



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL MECANISMO DE RESISTENCIA A COLISTINA EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Klebsiella* spp. RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS DEL PLAN UNIVERSITARIO DE CONTROL DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA (PUCRA), UNAM.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

RICARDO BRIAN MILLÁN AGUILAR

TUTOR

Dr. SAMUEL PONCE DE LEÓN ROSALES



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX., 2024



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra

VOCAL: Profesor: Javier Fernández Torres

SECRETARIO: Profesor: Samuel Ponce de León Rosales

1er. SUPLENTE: Profesor: Francisco Javier Díaz García

2° SUPLENTE: Profesor: Luis Esaú López Jácome

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE MICROBIOMA, 4° PISO DE LA TORRE DE INVESTIGACIÓN, EDIFICIO H, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: Dr. Samuel Ponce de León Rosales _____

SUPERVISORA TÉCNICA: M. en C. Karen Flores Moreno _____

SUSTENTANTE: Ricardo Brian Millán Aguilar _____

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a la UNAM, la institución que me brindó la oportunidad de cursar desde un bachillerato hasta la licenciatura.

Al Doctor Samuel Ponce y a la Doctora Guadalupe Miranda por permitirme ser parte del equipo del PUCRA y proporcionarme las instalaciones, equipos e insumos de laboratorio necesarios para realizar este proyecto.

A cada profesor y profesora de la Facultad de Química por regalarme sus conocimientos en cada clase.

A mi asesora M. en C. Karen Flores por su apoyo, consejos y guía incluso antes de realizar el presente trabajo, muchas gracias.

A todos los compañeros que compartí buenos momentos dentro y fuera del aula durante todo mi recorrido en la UNAM. Gracias Karla, Amanda, Andrea, Pilar y Guillermo por sus consejos, momentos de risas y sobre todo su valiosa amistad.

A los doctores y químicos que enviaron las cepas utilizadas en este estudio:

- Dra. Ma. del Rayo Morfín Otero del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”.
- Dra. Mariana Gil Veloz y Q.F.B. Luis Raúl Rivera Garay del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío
- Dr. José Luis Soto Hernández y Q.B.P. Verónica Ángeles Morales del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velazco Suárez”.
- Dr. Rafael Franco Cendejas y Dr. Esaú López Jácome del Instituto Nacional de Rehabilitación.
- Dra. María Guadalupe Miranda Novales y al Dr. Rafael Arias de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund”.

A la Dra. Laura Márquez y Mtra. Nelly López del Laboratorio Nacional de Biodiversidad por el servicio de secuenciación brindado. También agradecer a la Dra. Kathia Lüneberg del Instituto de Geología, UNAM por su asesoría durante el trabajo de investigación.

Al Programa Universitario de Investigación sobre Riesgos Epidemiológicos y Emergentes (PUIREE) por otorgarme la “Beca de apoyo para egresados del área de ciencias de la salud”.

INDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. ANTEDECENTES	2
2.1. Generalidades de los antibióticos.....	2
2.2. Resistencia antimicrobiana (RAM)	4
2.2.1 Bacterias MDR, XDR y PDR	4
2.2.2. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en bacterias.....	5
2.2.3 Patógenos prioritarios en atención hospitalaria	9
2.3 <i>Klebsiella</i> sp.....	9
2.3.1. Generalidades	9
2.3.2. RAM en <i>Klebsiella</i> spp.	10
2.4 Colistina	11
2.4.1. Generalidades	11
2.4.2. Mecanismo de acción	12
2.4.3. Mecanismos de resistencia a colistina en <i>Klebsiella</i> spp.....	13
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	18
4.1. Objetivo general	18
4.2. Objetivos particulares.....	18
5. METODOLOGÍA	19
5.1. Origen de los aislamientos.	19
5.2. Identificación y perfil de resistencia/susceptibilidad.....	20
5.3. Determinación de la CMI de colistina.	20
5.4. Obtención del ADN.	21
5.5. Preparación de los oligonucleótidos.....	22
5.6. Estandarización de la amplificación del gen <i>mcr-1</i> por PCR de punto final.	22
5.7. Estandarización de la amplificación del gen <i>mgrB</i> por PCR de punto final.....	22
5.8. Secuenciación y análisis de secuencias del gen <i>mgrB</i>	23
6. RESULTADOS	25
6.2. Identificación y fenotipo de resistencia de los aislamientos de <i>Klebsiella</i> spp.	25

6.3. Estandarización e identificación del gen <i>mcr-1</i> por PCR de punto final	26
6.4. Estandarización e identificación del gen <i>mgrB</i> por PCR de punto final.....	27
6.5. Alteraciones encontradas en el gen <i>mgrB</i>	29
7. DISCUSIÓN	33
8. CONCLUSIONES	39
9. PERSPECTIVAS	40
10. REFERENCIAS	41
11. ANEXOS	47
Anexo 1. Identificación y determinación del perfil de resistencia/susceptibilidad antimicrobiana.....	47
Anexo 2. Descripción de los ensayos de microdilución y macrodilución en caldo para la determinación de la CMI de colistina.....	48
Anexo 3. Protocolo para la detección de los genes <i>mcr-1</i> y <i>mgrB</i>	49
Anexo 4. Secuencias de referencia utilizadas en este estudio	50

INDICE DE ABREVIATURAS

BGN:	Bacilos gram negativos
CAMHB:	Caldo Müeller Hinton ajustado con cationes
CDC:	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
CLSI:	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CMI:	Concentración Mínima Inhibitoria
CRKp:	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a carbapenémicos
CRK-colR:	<i>Klebsiella</i> spp. resistente a carbapenémicos y colistina
C3G:	Cefalosporinas de tercera Generación
ECDC:	Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades
EUA:	Estados Unidos de América
FDA:	Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos de América
IAAS:	Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud
IS:	Secuencia de inserción, del inglés <i>Insertion sequence</i>
KpSC:	Complejo de especies de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
L-Ara4N :	4-amino-4-deoxi-L-arabinosa
LPS:	Lipopolisacárido
MALDI-TOF:	Desorción/Ionización láser asistida por matriz – Tiempo de vuelo
<i>mcr</i> :	Gen Móvil de Resistencia a Colistina, del inglés <i>Mobile Colistin Resistance</i>
MDR:	Multidrogorresistente
ME:	Membrana externa
MH:	Müeller Hinton
MI:	Membrana interna
MPM:	Marcador de peso molecular
NDM:	Metalo beta lactamasa de Nueva Delhi
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OPS:	Organización Panamericana de la Salud
ORF:	Marco abierto de lectura, del inglés <i>Open reading frame</i>

pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PDR:	Pandrogos resistentes
PEtN:	Fosfoetanolamina
PSC:	Polisacárido capsular
PUCRA:	Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana
PUIREE:	Programa Universitario de Investigación sobre Riesgos Epidemiológicos y Emergentes
RAM:	Resistencia antimicrobiana
SARM:	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SS:	Solución salina
TBE:	Tris borato EDTA
UFC:	Unidades formadoras de colonias
XDR:	Extensamente resistentes

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales clases de antibióticos y su mecanismo de acción	2
Tabla 2. CMI de colistina de los aislamientos CRK-colR.....	25
Tabla 3. Comparación de los 21 aislamientos CRK-colR con mutaciones en la secuencia del gen <i>mgrB</i>	31
Tabla 4. Características de las secuencias de inserción encontradas en este estudio...	32
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en este estudio	49
Tabla 6. Mezcla de reacción de PCR para amplificar los genes <i>mcr-1</i> y <i>mgrB</i>	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción general de los mecanismos moleculares de resistencia adquirida a antibióticos.	6
Figura 2. Estructuras de la colistina y la polimixina B	12
Figura 3. Diagrama del mecanismo de acción de la colistina en BGN.	13
Figura 4. Mecanismos moleculares de resistencia a colistina en <i>Klebsiella</i> spp	15
Figura 5. Distribución de los aislamientos según la institución hospitalaria de origen....	19
Figura 6. Distribución de los aislamientos según su origen biológico.....	20
Figura 7. Distribución en microplaca de los aislamientos para el ensayo de microdilución en caldo	21
Figura 8. Mapa de la región cromosómica del gen <i>mgrB</i> en <i>K. pneumoniae</i>	23
Figura 9. Distribución de los aislamientos de <i>Klebsiella</i> spp. según la especie y clasificación del fenotipo de resistencia.....	26
Figura 10. Electroforesis de la estandarización para la amplificación del gen <i>mcr-1</i> por PCR de punto final	26
Figura 11. Electroforesis de la estandarización para la amplificación del gen <i>mgrB</i> por PCR de punto final	27
Figura 12. Ejemplo de la electroforesis de la amplificación del gen <i>mgrB</i> por PCR con los oligonucleótidos externos.....	28
Figura 13. Ejemplo de la lectroforesis de la amplificación del gen <i>mgrB</i> por PCR con los oligonucleótidos internos.....	28
Figura 14. Alteraciones en el gen <i>mgrB</i> mediadas por IS o mutaciones puntuales en los aislamientos de <i>K. pneumoniae</i>	29
Figura 15. Alteración por una mutación puntual en el gen <i>mgrB</i> en los aislamientos de <i>K. oxytoca</i>	30
Figura 16. Esquema de la preparación de diluciones de colistina para el ensayo de microdilución en caldo.....	48

1. RESUMEN

Desde el inicio de la pandemia por COVID-19, el problema de la resistencia antimicrobiana (RAM) ha sido cada vez más importante. La Organización Mundial de la Salud estima que se pueden producir hasta 10 millones de muertes para el año 2050 debido al aumento de patógenos resistentes a múltiples fármacos. Entre ellos destaca *Klebsiella pneumoniae*, causante de un alto porcentaje de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS).

