que fueron recuperados los microorganismos resistentes (Figura 5.2 y Tabla 5.2) se observó que la resistencia en *K. pneumoniae* alcanzó su porcentaje máximo en 2013 (88.9 %) y mínimo en 2014 (75 %), aunque es probable que este hecho esté relacionado con el número de aislados

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

de cada año (18 en 2013 y 12 en 2014). En *P. aeruginosa* se encontró un solo microorganismo resistente que coincidió con la única cepa de ese año, y además el único de los aislados de esa especie; esto puede deberse a que la caracterización de los microorganismos de ese año se encuentra incompleta, aunque también se puede tratar de que ese caso de *P. aeruginosa* portadora del gen *bla<sub>VIM</sub>* esté relacionado al turismo<sup>98</sup>, ya que se ha reportado que la frecuencia de este gen es mayor en Europa, siendo raros los casos en América<sup>98-100</sup>. Para *A. baumannii* el bajo número de aislados para los años 2012 y 2013 (Figura 5.2) podría coincidir con la baja recuperación de este microorganismo que se observó conforme pasa más tiempo en conservación.

Al comparar los resultados de las pruebas (Figura 5.6) para *Klebsiella pneumoniae* se encontró una variación entre los resultados obtenidos por las tres metodologías. La discrepancia entre la prueba de difusión en agar (12 Discos, Figura 5.3) con la colorimétrica (Carba NP, Figura 5.4) y la molecular (Carba R, Figura 5.5), se puede explicar con el hecho de que la primera sirve para detectar resistencia a carbapenémicos, sin considerar que ésta sea enzimática o no, mientras que Carba NP está especializada en detectar la resistencia mediada por carbapenemasas y Carba R en detectar los genes responsables de la producción de este tipo de enzimas; por lo que otros mecanismos diferentes a la resistencia enzimática podrían estar presentes en *Klebsiella*, aunque es algo muy poco común para la especie. Sin embargo, la discrepancia entre Carba NP y Carba R es más interesante; los 4 microorganismos productores de carbapenemasas no detectados por Carba NP contaron con el gen *bla<sub>KPC</sub>* (Véase Apéndice B), la no detección podría explicarse al considerar esos microorganismos como portadores del gen que, sin embargo no lo expresan.

La gran cantidad de factores de patogenicidad en *K. pneumoniae*<sup>31,35</sup>, la variedad de infecciones que provoca<sup>35,37</sup>, en combinación con el número de aislamientos resistentes a carbapenémicos detectados en este estudio hacen evidente la nece-

sidad de reforzar las medidas y la vigilancia de esta especie, en especial en los hospitales en que fue identificado.

En *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Escherichia coli*, prácticamente no se encontró resistencia enzimática confirmada, más que en un caso en *Pseudomonas aeruginosa* con un gen *bla<sub>VIM</sub>*. De acuerdo con Meletis et al.<sup>101</sup>, *P. aeruginosa* posee resistencia intrínseca a los  $\beta$ -lactámicos, por ejemplo por bombas de eflujo, el cual es un tipo de mecanismo no enzimático. La principal bomba de eflujo en *Pseudomonas* es MexAB-OprM, capaz de expulsar  $\beta$ -lactámicos, entre los que se encuentran los carbapenémicos<sup>45,46</sup>. Además, se ha observado que el desarrollo de la resistencia a carbapenémicos en esta especie está a menudo asociado a la existencia de más de un mecanismo de resistencia<sup>102</sup>.

En tanto a *A. baumannii*, se encontró una detección muy baja de aislados con posible resistencia enzimática, lo cuál corresponde con las bajas sensibilidades para esta prueba, reportadas en la literatura. Pasteran et al.<sup>88</sup> y Sun et al.<sup>89</sup> mencionan que una modificación en el protocolo de Carba NP podría mejorar la detección de productores de carbapenemasas. Esta modificación consiste en la sustitución de la solución amortiguadora comercial para la extracción de proteínas por el uso de TritonX-100 al 0.1 % (vol/vol), lo que según el autor, permitiría la realización de la prueba a partir de colonias directas, disminuiría los elevados costos de la prueba y mejoraría la detección de resistencia enzimática relacionada a genes *bla<sub>OXA</sub>*. Esto, porque se ha observado que el reactivo comercial de extracción de proteínas interfiere con el cambio de pH, lo que da lugar a discrepancias al realizar esta prueba.

Por otra parte, Poirel y Nordmann<sup>81</sup>, mencionan que el principal mecanismo de resistencia de *A. baumannii* es la producción de carbapenemasas tipo OXA-51 y OXA-69. Estas enzimas no se encuentran registradas en la base de datos del equipo GeneXpert con el que se realizó la prueba de CarbaR, y al ser de plataforma cerrada, no es posible determinarlas por este método.