La múltiple resistencia asociada al género *Klebsiella*, es resultado de la producción de diversas enzimas que confieren resistencia diversos antibióticos, incluidos los carbapenémicos. Por este motivo, existe la necesidad de buscar nuevos tratamientos, considerándose el uso de la colistina como uno de los últimos recursos. Sin embargo, ha surgido la resistencia a este fármaco a través de diferentes mecanismos moleculares.

Es por ello por lo que el presente proyecto se enfocó en caracterizar dos genes asociados con la resistencia a colistina (*mgrB* y *mcr-1*) en aislamientos de origen clínico de *Klebsiella* spp. resistentes a carbapenémicos, provenientes de una colección de aislamientos del laboratorio de la red del Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) coordinada por el Programa Universitario de Investigación sobre Riesgos Epidemiológicos y Emergentes (PUIEEE) de la UNAM.

Las cepas evaluadas en este estudio presentan un amplio rango de resistencia a colistina (CMI 4 – >64 µg/mL). Al realizar la clasificación del fenotipo de resistencia se obtuvo que en su mayoría (82%, n=32) son de tipo XDR.

Se obtuvo un resultado negativo en la amplificación del gen *mcr-1*, lo cual sugiere que encontrar cepas que porten este determinante genético sigue siendo un hecho esporádico. Sin embargo, los resultados en la amplificación y análisis de la secuencia del gen *mgrB* revelaron que el mecanismo molecular de resistencia a colistina en 18 cepas de *K. pneumoniae* y 3 de *K. oxytoca* (53.8%, n=21) se debe a alguna alteración en la secuencia del gen *mgrB*, ya sea por una mutación puntual o la adquisición de una secuencia de inserción.

Por lo tanto, los hallazgos en este estudio pueden ayudar a comprender los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a la colistina, lo cual puede contribuir a obtener datos de relevancia epidemiológica para un mejor control de la RAM y con ello reducir el riesgo de fracaso en el tratamiento terapéutico.

2. ANTEDECENTES

2.1. Generalidades de los antibióticos

El término *antibiótico* fue creado a partir de la palabra “antibiosis” que literalmente significa “contra la vida”. En el pasado, los antibióticos eran considerados compuestos orgánicos producidos por un microorganismo, los cuales resultaban tóxicos para otros microorganismos. Como resultado de esta idea, un antibiótico fue definido como una sustancia producida por un microorganismo o de origen natural, el cual a bajas concentraciones puede inhibir el crecimiento o ser letal para otros microorganismos. Sin embargo, esta definición fue modificada para incluir antibióticos que son producidos de manera sintética, ya sea de forma parcial o total [1].

Comúnmente los antibióticos se clasifican según su mecanismo de acción, espectro de actividad o estructura química. Basándose en esta última, las principales clases de antibióticos y su mecanismo de acción se muestran en la tabla 1 [2].

Tabla 1. Principales clases de antibióticos y su mecanismo de acción. Tomado y modificado de Darby, E., et al. (2023).

Clase de antibiótico	Mecanismo de acción	Ejemplos
Aminoglucósidos	Inhibición de síntesis de proteínas	Amikacina, gentamicina, estreptomycin
β -lactámicos	Inhibición de la síntesis de pared celular	Penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, monobactámicos, carbapenémicos
Estreptograminas	Inhibición de síntesis de proteínas	Dalfopristina, quinupristina
Fenicoles	Inhibición de síntesis de proteínas	Cloranfenicol, tianfenicol
Glicopéptidos	Inhibición de la síntesis de pared celular	Vancomicina, teicoplanina

Tabla 1 (continuación).

Clase de antibiótico	Mecanismo de acción	Ejemplos
Lincosamidas	Inhibición de síntesis de proteínas	Clindamicina, lincomicina
Lipopéptidos	Modificación de la membrana	Daptomicina
Macrólidos	Inhibición de síntesis de proteínas	Azitromicina, eritromicina, claritromicina
Oxazolidinonas	Inhibición de síntesis de proteínas	Linezolid, tedizolid
Péptidos catiónicos	Modificación de la membrana	Colistina, Polimixina B
Pirimidinas	Inhibición de la síntesis de metabolitos esenciales	Trimetoprima
Quinolonas y fluoroquinolonas	Inhibición de la replicación de ADN	Ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino
Rifamicinas	Inhibición de la transcripción	Rifampicina
Sulfonamidas	Inhibición de la síntesis de metabolitos esenciales	Sulfametoxazol
Tetraciclinas	Inhibición de síntesis de proteínas	Tetraciclina, doxiciclina, minociclina, tigeciclina

La humanidad se ha beneficiado del uso de antimicrobianos desde hace más de 100 años, ya que han cambiado drásticamente la medicina moderna, logrando extender el promedio de vida de la población. Sin embargo, desde la década de 1950 ha existido un decline gradual en el descubrimiento y desarrollo de antibióticos, sumado al aumento en el uso en diversos sectores de salud y agricultura, ha contribuido al surgimiento de patógenos resistentes a estos fármacos en todo el mundo [3, 4].

2.2. Resistencia antimicrobiana (RAM)

La *RAM* es definida como la habilidad de los microorganismos de contrarrestar la acción de los agentes antimicrobianos, y su fenómeno ocurre cuando un antimicrobiano pierde la eficacia de eliminar al microorganismo y/o de inhibir su crecimiento [4].

Diversas redes de vigilancia epidemiológica a nivel mundial como el Sistema Mundial de vigilancia de la resistencia y el uso de antimicrobianos (GLASS) o el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC), han documentado que la frecuencia de bacterias resistentes a los antibióticos ha aumentado durante la última década, además que cada año en los EUA, al menos 2 millones de personas sufren infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos y 23,000 mueren como resultado de estas infecciones.

Como consecuencia, este problema se ha convertido en una de las principales amenazas para la salud pública en los últimos tiempos y la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que se pueden producir hasta 10 millones de muertes anuales para el año 2050, con cerca de 317 mil muertes en la región de Norteamérica debido al aumento de la RAM [4, 5].

2.2.1 Bacterias MDR, XDR y PDR

Uno de los impulsores para que ocurra el desfavorable escenario del año 2050, es el surgimiento de patógenos multidrogosresistentes (MDR), extensamente resistentes (XDR) y pandrogo resistentes (PDR) [6].

Las definiciones para clasificar a las bacterias como MDR, XDR o PDR fueron propuestas en el 2012 por un grupo de expertos del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y el CDC debido a que la variabilidad en las definiciones impedía una comparación fiable de los datos de vigilancia y, en consecuencia, frenaba a que la comunidad médica tuviera una comprensión completa y clara sobre el problema de la RAM, además del impedimento para transmitir información precisa al público o a los formuladores de políticas sobre la creciente amenaza de estos patógenos para la salud pública. La adopción de una terminología internacional estandarizada para definir a los organismos que son resistentes a un número significativo de medicamentos terapéuticamente activos es un paso importante para mejorar la comparabilidad de los datos de vigilancia de estos organismos y evaluar mejor su importancia epidemiológica mundial, regional y local, así como su impacto en salud pública [7].

Además, el enfoque de clasificar a los antibióticos según su estructura química, en ocasiones no es concluyente y puede dificultar la comparación de resultados entre estudios, por lo que el mismo grupo de expertos que propuso las categorías MDR, XDR y PDR, construyó categorías de antimicrobianos para cada bacteria o grupo bacteriano con la intención de ubicar a los antibióticos en grupos más relevantes desde el punto de vista terapéutico [7]. En el caso de la familia *Enterobacteriaceae*, las categorías de antibióticos incluyen algunos antibióticos listados en la *tabla 1* como son: aminoglucósidos, β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, fosfomicina y colistina.

De este modo, las bacterias MDR son resistentes al menos a un agente en tres o más clases de antimicrobianos. Las XDR son resistentes al menos a un agente en todas las categorías de antimicrobianos excepto dos o menos, es decir, los aislados bacterianos siguen siendo susceptibles a un antibiótico de una o dos categorías. En tanto que las PDR son resistentes a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos [7].

Por lo tanto, un aislado bacteriano que se caracterice como XDR también será MDR. De manera similar, un aislado PDR también será caracterizado como XDR y consecuentemente MDR [7].

2.2.2. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en bacterias

La RAM en bacterias puede ser categorizada en *intrínseca*, *adaptativa* y *adquirida*. Brevemente, la *intrínseca* es aquella que es debida a propiedades inherentes de la bacteria, es decir, la célula puede usar los genes que ya posee para sobrevivir a la exposición a los antibióticos. Ejemplo de ello ocurre en bacterias del género *Enterobacter*, ya que es intrínsecamente resistente a las penicilinas debido a la producción de la β -lactamasa AmpC [4, 5, 63].

Por su parte, la *resistencia adaptativa* se define como la resistencia a uno o más antibióticos inducida por una señal ambiental específica, por ejemplo, estrés, estado de crecimiento, pH o niveles subinhibitorios de antibióticos. A diferencia de la resistencia intrínseca y adquirida, la resistencia adaptativa es transitoria. Además, este tipo de resistencia se caracteriza por la rápida reversibilidad al fenotipo no resistente cuando el antibiótico se retira del medio. Por ejemplo, la resistencia al ácido nalidíxico y otros antibióticos en *E. coli* ocurre por la expresión reversible del sistema de bomba de eflujo Mar/AcrAB cuando la bacteria es expuesta a concentraciones crecientes del antibiótico [4, 5, 64].

La *resistencia adquirida* ocurre cuando una bacteria previamente sensible adquiere la capacidad de resistencia por una mutación en su genoma o la adquisición de nuevo material genético de forma exógena, ya sea a través de la transformación, captación del gen resistente del medio ambiente; transducción por transferencia del gen resistente de un bacteriófago o por medio de la conjugación bacteriana por contacto directo entre dos células. Un ejemplo sucede en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) cuando hay una sobreexpresión del sistema de bomba de eflujo MexAB-OprM, como consecuencia de mutaciones en genes reguladores transcripcionales, la bacteria expresa resistencia a β -lactámicos y fluoroquinolonas [4, 5, 65].

Los mecanismos de resistencia adquirida se pueden clasificar en cuatro grupos principales, que son: 1) modificación del sitio blanco del antibiótico, 2) modificación o inactivación del antibiótico, 3) reducción de la permeabilidad, 4) expulsión del antibiótico, y se ilustran en la Figura 1 [4, 5].

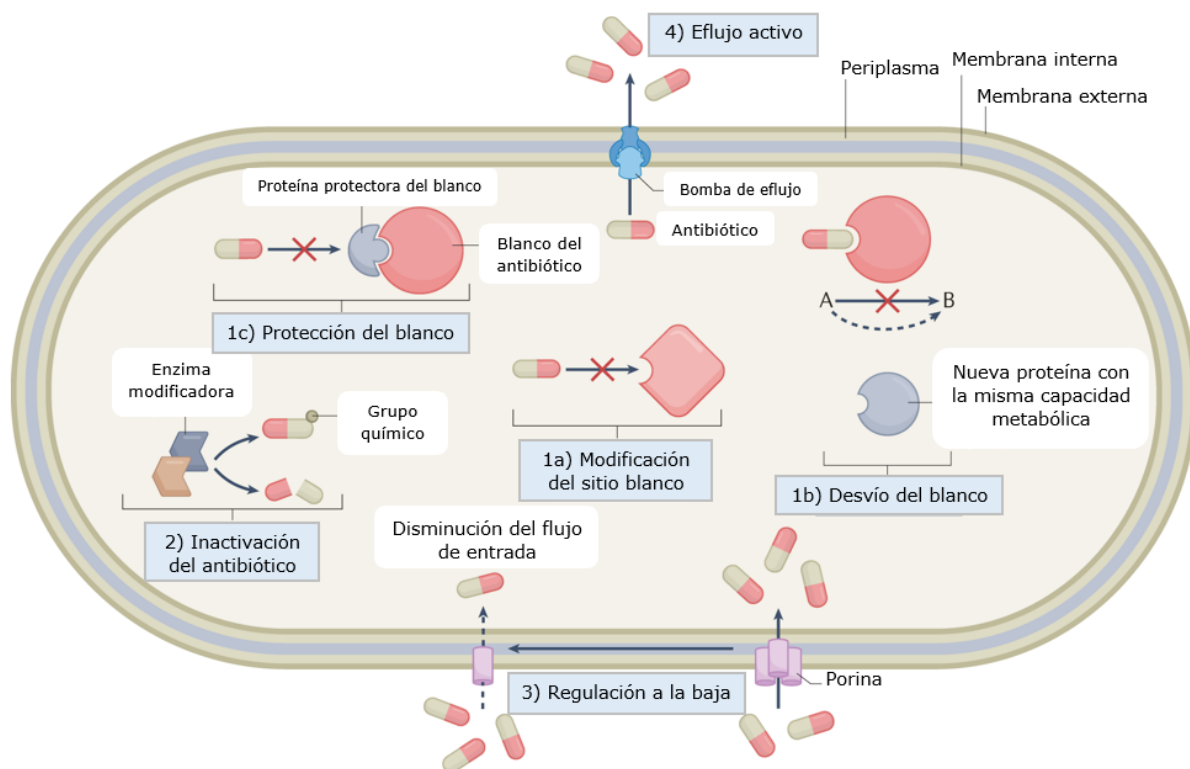


Figura 1. Descripción general de los mecanismos moleculares de resistencia adquirida a antibióticos. La modificación del sitio blanco del antibiótico (1a) involucra el desvío del blanco (1b) y la protección del sitio blanco (1c). La inactivación del antibiótico (2) contempla la destrucción de la molécula o la modificación de esta con la adición de un grupo químico. Se muestra como la regulación a la baja (3)

en la síntesis de porinas lleva a la disminución del flujo de entrada del antibiótico. El flujo activo, a través de una bomba de expulsión (4) conlleva la salida del fármaco del medio intracelular. (Tomado y modificado de Darby, E., et al., 2023) [2].

1) Modificación del sitio blanco del antibiótico

Muchos antibióticos se unen a un blanco primario con alta afinidad, lo que generalmente inhibe una función celular esencial y conduce a la inhibición del crecimiento o la muerte. Si la estructura del blanco principal se altera o protege, la unión del antibiótico puede volverse ineficaz y conferir resistencia al antibiótico [2, 8].

1a) La modificación del sitio blanco involucra mutaciones en la secuencia del gen o genes que codifican la proteína blanco. Por lo tanto, una mutación en estos genes da como resultado una menor eficiencia de unión antibiótico-blanco. Por ejemplo, la disminución de la susceptibilidad a los β -lactámicos se debe a mutaciones en los genes que codifican las proteínas de unión a penicilina (PBP).

1b) Otra estrategia para la modificación del sitio blanco consiste en el desvío del blanco. Esto tiene lugar cuando se produce una vía alternativa que elude el antibiótico haciendo que el objetivo original sea redundante. El ejemplo más conocido de desvío del sitio blanco es probablemente el surgimiento de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) resistente a la meticilina (SARM) al adquirir una PBP exógena (PBP2a) que es homóloga al blanco original, pero con menor afinidad por los antibióticos β -lactámicos.

1c) Asimismo, la protección mediante la modificación del sitio blanco también puede ser un medio eficaz de resistencia a los antibióticos que no requiere un cambio de tipo mutacional en los genes que codifica la molécula blanco. Ello ocurre con la adición de un grupo químico al sitio blanco, y de esta forma se evita la unión del antibiótico sin alterar la secuencia proteica primaria del sitio y consecuentemente conserva su actividad. Esto se ve comúnmente con las proteínas Qnr, una familia codificada por genes contenidos en plásmidos presentes a menudo en bacterias gram negativas, estas proteínas se unen a las topoisomerasas bacterianas previniendo la acción de las quinolonas [2, 8].

2) Inactivación o modificación del antibiótico

La modificación de los antibióticos catalizada por enzimas es un mecanismo principal de resistencia a los antibióticos. Ejemplos de la inactivación de antibióticos incluyen la hidrólisis de antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos) por β -lactamasas o la inactivación de tetraciclinas por la acción de una tetraciclina hidroxilasa [2, 8].