## Conclusiones

---

El porcentaje de microorganismos totales detectados por Carba R con respecto a Carba NP fue del 91 %, por lo que se confirma la hipótesis. En todos los aislamientos de *K. pneumoniae* positivos para Carba NP se detectó un gen productor de carbapenemasa. Sin embargo, se encontró un bajo número de genes en *P. aeruginosa* y ninguno en *A. baumannii*.

A partir de la interpretación de los resultados obtenidos por las diferentes pruebas, se encontró que la especie *Klebsiella pneumoniae* presentó un elevado grado de resistencia mediada por enzimas; siendo la enzima por excelencia, la carbapenemasa tipo KPC. Esto, aunado a los variados factores de patogenicidad de este microorganismo, supone un grave riesgo para la salud, sobre todo en los hospitales en que fue aislada.

Dados los resultados obtenidos para la detección de enzimas y el bajo número genes asociados a carbapenemasas encontrados en *Pseudomonas aeruginosa*, a pesar de la resistencia a antibióticos presente en esta especie; una explicación posible, de acuerdo con lo reportado, es la predominancia de mecanismos no enzimáticos que confieran dicha resistencia. Muy poca literatura está disponible al respecto de este tema, por lo que se sugiere la realización de estudios de esta índole, sobre todo teniendo en cuenta que se trata de un microorganismo de interés hospitalario y se necesita conocer a fondo los mecanismos que provocan la resistencia para poder elaborar una estrategia para estos casos.



## 6. CONCLUSIONES

---

Salvo algunas discrepancia encontradas, la prueba Carba NP es una alternativa confiable para la detección rápida de carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae*. Carba NP resulta una prueba muy efectiva en la microbiología clínica, para la vigilancia de la resistencia de estos microorganismos.

En cuanto a la detección de enzimas en *Acinetobacter baumannii*, se necesita un estudio donde se lleven a cabo las modificaciones propuestas tanto para la prueba Carba NP, como la elaboración de una RT-PCR en la que se incluyan oligos para detectar una gama más amplia de enzimas tipo OXA, como las enzimas OXA-51 y OXA-69, para poder determinar la producción de carbapenemasas en aislados de esta especie.

---

Apéndice A

# Halos de inhibición para prueba de difusión en Agar

---

## A.1. *Enterobacteriaceae*

Antibiótico	Disco	S	I	R
Imipenem	30 µg	≥ 23	20–22	≤ 19
Meropenem	10 µg	≥ 23	20–22	≤ 19
Ertapenem	10 µg	≥ 22	19–21	≤ 18
Aztreonam	10 µg	≥ 21	18–20	≤ 17

**Tabla A.1:** Halos de inhibición para los discos evaluados en *Enterobacteriaceae*. Modificado de Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>92</sup>.

### A.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiótico	Disco	S	I	R
Imipenem	30 µg	≥ 19	16–18	≤ 15
Meropenem	10 µg	≥ 19	16–18	≤ 15
Aztreonam	10 µg	≥ 22	16–21	≤ 15

**Tabla A.2:** Halos de inhibición para los discos evaluados en *Pseudomonas aeruginosa*. Modificado de Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>92</sup>.

### A.3. *Acinetobacter baumannii*

Antibiótico	Disco	S	I	R
Imipenem	30 µg	≥ 22	19–21	≤ 18
Meropenem	10 µg	≥ 18	15–17	≤ 14

**Tabla A.3:** Halos de inhibición para los discos evaluados en *Acinetobacter baumannii*. Modificado de Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>92</sup>.

---

## Apéndice B

# Tabla de resultados

---

**Tabla B.1:** Resultados generales para las pruebas de detección de carbapenemasas.

No.	Año	Microorganismos	Phoenix	12 Discos				Carba NP	Carba R
				I	M	E	A		
1	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
2	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
3	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
4	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
5	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	S	S	R	R	NEGATIVO	NEGATIVO
6	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
7	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	NEGATIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
8	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	NEGATIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
9	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	I	I	R	R	NEGATIVO	NEGATIVO
10	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
11	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BLEE	S	S	S	R	NEGATIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
12	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
13	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
14	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
15	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
16	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>

RC=Resistente a Carbapenémicos, BLEE= $\beta$ -lactamasa de Espectro Extendido, I=Imipenem, M=Meropenem, E=Ertapenem, A=Aztreonam, R=Resistente, I=Intermedio.