Por otro lado, la adición de grupos químicos a sitios vulnerables en la molécula del antibiótico por parte de enzimas bacterianas provoca resistencia al evitar que el antibiótico se una a su proteína diana como resultado del impedimento estérico. Se pueden transferir varios grupos químicos diferentes, incluidos los grupos hidroxilo, acilo, fosfato, nucleotidilo y ribitoilo. Se han identificado enzimas modificadoras de fármacos para varios antibióticos, incluidos aminoglucósidos, macrólidos, rifamicinas, estreptograminas, lincosamidas y fenicoles [2, 8].

Ambos mecanismos están muy extendidos entre las bacterias debido a la transferencia por distintos mecanismos de los genes codificantes [2, 8].

3) Disminución en la acumulación de fármacos intracelulares por reducción de la permeabilidad.

La membrana externa de las bacterias gram negativas contiene porinas, que son canales de proteína de barril β . Las alteraciones de la estructura de la envoltura, como la pérdida de estos canales, cambios en el contenido de fosfolípidos y ácidos grasos o el reemplazo de las porinas con canales más selectivos en la membrana externa, pueden afectar la capacidad de un fármaco para penetrar en la célula bacteriana [2, 8].

4) Expulsión del antibiótico del medio intracelular.

Además de evitar que los fármacos entren en la célula, las bacterias pueden exportarlos activamente en un proceso conocido como eflujo. Las bombas de eflujo son proteínas transmembranales que pueden transportar una amplia variedad de compuestos tóxicos, incluidos los antibióticos, a través de las membranas de una manera dependiente de energía. Todas las bacterias contienen múltiples bombas de eflujo, pero son mediadores particularmente importantes en bacterias gram negativas MDR [2, 8].

2.2.3 Patógenos prioritarios en atención hospitalaria

En 2017, la OMS publicó su primera lista de patógenos que requieren atención prioritaria por ser resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen a 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. La lista de la OMS se divide en tres categorías; *prioridad crítica, elevada y media*, dependiendo la urgencia en que se necesitan nuevos antibióticos para tratar infecciones causadas por estos patógenos [9].

Es de destacar que la lista resalta el problema que suponen las bacterias del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.), clasificando a los bacilos gram negativos (BGN) de este grupo en “Prioridad crítica” [9]. Las bacterias del grupo ESKAPE son una amenaza para la salud porque causan un porcentaje elevado de IAAS, llegando a representar entre 15-31% de los casos [10, 11]. Además, la RAM está muy extendida, ya que este grupo de bacterias tiene la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y pueden transmitir material genético que permite a otras bacterias convertirse en farmacorresistentes, debido a sus mecanismos de patogenicidad y resistencia evolutivamente muy desarrollados [12].

2.3 *Klebsiella* sp.

2.3.1. Generalidades

Klebsiella sp. se trata de un género de bacilos gram negativos, oxidasa negativos, capsulados e inmóviles. El género pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, en la que se encuentran otros géneros como *Escherichia, Salmonella, Serratia, Citrobacter, Enterobacter*, etc. Actualmente, en *Klebsiella* sp. se incluye una amplia variedad de especies. Por una parte, se encuentra el complejo *Klebsiella pneumoniae* (KpSC) que se divide en siete filogrupos:

- 1) *K. pneumoniae* (Kp1),
- 2) *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (Kp2)
- 3) *K. variicola* subsp. *variicola* (Kp3)
- 4) *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Kp4)
- 5) *K. variicola* subsp. *tropica* (Kp5)
- 6) *K. quasivariicola* (Kp6)
- 7) *K. africana* (Kp7)

Estos filogrupos comparten entre 95% - 96% de identidad de nucleótidos con *K. pneumoniae sensu stricto*. Por otro lado, existen especies que comparten en promedio 90% de identidad de nucleótidos con KpSC, por ejemplo, *K. oxytoca*, *K. grimontii*, *K. pasteurii* y *K. michiganensis*. Estas clasificaciones se basan en métodos de secuenciación o el uso de plataformas de espectrometría de masas (MALDI-TOF). *K. variicola* y *K. oxytoca* son relativamente comunes en infecciones nosocomiales (10-20%) y pueden adquirir genes y plásmidos de resistencia a los antimicrobianos de *K. pneumoniae*, sin embargo, sus perfiles de virulencia no se han caracterizado completamente. La especie de mayor relevancia clínica es *K. pneumoniae* ya que representa aproximadamente el 85% de los aislamientos clínicos, por lo que la mayoría de los datos disponibles se centran en esta especie [13, 14].

Las especies de *Klebsiella* pueden sobrevivir en una amplia variedad de entornos como el suelo, agua, plantas y animales. En el ser humano son patógenos oportunistas que forman parte de la microbiota de la nariz, garganta, piel y el tracto intestinal de personas sanas, pero pueden causar una amplia diversidad de infecciones. Las manifestaciones clínicas incluyen neumonía, infecciones de tejidos blandos y heridas quirúrgicas, infecciones del tracto urinario, infecciones del torrente sanguíneo y sepsis. Estas infecciones ocurren en grupos de pacientes vulnerables, como los recién nacidos, ancianos, pacientes con dispositivos médicos insertados o inmunocomprometidos [13 - 16].

2.3.2. RAM en *Klebsiella* spp.

Klebsiella spp. es propensa a acumular mutaciones y adquirir determinantes genéticos que llevan al surgimiento de cepas MDR, XDR o PDR. En *K. pneumoniae* se han identificado más de 100 genes de resistencia antimicrobiana que codifican diferentes productos que confieren resistencia a distintas clases de antibióticos, incluidos β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, tigeciclina y polimixinas [13]. Por ejemplo, las cepas productoras de BLEEs hidrolizan penicilinas, cefalosporinas (1^a a 4^a generación), cefamicinas y monobactámicos, mientras que las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos (CRKp) producen uno o más tipos de carbapenemasas, siendo la metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi (NDM) la mayormente diseminada alrededor del mundo [17, 18].

La RAM asociada es muy variada a nivel global, dependiendo de factores como la región geográfica, los recursos económicos y el uso de antibióticos en cada país. Datos del 2020 muestran que en países desarrollados la resistencia a cefalosporinas de tercera generación

(C3G) fue hasta del 31.2% y en cuanto a los carbapenémicos alcanzó un 7.9% el mismo año. En contraste, los países en vías de desarrollo tienen tasas de resistencia más elevadas; hasta del 79% para las C3G y varía del 16.5% al 34.8% para los carbapenémicos [16, 19, 20].

En México, el panorama es similar al resto de países con economías emergentes, *Klebsiella* spp. productora de BLEEs ha aumentado su resistencia del 28% en 2010 a 55.5% en 2020, mientras que a los carbapenémicos ha sido de 0% hasta 10% en el mismo periodo de tiempo [21]. Específicamente, en *K. pneumoniae* se ha encontrado que en C3G y cefalosporinas de cuarta generación, la resistencia fue del 65% en el 2022 [22] y alcanzó un máximo del 6.9% en el 2019 a los carbapenémicos [22, 23].

La mayor preocupación clínica es el aumento de cepas de *Klebsiella* spp. MDR y particularmente de CRKp, ya que se estima una mortalidad asociada a IAAS del 42% por CRKp, en comparación con el 21% para las cepas sensibles a carbapenémicos [14] Además, para estas infecciones no se cuenta con un tratamiento óptimo, sin embargo, existen opciones limitadas de terapia antimicrobiana para las infecciones por estos patógenos, a saber, eravaciclina, plazomicina, tigeciclina, cefiderocol, meropenem/vaborbactam, imipenem/relebactam, ceftazidima/avibactam y colistina, aunque el uso de estos antimicrobianos depende de la disponibilidad de los mismos en cada país y centro hospitalario [13].

2.4 Colistina

2.4.1. Generalidades

La colistina, también conocida como Polimixina E, es un lipopéptido catiónico descubierto en Japón en 1947, inicialmente se consideró un metabolito secundario producido por la bacteria gram positiva *Paenibacillus polymyxa*. El grupo de las polimixinas incluye cinco compuestos (A, B, C, D y E), sin embargo, sólo dos son usados clínicamente, la polimixina B y la colistina (Figura 2), este último usado en dos variantes, la primera como profármaco, metanosulfonato de colistina sódico (CMS) o también conocido como colistimetato de sodio para uso parenteral o en forma nebulizada en medicina humana, y la segunda variante, el sulfato de colistina (CS) para uso tópico y oral en medicina veterinaria [24, 25].