*Continúa en la página siguiente*

## B. TABLA DE RESULTADOS

Tabla B.1 – *Continúa de la página anterior*

No.	Año	Microorganismos	Phoenix	12 Discos	Carba NP	Carba R
				I   M   E   A		
17	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R   R   R   R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
18	2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R   R   R   R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
19	2014	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R   R   R   R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
20	2014	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R   R   R   R	NEGATIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
21	2014	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	I   I   R   R	NEGATIVO	NEGATIVO
22	2014	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R   R   R   R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
23	2014	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R   R   R   R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
24	2014	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R   R   R   R	NEGATIVO	NEGATIVO
25	2014	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R   R   R   R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
26	2014	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R   R   R   R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
27	2014	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R   R   R   R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
28	2014	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R   R   R   S	POSITIVO	<i>bla<sub>NDM</sub></i>
29	2014	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R   R   R   R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
30	2014	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	S   I   S   R	NEGATIVO	NEGATIVO
31	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R   R   -   R	NEGATIVO	NEGATIVO
32	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PC	R   R   -   R	NEGATIVO	NEGATIVO
33	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R   R   -   I	NEGATIVO	NEGATIVO
34	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R   R   -   R	NEGATIVO	NEGATIVO
35	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R   R   -   R	NEGATIVO	NEGATIVO
36	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R   R   -   I	NEGATIVO	NEGATIVO
37	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R   R   -   R	NEGATIVO	NEGATIVO
38	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R   R   -   R	NEGATIVO	NEGATIVO
39	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R   R   -   R	NEGATIVO	NEGATIVO
40	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R   R   -   R	POSITIVO	INDETERMINADO
41	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R   R   -   R	NEGATIVO	NEGATIVO
42	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R   R   -   R	NEGATIVO	NEGATIVO
43	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R   R   -   I	NEGATIVO	NEGATIVO
44	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R   R   -   R	NEGATIVO	NEGATIVO

RC=Resistente a Carbapenémicos, BLEE= $\beta$ -lactamasa de Espectro Extendido, I=Imipenem, M=Meropenem, E=Ertapenem, A=Aztreonam, R=Resistente, I=Intermedio.

*Continúa en la página siguiente*

Tabla B.1 – Continúa de la página anterior

No.	Año	Microorganismos	Phoenix	12 Discos				Carba NP	Carba R
				I	M	E	A		
45	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	R	NEGATIVO	NEGATIVO
46	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	R	NEGATIVO	NEGATIVO
47	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	R	NEGATIVO	NEGATIVO
48	2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	I	NEGATIVO	NEGATIVO
49	2012	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	R	NEGATIVO	NEGATIVO
50	2012	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	R	NEGATIVO	NEGATIVO
51	2012	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	R	NEGATIVO	NEGATIVO
52	2012	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	R	POSITIVO	NEGATIVO
53	2012	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	R	NEGATIVO	NEGATIVO
54	2012	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	R	NEGATIVO	NEGATIVO
55	2012	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	R	NEGATIVO	NEGATIVO
56	2012	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	R	NEGATIVO	NEGATIVO
57	2012	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	R	NEGATIVO	NEGATIVO
58	2012	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	R	NEGATIVO	NEGATIVO
59	2012	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	R	NEGATIVO	NEGATIVO
60	2012	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	R	NEGATIVO	NEGATIVO
61	2014	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RC	R	R	-	I	POSITIVO	<i>bla<sub>VIM</sub></i>
62	2016	<i>Acinetobacter baumannii</i>	RC	R	R	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
63	2016	<i>Acinetobacter baumannii</i>	RC	R	R	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
64	2012	<i>Acinetobacter baumannii</i>	RC	R	R	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
65	2014	<i>Acinetobacter baumannii</i>	RC	R	R	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
66	2014	<i>Acinetobacter baumannii</i>	RC	R	R	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
67	2014	<i>Acinetobacter baumannii</i>	RC	R	R	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
68	2014	<i>Acinetobacter baumannii</i>	RC	R	R	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
69	2014	<i>Acinetobacter baumannii</i>	RC	R	R	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
70	2014	<i>Acinetobacter baumannii</i>	RC	R	R	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
71	2013	<i>Acinetobacter baumannii</i>	RC	R	R	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
72	2013	<i>Acinetobacter baumannii</i>	RC	R	R	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO

RC=Resistente a Carbapenémicos, BLEE= $\beta$ -lactamasa de Espectro Extendido, I=Imipenem, M=Meropenem, E=Ertapenem, A=Aztreonam, R=Resistente, I=Intermedio.