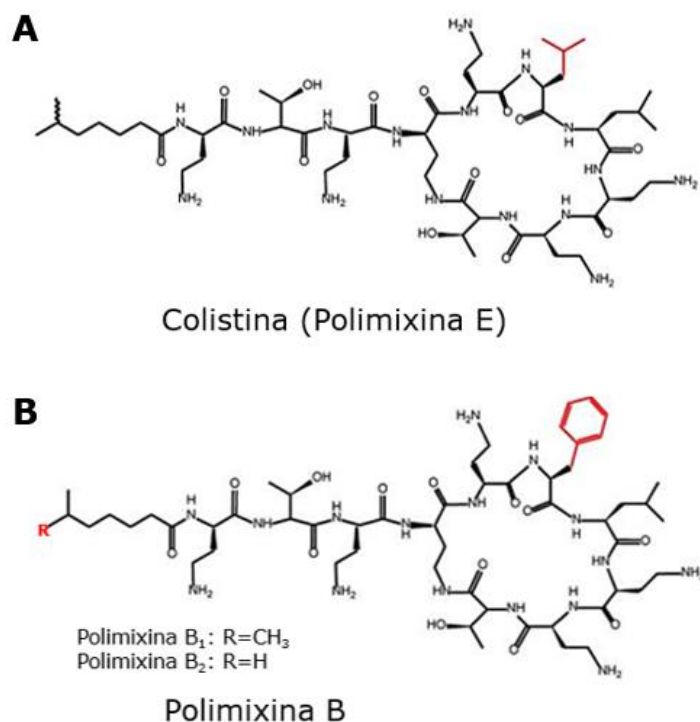


Figura 2. Estructuras de la colistina y la polimixina B. Tomado y modificado de Sun, Z. & Palzkill, T. (2021) [28].

Desde 1959, la FDA aprobó a la colistina como un agente antimicrobiano contra BGN pero su uso fue gradualmente suspendido debido a su alta nefrotoxicidad y la disponibilidad de agentes menos tóxicos como los aminoglucósidos a mediados de la década de 1970, pero por muchas décadas persistió su uso en formulaciones tópicas para el tratamiento de infecciones en ojos y oídos, así como agente profiláctico en medicina veterinaria para la descontaminación selectiva intestinal del ganado [24 - 27].

2.4.2. Mecanismo de acción

La colistina es principalmente activa contra los BGN debido a la presencia del lipopolisacárido (LPS) en su ME, estos componentes protegen a la bacteria al dificultar el paso de antibióticos hidrofóbicos y/o de gran tamaño. La estructura del LPS comprende tres dominios: una cadena de *antígeno O*, un núcleo de *polisacárido* y un *lípid A* conservado que actúa como un ancla en la ME. La acción antibacteriana ocurre por la interacción entre la colistina y el lípido A de la bacteria, por medio de un modelo llamado vía de captación autopromovida (Figura 3) [26].

En la vía de captación autopromovida, los residuos del ácido L-diaminobutírico (cargado positivamente) de la colistina se unen por interacciones electrostáticas a los grupos fosfato (cargados negativamente) del lípido A. Después, la colistina desplaza a los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} que se encuentran unidos a los grupos fosfato de los lípidos de la membrana. Los cationes divalentes tienen la función de unir moléculas de LPS y con ello permitir la estabilización de la ME; al ser desplazados, la membrana se desestabiliza y permite la captación de la colistina. Posteriormente, la colistina inserta sus regiones hidrofóbicas, causando una expansión de la ME, permitiendo al fármaco atravesar la membrana como un autopromotor. La bicapa de fosfolípidos de la membrana interna (MI) también pierde estabilidad, debido a la acción de grupos hidrofílicos en las cadenas de ácidos grasos de la colistina, esto cambia la integridad de la MI y conduce a su destrucción, produciendo su lisis y fuga del contenido periplásmico y citoplasmático, llevando finalmente a la muerte de la bacteria [24, 26].

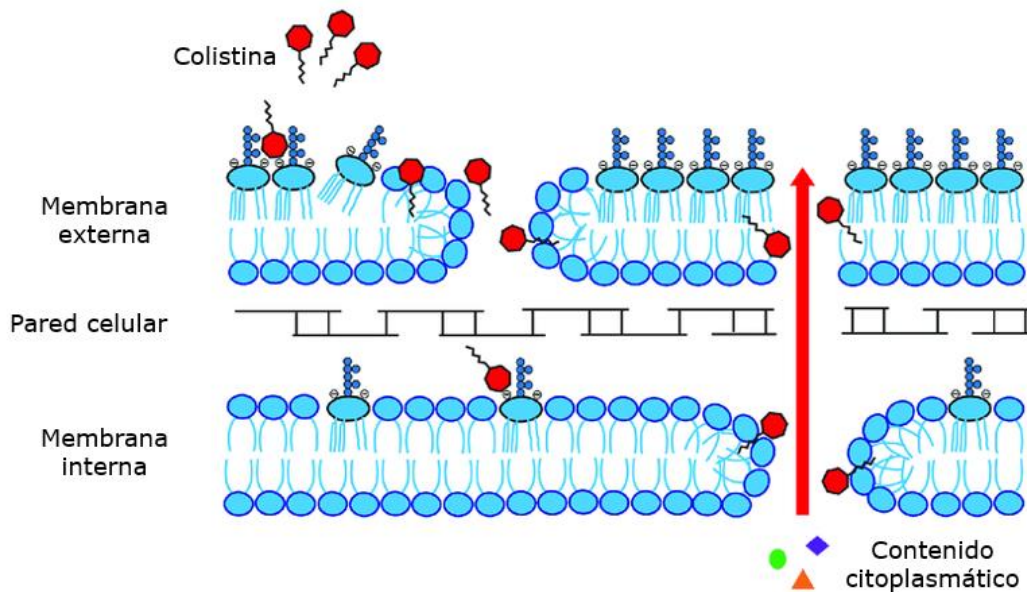


Figura 3. Diagrama del mecanismo de acción de la colistina en BGN. La colistina ejerce su acción bactericida al atacar el lipopolisacárido de las membranas externa e interna de la bacteria. Tomado y modificado de Sun, Z. & Palzkill, T. (2021) [28].

2.4.3. Mecanismos de resistencia a colistina en *Klebsiella* spp.

En años recientes, el empleo de la colistina ha resurgido a causa del incremento en la incidencia de bacterias MDR, particularmente en infecciones por *K. pneumoniae*, *P.*

aeruginosa y *A. baumannii*. Sin embargo, el uso excesivo e inadecuado de este fármaco ha provocado la emergencia y diseminación de cepas resistentes. En *K. pneumoniae*, la resistencia a colistina ocurre cuando se presentan mutaciones en genes cromosómicos o incluso si la bacteria adquiere algún elemento genético móvil. La detección de estos últimos es preocupante debido a su potencial para acelerar la transmisión de la resistencia a colistina entre especies del género *Klebsiella* e incluso entre diferentes géneros de bacterias [24, 26, 29].

Existen tres tipos de mecanismos de resistencia cromosómicos en *Klebsiella* sp.: 1) modificación del LPS, 2) sobreproducción del lipopolisacárido capsular y 3) expresión de sistemas de bombas de expulsión del fármaco [24 - 26].

1) Modificación del LPS

Es la estrategia principal que permite la resistencia a colistina en *K. pneumoniae*. La modificación del LPS puede ocurrir por mutaciones en los genes *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ*, *mgrB* y *crrB* principalmente. Sin embargo, la modificación del LPS también puede ser mediada por la adquisición de un elemento genético móvil [26, 29].

Los genes *pmrA* y *pmrB*, así como *phoP* y *phoQ* regulan la expresión de los sistemas de dos componentes PmrAB y PhoPQ respectivamente. PhoQ y PmrB son cinasas sensoras que pueden detectar señales ambientales como la reducción del contenido de Mg^{+2} y Ca^{+2} o la presencia de colistina en el medio extracelular, por lo que pueden cambiar los patrones de expresión de estos sistemas ante un estímulo ambiental. La activación de PhoQ y PmrB conducen a la fosforilación de los reguladores de respuesta PhoP y PmrA respectivamente [25, 26].

PhoP fosforilado aumenta la transcripción de varios genes que conducen a la adición de residuos catiónicos de 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) y/o fosfoetanolamina (pEtN) y consecuentemente reemplazan a los grupos fosfato del lípido A del LPS. PhoP también aumenta la transcripción de *pmrD*, su producto (PmrD) se une y estabiliza a PmrA en su estado fosforilado. Luego, PmrA activa la transcripción de los operones *pmrCAB* y *pmrHFJKLM* (también llamado *arnBCADTEF*), así como la transcripción del gen *pmrE*. El operón *pmrCAB* está involucrado en la modificación del LPS por adición de

pEtN, mientras que el operón *pmrHFIJKLM* y el gen *pmrE* son responsables de la síntesis del residuo de L-Ara4N y su unión al lípido A (Figura 4) [25, 26].