Continúa en la página siguiente

## B. TABLA DE RESULTADOS

Tabla B.1 – *Continúa de la página anterior*

No.	Año	Microorganismos	Phoenix	12 Discos				Carba NP	Carba R
				I	M	E	A		
73	2013	<i>Acinetobacter baumannii</i>	RC	R	R	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
74	2013	<i>Acinetobacter baumannii</i>	RC	R	R	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
75	2012	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
76	2012	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
77	2012	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
78	2012	<i>Escherichia coli</i>	PPC	R	R	R	R	NEGATIVO	NEGATIVO
79	2012	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
80	2012	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
81	2012	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
82	2012	<i>Escherichia coli</i>	PPC	R	R	R	R	NEGATIVO	NEGATIVO
83	2012	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	NEGATIVO	NEGATIVO
84	2012	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
85	2012	<i>Escherichia coli</i>	PPC	R	R	R	R	NEGATIVO	NEGATIVO
86	2012	<i>Escherichia coli</i>	PPC	R	R	R	R	NEGATIVO	NEGATIVO
87	2012	<i>Escherichia coli</i>	PPC	R	R	R	R	NEGATIVO	NEGATIVO
88	2013	<i>Acinetobacter baumannii</i>	RC	R	R	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
89	2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
90	2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
91	2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
92	2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
93	2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
94	2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
95	2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	I	I	R	R	NEGATIVO	NEGATIVO
96	2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	S	S	I	R	NEGATIVO	NEGATIVO
97	2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
98	2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
99	2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
100	2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R	R	R	R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>

RC=Resistente a Carbapenémicos, BLEE= $\beta$ -lactamasa de Espectro Extendido, I=Imipenem, M=Meropenem, E=Ertapenem, A=Aztreonam, R=Resistente, I=Intermedio.

*Continúa en la página siguiente*

Tabla B.1 – *Continúa de la página anterior*

No.	Año	Microorganismos	Phoenix	12 Discos	Carba NP	Carba R
				I   M   E   A		
101	2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R   R   R   R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
102	2012	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	S   R   S   R	NEGATIVO	NEGATIVO
103	2012	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PPC	R   R   R   R	POSITIVO	<i>bla<sub>KPC</sub></i>

RC= Resistente a Carbapenémicos, BLEE=  $\beta$ -lactamasa de Espectro Extendido, I= Imipenem, M= Meropenem, E= Ertapenem, A= Aztreonam, R= Resistente, I= Intermedio.





---

## Apéndice C

# Cepario del Laboratorio Central de Vigilancia Epidemiológica y Sanitaria del ISSSTE

---

Este es un banco de cepas que contiene una cantidad aproximada de 3500 aislamientos de casos asociados a IAAS en un periodo comprendido entre los años 2012 a 2019. Este cepario está compuesto por microorganismos conservados en ultracongelación en criotubos con medio Luria y 20 % de glicerol a una temperatura de -70 °C, y microorganismos presevados en tubos con Agar Soya Trypticaseína a temperatura ambiente, que es el medio de transporte y conservación en el que son obtenidos de otros hospitales.

Los aislamientos mantenidos a temperatura ambiente, se encuentran, en la actualidad, en transición a tubos de glicerol, para su ultracongelación. En este trabajo se contribuyó con la adición de 103 cepas con posibles resistencias a carbapenémicos, de las cuales se confirmó el gen productor de carbapenemasa de 45.

Todos los datos correspondientes a los microorganismos que componen el cepario se encuentran registrados en bases de datos, tanto en formato físico como en digital.



# Bibliografía

---

- [1] Camou, T., Zunino, P., y Hortal, M. (2017). Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Rev. Méd. Urug*, 33(4):277–284. [5](#)
- [2] Pardo, P., Sati, H., y Galas, L. (2018). Enfoque de una salud en las acciones para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos desde una óptica latinoamericana. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica*, 35(1):103–109. [5](#)
- [3] Calderón, C. y Aguilar, L. (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Rev Méd Costa Rica Centroamerica*, 87(621):757–763. [5](#)
- [4] Loera, V., López, C., Romero, C., Luévanos, M., y Balagurusamy, N. (2016). Mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida a antibióticos en bacterias. *RMT*, 8(2):67–76. [5](#)
- [5] Pérez-Cano, H. y Robles-Contreras, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Rev Méd MD*, 4(3):186–191. [5](#), [27](#)
- [6] Morejón, M. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Rev Cubana Med*, 52(4):272–280. [6](#)
- [7] Walsh, T., Tolleman, M., Poirel, L., y Nordman, P. (2005). Metallo-beta-lactamasas: The quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*, 18:306–325. [6](#)
- [8] Dahiya, S., Singla, P., Chaudary, U., y Singh, B. (2015). Carbapenemasas: A review. *International Journal of Advanced Health Sciences*, 4(2):11–17. [6](#)
- [9] Cercenado, E. (2015). Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio. *Rev Esp Quimioter*, 28(1):8–11. [6](#), [30](#), [34](#)
- [10] Organización Mundial de la Salud (2018). Una atención limpia es una atención más segura: Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria. Disponible en:[http://www.who.int/gpsc/country\\_work/burden\\_hcai/es/](http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/es/). Consultado el 3 de octubre del 2018. [6](#), [15](#)