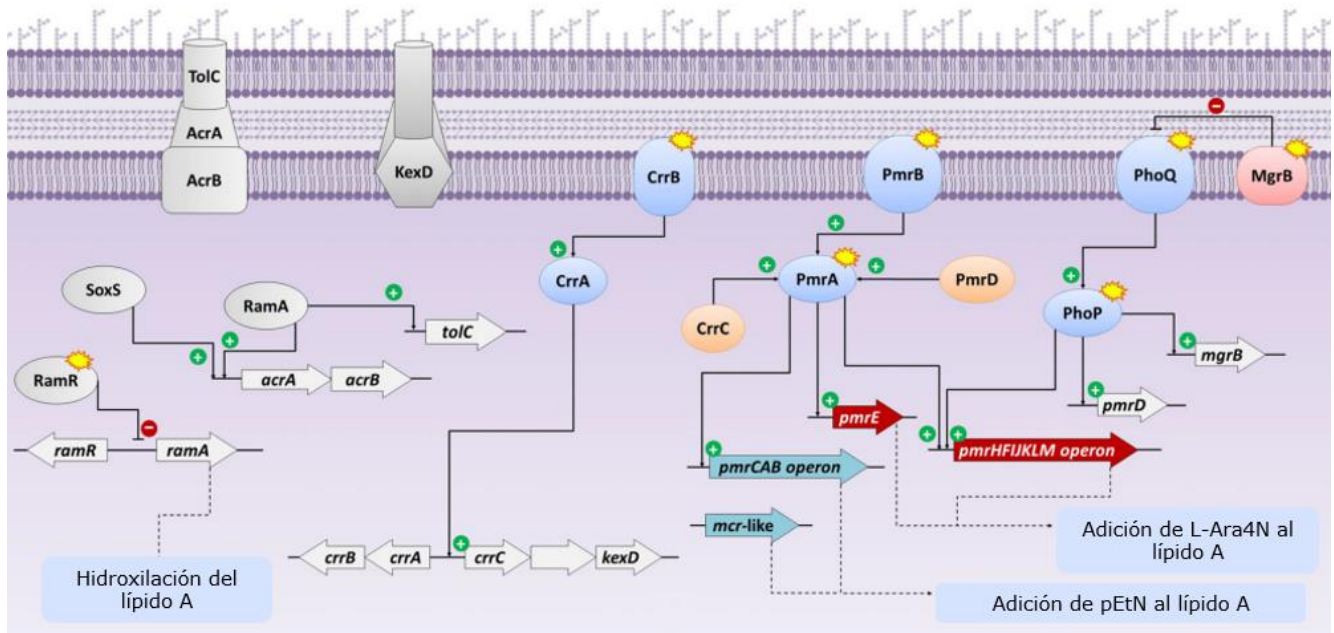


Figura 4. Mecanismos moleculares de resistencia a colistina en *Klebsiella* spp. L-Ara4N, 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa; pEtN, fosfoetanolamina. (Tomado y modificado de Rodríguez J., *et al.* 2021).

Por otra parte, el gen conservado de 141 nucleótidos conocido como *mgrB*, actúa como regulador de retroalimentación negativa del sistema PhoPQ. *mgrB* codifica la proteína MgrB (también llamada YobG); una pequeña proteína transmembranal compuesta de 47 aminoácidos que suprime la expresión del gen que codifica PhoQ (Figura 4). La delección o inactivación de *mgrB* en diferentes posiciones por secuencias de inserción (IS) o debido a mutaciones puntuales (no sinónimas y sin sentido) causan la sobreexpresión del sistema PhoPQ e indirectamente PmrAB que conducen finalmente a la modificación del lípido A [24] y representan la principal causa de resistencia a colistina en cepas de *K. pneumoniae* de origen clínico [25, 26, 30].

Además, se han descrito mutaciones en el operón *ccrB*. Este operón codifica dos proteínas, la proteína reguladora CrrA y la proteína cinasa sensora CrrB. La activación de este operón activa la transcripción de una proteína análoga a PmrD conocida como Crrc que activa PmrA (Figura 4). En *K. pneumoniae*, la inactivación del gen *crrB* conduce a la sobreexpresión del sistema PmrAB que a su vez conduce a la modificación del lípido A [25, 26].

2) Sobreproducción del lipopolisacárido capsular

Otro mecanismo de resistencia a colistina en *K. pneumoniae* que se ha propuesto recientemente es la sobreproducción de polisacáridos capsulares (PSC), ya que naturalmente representan una barrera protectora al atrapar y dificultar la unión entre los péptidos antimicrobianos como las polimixinas o la α -defensina de neutrófilos humanos y el LPS de la bacteria [25]. La interacción entre el PSC de superficie y el LPS es de tipo iónica, la cual está estabilizada por cationes divalentes. Por lo tanto, el desplazamiento de estos cationes por la colistina da como resultado la liberación de PSC [26].

Existen informes en donde cepas de *K. pneumoniae* aumentan la cantidad de PSC cuando son cultivadas con colistina, sin embargo, este mecanismo confiere poca protección contra la colistina ya que existen cepas deficientes de cápsula que presentan una concentración mínima inhibitoria (CMI) equivalente a cepas de tipo silvestre con capsula, por lo tanto, el papel de la cápsula en la mediación de la resistencia a colistina sigue siendo objeto de debate [25, 30].

3) Expresión de sistemas de bombas de eflujo

Debido a que las polimixinas tienen una naturaleza anfipática y actúan de la misma manera que otros detergentes biológicos, los sistemas de bombas de eflujo pueden estar involucrados en la resistencia a colistina, ya que se ha demostrado que los inhibidores de las bombas de eflujo pueden disminuir significativamente la CMI de cepas resistentes a colistina [25, 26].

La bomba de eflujo mejor caracterizada es la bomba tripartita AcrAB-TolC. Se han descrito estudios en donde cepas de *K. pneumoniae* resistentes a polimixinas sobre expresan los genes *acrA*, *acrB* y *tolC*, así como sus reguladores SoxS y RamA, este último regulador también se ha asociado con la biosíntesis del lípido A. La sobreexpresión de RamA mediante la inactivación de su regulador negativo RamR (Figura 4) media las alteraciones del lípido A que disminuyen la susceptibilidad a colistina [25, 30].

También, mutaciones en el gen *kpnEF* puede disminuir al doble la CMI de colistina en comparación con una cepa silvestre al aumentar la sobreexpresión de la bomba de eflujo KpnEF. Por su parte, la proteína CrrC, no solo se encuentra involucrada en la modificación del lípido A, también induce la expresión de la bomba de expulsión KexD (Figura 4). Se ha

informado que aislamientos con mutaciones en el gen *crrB* se distinguen por presentar altos niveles de resistencia a colistina (CMI \geq 128 $\mu\text{g/mL}$) [25, 26, 30].

Además de los mecanismos de resistencia basados en mutaciones cromosómicas, la transferencia horizontal mediante conjugación de genes transmitidos por plásmidos, por ejemplo, el gen móvil de resistencia a colistina (*mcr*) se ha convertido en una causa importante para la diseminación de la resistencia a las polimixinas entre varios BGN [25, 26].

A finales del 2015 se encontró el gen *mcr-1* en una cepa de *E. coli* aislada de cerdos para el consumo humano en China. Desde entonces, la diseminación de *mcr-1* entre diferentes cepas de enterobacterias se ha informado en todo el mundo en más de 30 países en los cinco continentes a partir de diversas muestras. Aunque varios informes han propuesto que las moscas pueden servir como vectores intermedios para la transmisión de *mcr-1* entre animales y humanos, la ruta exacta para la propagación de *mcr-1* sigue siendo ambigua [26].

Posteriormente en el año 2016, en Bélgica, se detectó una variante de *mcr-1* en una cepa de *E. coli* recuperada de ganado vacuno y porcino, nombrada *mcr-2* debido a que comparte el 81% de identidad de aminoácidos con el primer gen. Este hecho abrió la posibilidad de la existencia de más variantes de *mcr-1*. Actualmente se han descrito 10 alelos del gen que codifican las enzimas MCR-1 a MCR-10, las cuales tienen diferentes orígenes filogenéticos, variantes genéticas, plásmidos portadores, especies bacterianas portadoras e impactos en la resistencia a la colistina [25, 26, 29]. Las enzimas MCR, codifican una pEtN transferasa que conduce a la adición de un residuo de pEtN al lípido A del LPS, aumentando las cargas catiónicas del LPS y, en consecuencia, disminuyendo la afinidad de la colistina por el LPS [26].

Además, la identificación de enterobacterias que contienen el gen *mcr-1* junto con genes para la expresión de BLEEs y/o carbapenemasas [24, 26], así como la detección del gen *mcr-1* en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, implica una preocupación adicional en salud pública [25].