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [11] Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (2015). *Informe Anual 2015*. Dirección General de Epidemiología, ISSSTE, México. [6](#), [16](#), [17](#)
- [12] Woese, C., Kandler, O., y Wheelis, M. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:4576–4579. [9](#)
- [13] Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. (2002). *Microbiología*. Mc Graw Hill, España, 5ª edición. [9](#)
- [14] Moreno, L., Navarrete, P., y Virgós, L. (1998). *Conceptos básicos de microbiología de las aguas subterráneas*. Insituto Geológico y Mineo de España, España. [9](#)
- [15] Pérez, M. y Mota, M. (2008). *Temas de bacteriología y virología médica*. UAID, Insituto de Higiene, España.
- [16] Osorio, C. (2007). *Mundo microbiano*. Instituto Tecnológico de Sonora, México. [9](#), [11](#)
- [17] Al-Marjani, M. (2015). *Bacterial Genetics*. Al-Mustansiriyah University, Iraq, 3ª edición. [9](#), [12](#), [13](#)
- [18] Rosenthal, K. y Tan, M. (2011). *Microbiology and immunology*. Mc Graw Hill, USA, 3ª edición. [10](#), [11](#)
- [19] Suárez, C. y Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(2):116–128. [10](#), [12](#), [13](#), [22](#), [23](#), [26](#)
- [20] Rojas-Campos, N. (2009). El lipopolisacárido bacteriano: una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas. *RCCM*, 16(3):71–84. [11](#), [12](#)
- [21] Betancor, L., Gadea, P., y Flores, K. (2002). *Genética bacteriana*. Temas de Bacteriología y Virología, Uruguay, 3ª edición. [12](#), [13](#), [14](#)
- [22] Montaña, N., Sandoval, A., Carmago, S., y Sánchez, J. (2010). Los microorganismos. *Elementos*, 77:15–23. [13](#)
- [23] CIBIOGEM (2012). *Biotecnología y bioseguridad en México*. CONACYT, Av. San Borja 938, Col. del Valle, CDMX. [14](#)
- [24] González-Cervantes, R. y Ruiseco-Sánchez, G. (2017). La microbiota del humano. *Ciencia*, 68(2):60–66. [14](#)
- [25] Barrero, L., Rivera, S., y Villalobos, A. (2015). *Infecciones asociadas a dispositivos*. Instituto Nacional de Salud, Colombia. [15](#)

- 
- [26] Galvan, M., Castañeda, L., y Galindo, M. (2017). Infecciones asociadas con la atención de la salud y su resistencia microbiana. *Rev Esp Méd Quir*, 22(1):1–13. 15
- [27] Maimone, S. (2015). Programa de control de infecciones (pci). Campus Virtual, CODEINEP. 15
- [28] Lynch, P., Pittet, D., Borg, M., y Mehtar, S. (2007). Infection control in countries with limited resources. *J Hosp Infect*, 65(2):148–150. 15
- [29] Secretaria de Salud (2016). Programa de prevención y vigilancia de las infecciones asociadas a la atención en salud 2016. Disponible en:[http://www.ssm.gob.mx/portal/page/vig\\_epid/13/PLAN%20DE%20TRABAJO%20RHOVE%202016.pdf](http://www.ssm.gob.mx/portal/page/vig_epid/13/PLAN%20DE%20TRABAJO%20RHOVE%202016.pdf). Consultado el 22 de febrero del 2019. 16
- [30] Secretaria de Salud (2017). Subsistema automatizado de egresos hospitalarios-saeh. Disponible en:[http://www.dgis.salud.gob.mx/contenidos/sinais/s\\_saeh.html](http://www.dgis.salud.gob.mx/contenidos/sinais/s_saeh.html). Consultado el 22 de febrero del 2019. 16
- [31] Rodríguez-Salgado, M. (2018). Frecuencia de infecciones asociadas a la atención de la salud en los principales sistemas de información de México. Disponible en:[http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin17/frecuencia\\_infecciones.pdf](http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin17/frecuencia_infecciones.pdf). Consultado el 22 de febrero del 2019. 16, 58
- [32] Gutiérrez, J., Ramírez, A., Martínez, M., Coria, J., Armenta, L., Ayala, J., Bernal, S., Zaleta, F. F., García, F., Monjardín, J., Martínez, G., Gutiérrez, V., y Suárez, J. (2017). Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Rev Latin Infect Pediatr*, 30(2):68–75. 16
- [33] Velázquez, C., Cornejo, P., y Volkow, P. (2018). Cepas e-escape multidrogorresistentes aisladas en hemocultivos de pacientes con cáncer. *Salud pública de México*, 60(2):151–157. 16
- [34] England, P. H. (2018). English surveillance programme for antimicrobial utilisation and resistance (espaur), report 2018. Disponible en:[https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/759975/ESPAUR\\_2018\\_report.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/759975/ESPAUR_2018_report.pdf). Consultado el 11 de abril del 2019. 16
- [35] López, J. y Echeverri, L. (2010). *K. pneumoniae*: ¿la nueva “superbacteria”? patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *IATREIA*, 23(2):157–165. 17, 18, 58
- [36] Puerta, A. y Mateos, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51):3426–3431. 17
- [37] González, A., Nieves, B., Solórzano, M., Cruz, J., Puig, J., y Moreno, M. (2013). Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de b-lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. *Rev Chilena Infectol*, 30(4):374–380. 18, 58