3. JUSTIFICACIÓN

Klebsiella spp. resistente a carbapenémicos es un patógeno que requiere especial atención en el entorno clínico. En México, la información sobre los mecanismos involucrados en la resistencia a colistina es limitada, por lo que el presente estudio permitirá conocer el mecanismo molecular de resistencia a colistina asociado a cepas de *Klebsiella* spp. de origen clínico, y con ello se obtendrán datos de interés epidemiológico que pueden ayudar a un mejor control de la RAM.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Caracterizar el mecanismo de resistencia a colistina en 39 aislamientos de *Klebsiella* spp. resistentes a carbapenémicos y colistina (CRK-colR), provenientes de cinco hospitales de México y procesados en el laboratorio del Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA), UNAM entre junio de 2019 y diciembre de 2022.

4.2. Objetivos particulares

Determinar la resistencia a colistina en aislamientos de CRK mediante los métodos de microdilución y macrodilución en caldo.

Clasificar los aislamientos CRK-colR como MDR, XDR o PDR.

Identificar la presencia del gen *mcr-1* para establecer si la resistencia a colistina en aislamientos CRK-colR es mediada por la adquisición de este gen.

Amplificar y analizar la secuencia del gen *mgrB* de aislamientos CRK-colR para establecer si la resistencia a colistina es mediada por alguna mutación en este gen.

5. METODOLOGÍA

5.1. Origen de los aislamientos.

Los aislamientos fueron recuperados previamente de un grupo de pacientes de cinco hospitales en 3 estados de la República Mexicana (Ciudad de México, Jalisco y Guanajuato), en los cuales fueron identificados como resistentes a carbapenémicos en el periodo de enero de 2018 a diciembre de 2023.

De los 39 aislamientos CRK-coLR, 26 provienen del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNN) de la CDMX, 9 aislamientos de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría Dr. Silvestre Frenk Freund del Centro Médico Nacional Siglo XXI de la CDMX (UMAE-Pediatría), 2 aislamientos del Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde de Guadalajara, Jalisco (HCG), 1 aislamiento del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío de León, Guanajuato (HRAEB), y 1 aislamiento del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra (INR) de la CDMX (Figura 5). Además, 28 aislamientos se relacionaron con IAAS, mientras que el resto no se contaba con este dato.

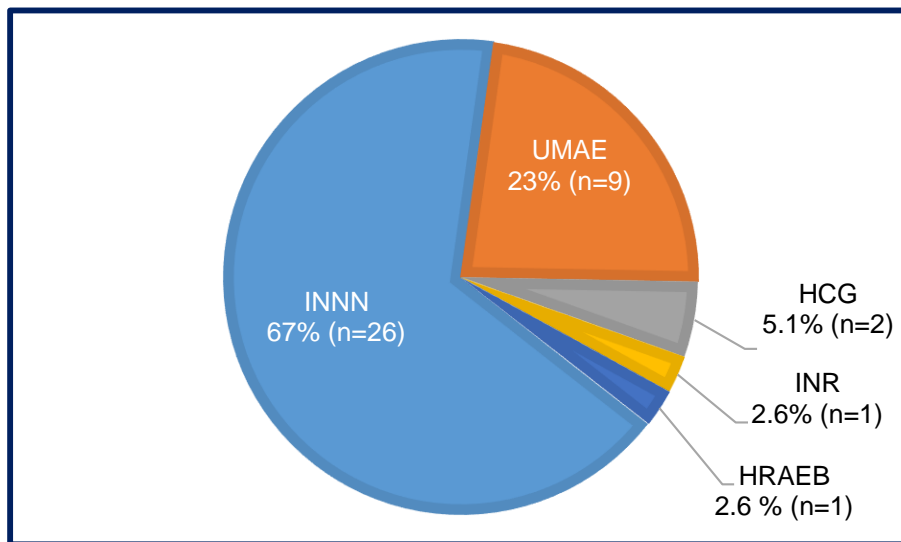


Figura 5. Distribución de los aislamientos según la institución hospitalaria de origen. INNN, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía; UMAE, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría; HCG, Hospital Civil de Guadalajara; INR, Instituto Nacional de Rehabilitación; HRAEB, Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío.

La edad de los pacientes varía desde los 2 meses a los 89 años. El origen biológico también es diverso: 17 aislamientos provienen de secreción respiratoria, 8 de orina, 5 de líquido cefalorraquídeo, 3 de sangre, 2 de herida quirúrgica y 3 aislamientos son de otros orígenes como coprocultivo, punta de catéter y secreción de gastrostomía, 1 aislamiento se desconoce el origen (Figura 6).

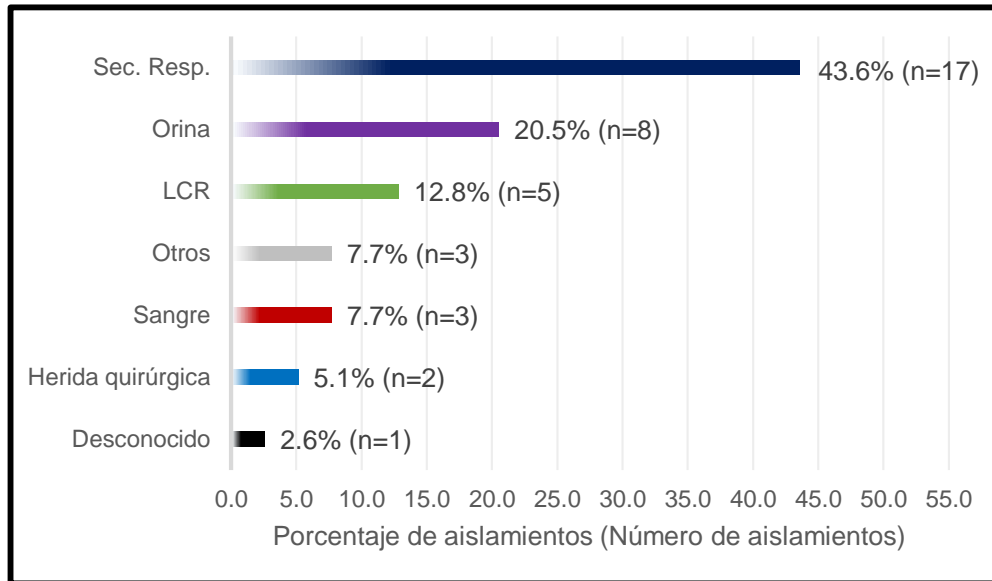


Figura 6. Distribución de los aislamientos según su origen biológico. Sec. Resp., Secreción respiratoria; LCR, Líquido cefalorraquídeo.

5.2. Identificación y perfil de resistencia/susceptibilidad.

Los 39 aislamientos fueron recibidos en el laboratorio del PUCRA entre junio del 2019 y diciembre de 2022. Una vez recibidos, se sembraron en agar MacConkey y agar Müeller Hinton (MH), y se incubaron durante 24 horas a 35 °C. A partir del crecimiento en agar MH, se corroboró la identificación y perfil de susceptibilidad antimicrobiana mediante el equipo automatizado VITEK-2 (Anexo 1). La identificación de los aislamientos fue corroborada por medio del sistema MALDI-TOF. Posteriormente, se preservaron los aislamientos resistentes a carbapenémicos por congelación en medio soya tripticaseína con 10% de glicerol.

5.3. Determinación de la CMI de colistina.

La CMI de colistina fue determinada mediante los métodos de microdilución y macrodilución en caldo siguiendo las indicaciones del CLSI [31]. El medio utilizado fue Caldo Müeller-Hinton ajustado con cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (CAMHB) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada uno.

La macrodilución se realizó a una concentración de colistina de 2 µg/mL. Para la microdilución se prepararon diluciones dobles seriadas partiendo de una concentración de 64 µg/mL y hasta 0.0625 µg/mL. Este ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos con fondo en U, teniendo una distribución en cada placa que se muestra en la Figura 7.

En ambos ensayos, se utilizó la cepa *E. coli* NCTC 13846, portadora del gen *mcr-1*, como control positivo de resistencia a colistina. Su procedimiento se describe a detalle en el Anexo 2. Una vez colocado el inóculo bacteriano a una concentración final recomendada de 7.5×10^5 UFC/mL, se incubó durante 24 h antes de realizar la lectura de resultados [31].