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [38] Vera, A., Barría, C., Carrasco, S., Lima, C., Aguayo, A., Domínguez, M., Bello, H., y González, G. (2017). Kpc: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Rev Chilena Infectol*, 34(5):476–484. 18, 31, 32
- [39] Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *salud pública de méxico*, 44(5):1–9. 18, 19
- [40] elika (2013). *Escherichia coli*. Disponible en:[http://www.elika.net/datos/pdfs\\_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf](http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf). Consultado el 27 de febrero del 2019. 19
- [41] Valenzuela, M. (2012). Boletín laboratorio y vigilancia al día. *Instituto de Salud Pública de Chile*, 10:464–475. 18
- [42] Farfan, A., Ariza, S., Vargas, F., y Vargas, L. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev Chilena Infectol*, 33(4):483–450. 19
- [43] Luján, D. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 48(4):465–474. 19, 20
- [44] Ochoa, S., López, F., Escalona, G., Cruz, A., Dávila, L., López, B., Jiménez, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández, R., y Xixohentatl, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 70(2):138–150.
- [45] Lloria, M. (2009). Infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. Sociedad Argentina de Terapia Intensiva, CicSati2009. 19, 20, 59
- [46] Milagro, M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos*. PhD thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España. 20, 31, 32, 59
- [47] Hernández, A., Yagüe, G., García, E., Simón, M., Parrado, L., Contreras, M., y Gómez, J. (2018). Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. estudio prospectivo 2016-2017. *Rev Esp Quimioter*, 31(2):123–130. 20
- [48] Díaz, V. (2010). *Acinetobacter baumannii*. *Rev Enferm Infecc Pediatr*, 23(92):104–105. 20
- [49] Vanegas, J., Roncancio, G., y Jiménez, J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *CES Med*, 28(22):233–246. 21
- [50] Baretta, R., Pérez, L., G.Castro, Pujol, M., Barletta, J., y Dueñas, Y. (2018). *Acinetobacter baumannii* multiresistente: un reto para la terapéutica actual. *Medisur*, 16(2):323–334. 21

- 
- [51] Diomedi, A. (2005). Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente. consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. *Rev Chil Infect*, 22(4):298–320. 20, 21, 31, 32
- [52] Hernández, A., García, E., Yagüe, G., y Gómez, J. (2010). *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Rev Esp Quimioter*, 23(1):12–19. 21
- [53] Seija, V. y Vignoli, R. (2008). Principales grupos de antibióticos. Disponible en:<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>. Consultado el 28 de febrero del 2019. 22
- [54] Camacho, V. (2007). *Los antimicrobianos en la práctica médica*. Infomed, Cuba. 22
- [55] Gómez, J., García, E., y Hernández, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter*, 28(1):1–9. 22
- [56] Marín, M. y Guidol, F. (2013). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21(1):42–55. 22
- [57] Moreno, K. (2013). Carbapenémicos: Tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *Rev Méd Costa Rica*, 608:599–605. 23, 24, 30
- [58] Fresnadillo, M., García, M., García, E., y García, J. (2010). Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28(12):53–64. 23
- [59] Moreno, T. (1996). Revisión de la utilización de medicamentos: Imipenem/cilastatina en un hospital general básico. *Farm Hosp*, 20(5):302–307. 23
- [60] Alvarez, B., Álvarez, F., Romero, J., Fernández, L., Ruiz, F., y Sancho, H. (2008). Optimización de la dosis de meropenem en infecciones graves. resultados de un estudio multicéntrico observacional. *Rev Esp Quimioter*, 21(3):143–148. 24
- [61] Giner, S. y Cános, M. (1995). Meropenem: Un nuevo carbapenem en el arsenal terapéutico. *Farm Hosp*, 19(2):42–55. 24
- [62] Morales, R. (2003). Ertapenem: Una nueva clase de carbapenem. *Rev Chil Infect*, 20(4):143–148. 25
- [63] Chahine, B. E., Ferrill, M., y Poulakos, M. (2010). Doripenem: A new carbapenem antibiotic. *AJHP*, 67:2015–24. 25
- [64] Herrera, S., García, L., Martínez, D., Rojas, O., y León, R. (2015). Efectos adversos de los antibióticos sobre la mitocondria y su asociación con variantes genéticas del adn mitocondrial en población mexicana. *Rev Mex Cienc Farm*, 46(4):15–24. 25
-



## BIBLIOGRAFÍA

---

- [65] Breilh, D., Texier-Maugein, J., Allaouchiche, B., Saux, M.-C., y Boselli, E. (2013). Carbapenems. *J Chemother (Florence, Italy)*, 25:1–17. [26](#)
- [66] Torres, C. (2012). *La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming*. Academia de Farmacia Reino de Aragón, Zaragoza. [27](#)
- [67] de León, S. P., Arredondo, R., y López, Y. (2015). La resistencia a los antibióticos: Un grave problema global. *Gac Med Mex*, 151:681–689. [27](#)
- [68] Alos, J. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enf Infecc Microbiol Clin*, 33(10):692–699. [27](#), [28](#)
- [69] Calderón-Rojas, G. y Aguilar-Ulate, L. (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Rev Méd Costa Rica Centroamérica*, 73(621):757–763. [27](#), [28](#), [29](#)
- [70] Echeverría, J. (1998). Resistencia bacteriana. *Rev Med Hered*, 9(2):53–55. [28](#)
- [71] Vignoli, R. y Seija, V. (2008). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>. Consultado el 3 de marzo del 2019. [29](#)
- [72] Tafur, J., Torres, J., y Villegas, M. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(3):223–233. [29](#)
- [73] Pena-Villa, I. (2016). *Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología molecular y alternativas terapéuticas*. PhD thesis, Universitat Complutense de Madrid, Madrid, España. [29](#)
- [74] Paciel, D., Seija, V., Prieto, J., Vignoli, R., Medina, J., y Savio, E. (2011). Enterobacterias productoras de kpc. *Tendencias en medicina*, 12:47–54. [30](#)
- [75] Vittecoq, M., Laurens, C., Brazier, L., Durand, P., Elguero, E., Arnal, A., Thomas, F., Aberkane, S., Renaud, N., Prugnotte, F., Solassol, J., Jean-Pierre, H., Godreuil, S., y Renaud, F. (2016). Vim-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* in gulls from southern france. *Ecology and Evolution*, 7:1224–1232. [30](#)
- [76] Correa, C., Castro, E., Salamanca, D., Bustacara, L., y Lemos, E. (2015). *Escherichia coli* productora de nueva delhi metalo- $\beta$ -lactamasa en colombia: reporte de caso. *Infectio*, 21(12):132–134. [31](#)

- 
- [77] Dortet, L., Poirel, L., Yaqoubi, F. A., y Nordmann, P. (2012). Ndm-1, oxa-48 and oxa-181 carbapenemase-producing enterobacteriaceae in sultanate of oman. *Clinical microbiology and infection*, 18:E144–8. [31](#), [34](#)
- [78] Ortega, A., Saez, D., Bautista, V., Fernández-Romero, S., Lara, N., Aracil, B., Pérez-Vázquez, M., Campos, J., y Oteo, J. (2016). Carbapenemase-producing *Escherichia coli* is becoming more prevalent in spain mainly because of the polyclonal dissemination of oxa-48. *J Antimicrob Chemother*, 71:2131–2138. [31](#), [32](#)
- [79] Queenan, A. M. y Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3):440–458.
- [80] Toleman, M. A., Simm, A. M., Murphy, T. A., Gales, A. C., Biedenbach, D. J., Jones, R. N., y Walsh, T. R. (2002). Molecular characterization of spm-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in latin america: report from the sentry antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*, 50:673–679.
- [81] Poirel, L. y Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, 12:303–307. [59](#)
- [82] Jovicic, B., Lepsanovic, Z., Suljagic, V., Rackov, G., Begovic, J., Topisirovic, L., y Kojic, M. (2011). Emergence of ndm-1 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from serbia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(8):3929–31. [31](#), [32](#)
- [83] Bauer, A., Kirby, M., Sherris, J., y Turck, M. (1996). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45:493–496. [33](#)
- [84] European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (2012). Estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos: Método de difusión con discos. Disponible en:<http://coesant-seimc.org/documents/Descripci%C3%B3n%20del%20m%C3%A9todo%20de%20disco.pdf>. Consultado el 5 de marzo del 2019. [33](#)
- [85] Schreckenberger, P. y Rekasius, V. (2012). Detección fenotípica de resistencia por  $\beta$ lactamasas en bacilos gram-negativos. *Loyola University Medical Center*, pages 1–13. [33](#), [42](#)
- [86] March-Roselló, G. (2017). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 35(3):182–188. [33](#), [34](#)
- [87] Xpert® Carba-R (2016). *Xpert® Carba-R1301-2438*. Cepheid Inc, Rev. B July 2016Xpert®Carba-R. [35](#), [45](#)

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [88] Pasteran, F., Tijet, N., Melano, R., y Corso, A. (2017). Simplified protocol for carba np test for enhanced detection of carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(12):305–312. [37](#), [59](#)
- [89] Sun, K., Xiuyu, M., Yan, J., y Zhang, L. (2017). Evaluation of six phenotypic methods for the detection of carbapenemases in gram-negative bacteria with characterized resistance mechanisms. *Anal of laboratory medicine*, 37:60–66. [37](#), [59](#)
- [90] Campana, E. H., Chuster, S. G., da Silva, I. R., Paschoal, R. P., Bonelli, R. R., Moreira, B. M., y Picão, R. C. (2017). Modified carba np test for the detection of carbapenemase production in gram-negative rods: optimized handling of multiple samples. *Braz J Microbiol*, 48(2):1678–4405. [37](#)
- [91] Rudresh, S. M., Ravi, G. S., Sunitha, L., Hajira, S. N., Kalaiarasan, E., y Harish, B. N. (2017). Simple, rapid, and cost-effective modified carba np test for carbapenemase detection among gram-negative bacteria. *J Lab Physicians*, 4(4):303–307. [37](#)
- [92] Clinical and Laboratory Standards Institute (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-seventh Informational Supplement*. CLSI document M100-S28, wayne, PA. [44](#), [63](#), [64](#)
- [93] Ye, Y., Xu, L., Han, Y., Chen, Z., Liu, C., y Ming, L. (2018). Mechanism for carbapenem resistance of clinical enterobacteriaceae isolates. *Exp Ther Med*, 15:1143–49. [56](#)
- [94] Tängden, T. y Giske, C. G. (2015). Extensively drug-resistant carbapenemase-producing enterobacteriaceae: an emerging challenge for clinicians and healthcare systems. *J. Intern. Med.*, 277:501–512. [57](#)
- [95] Tzuovelekis, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T., y Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in klebsiella pneumoniae and other enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Cil Microbiol Rev*, 25(4):682–707.
- [96] Bratu, S., Tolaney, P., Karumudi, U., Quale, J., Mooty, M., Nichani, S., y Landman, D. (2005). Carbapenemase-producing klebsiella pneumoniae in brooklyn, ny: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin b and other agents. *J Antimicrob Chemother*, 56(1):182–32.
- [97] Nordmann, P., Cuzon, G., y Nass, T. (2009). The real threat of klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*, 9(4):228–36. [57](#)
- [98] European Center for Disease Prevention and Control (2019). Outbreak of vim-producing carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosalinked to medical tourism to mexico. Disponible en:[https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/27-02-2019-RRA-Pseudomonas%](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/27-02-2019-RRA-Pseudomonas%20aeruginosa%20in%20mexico.pdf)

- [20aeruginosa%2C%20Carbapenems%2C%20Surgical%20site%20infection-Mexico-final%20for%20web.pdf](#). Consultado el 23 de mayo del 2019. 58
- [99] Codjoe, F. S. y Donkor, E. E. (2017). Carbapenem resistance: A review. *Med Sci*, 6(43):1–5.
- [100] Rizek, C., Fu, L., dos Santos, L. C., Leite, G., Ramos, J., Rossi, F., Guimaraes, T., Levin, A. S., y Costa, S. F. (2014). Characterization of carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 13(1):1–28. 58
- [101] Meletis, G., Exindari, M., Vavatsi, N., Sofianou, D., y Diza, E. (2006). Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*, 16(4):826–836. 59
- [102] El-Amin, N., Giske, C., Jalal, S., Keijsers, B., Kronvall, G., y Wretling, B. (2005). Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin oprd and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *Clin Microbiol Infect*, 113:187–196. 59