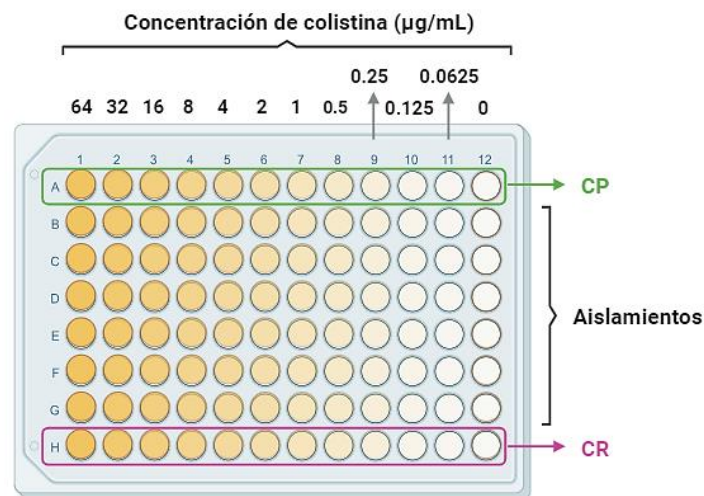


Figura 7. Distribución de los aislamientos y controles para el ensayo de microdilución en caldo en microplaca de 96 pocillos para determinar la CMI de colistina. CP, Control Positivo; CR, Control de Reactivos.

5.4. Obtención del ADN.

Para cada aislamiento se partió de un cultivo puro de 24 h en una placa de agar MH, se tomó entre una y dos asadas de las colonias, se resuspendieron en 1 mL de SS al 0.9% en un microtubo Eppendorf, el cual se colocó en baño María a ebullición por 10 minutos y posteriormente en hielo durante 10 minutos más. Luego, se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante. La extracción y purificación del ADN se continuó con el Kit de extracción *QIAamp*® siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación se realizó en el espectrofotómetro *NanoDrop*TM 2000c. La concentración se ajustó entre 17-21 ng/µL.

5.5. Preparación de los oligonucleótidos.

Las secuencias de oligonucleótidos fueron obtenidas de Liu, *et al.* (2016) [32] y de Cannatelli, *et al.* (2014) [33] correspondientes a los genes *mcr-1* y *mgrB* respectivamente y fueron sintetizados en la empresa *Sigma-Aldrich*. Las secuencias se presentan en la tabla 5. Cada oligonucleótido fue disuelto en agua estéril grado biología molecular libre de nucleasas para alcanzar una concentración de 100 μ M. Posteriormente se realizaron las diluciones correspondientes para obtener la concentración deseada en cada PCR.

5.6. Estandarización de la amplificación del gen *mcr-1* por PCR de punto final.

La mezcla de reacción se preparó con las condiciones descritas por Vila, A., *et al.* (2016) [34]. El volumen y concentración empleada para cada reactivo se indican en el Anexo 3. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L.

El tiempo y número de ciclos se realizaron siguiendo las condiciones indicadas por Liu, Y., *et al.* (2016) [33]: desnaturalización inicial por 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 s), alineamiento (45°C, 30 s) y extensión (72°C, 30 s). Finalmente, se llevó a cabo un paso de extensión final a 72°C por 5 min.

La visualización de los amplicones se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% utilizando TBE 1X como amortiguador de pH y teñido con bromuro de etidio al 0.5%. Los detalles de la preparación del TBE se indican en el Anexo 3. El tamaño esperado para el amplicón fue de 309 pb.

5.7. Estandarización de la amplificación del gen *mgrB* por PCR de punto final.

El volumen y concentración de cada reactivo para la preparación de la mezcla de reacción se determinó basándose en las condiciones del gen *mcr-1*. Estos datos se indican en el Anexo 3. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L. Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos (Figura 8), el primer par (*mgrB_ext*) con el objetivo de amplificar la región del marco abierto de lectura (ORF) más regiones colindantes. El segundo par empleado (*mgrB_int*) se utilizó en caso de que no se observará algún producto amplificado con el par de oligonucleótidos *mgrB_ext*.

El tiempo y número de ciclos se realizaron siguiendo las condiciones indicadas por Cannatelli, A., *et al.* (2014):

mgrB_ext: desnaturalización inicial por 3 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización (95°C, 30 s), alineamiento (54°C, 30 s) y extensión (72°C, 105 s). Finalmente, un paso de extensión final a 72°C por 5 min.

mgrB_int: desnaturalización inicial por 3 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización (95°C, 30 s), alineamiento (54°C, 30 s) y extensión (72°C, 60 s). Finalmente, un paso de extensión final a 72°C por 5 min.

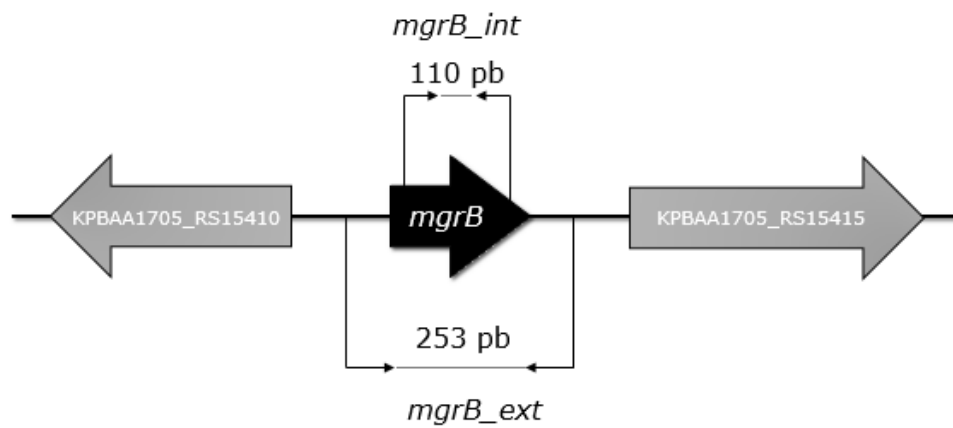


Figura 8. Mapa de la región cromosómica portadora del gen *mgrB* en *K. pneumoniae*. (Modificado de Cannatelli, A., *et al.* (2014) [33]. El mapa está basado en la secuencia del cromosoma de *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (No. de acceso de GenBank [NZ_AOGQ01000017.1](#)). Los genes *KPBA1705_RS15410* y *KPBA1705_RS15415* codifican para las proteínas YobH y YebO respectivamente. Las flechas indican la dirección de replicación de cada gen; pb, pares de bases.

La visualización de los amplicones se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% utilizando TBE 1X como amortiguador de pH y teñido con bromuro de etidio al 0.5%. El tamaño esperado para cada amplicón fue de 253 pb para la región externa y 110 pb para la región interna.

5.8. Secuenciación y análisis de secuencias del gen *mgrB*

Los productos de PCR de la amplificación de la región externa del gen *mgrB* de los 39 aislamientos CRK-colR, así como el control positivo *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 fueron enviados al Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LaNaBio) de la UNAM para su secuenciación por el método de Sanger.

Una vez recibidos los resultados de la secuenciación, estos fueron analizados empleando diversos programas y herramientas bioinformáticas. Se utilizaron los programas *Chromas* v2.6.6, *Unipro UGENE* v48.1, *Finch TV* 1.4.0 y *Jalview* v2.11.2.7 para el curado de las secuencias, alineamiento con las secuencias de referencia (Anexo 3) y obtención de una secuencia consenso de ADN para la comparación posterior con la base de datos *ISFinder* [35] en busca de secuencias de inserción. Además, la secuencia consenso se utilizó para obtener la secuencia de aminoácidos en busca de mutaciones no silenciosas con la herramienta *blastx* del NCBI [36].

6. RESULTADOS

6.2. Identificación y fenotipo de resistencia de los aislamientos de *Klebsiella* spp.

Con el uso del equipo VITEK-2 se realizó la identificación inicial de los 39 aislamientos de *Klebsiella* spp. (Figura 9), teniendo dos especies diferentes: *K. pneumoniae* en 34 aislamientos y *K. oxytoca* en 4 casos. Únicamente 1 aislamiento fue identificado finalmente como *K. variicola* por MALDI-TOF (identificado como *K. pneumoniae* por VITEK-2 inicialmente).

Considerando los aislamientos con una CMI ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ como resistentes (CLSI 2023), la CMI de colistina para los aislamientos tuvo un intervalo de 4 a 64 $\mu\text{g/mL}$. Su distribución en el intervalo de concentraciones empleadas en el ensayo de microdilución en caldo, así como los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ se muestran en la Tabla 2. Asimismo, el resultado para el control susceptible a colistina (*K. pneumoniae* ATCC BAA-1705) mostró una CMI=1 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 2. CMI de colistina de los aislamientos CRK-coIR

	Porcentaje acumulativo de los aislamientos con las siguientes concentraciones de colistina ($\mu\text{g/mL}$):						CMI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	CMI ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	4	8	16	32	64	>64		
No. de Aislamientos	11	3	4	8	8	5	32	>64
% de aislamientos	28.2	35.9	46.2	66.7	87.2	100		

Con los resultados anteriores, en conjunto con los obtenidos previamente por el equipo VITEK-2 se obtuvo la clasificación de resistencia para todos los aislamientos, siguiendo las definiciones y criterios propuestos por Magiorakos, et al. (2012) (Figura 9).

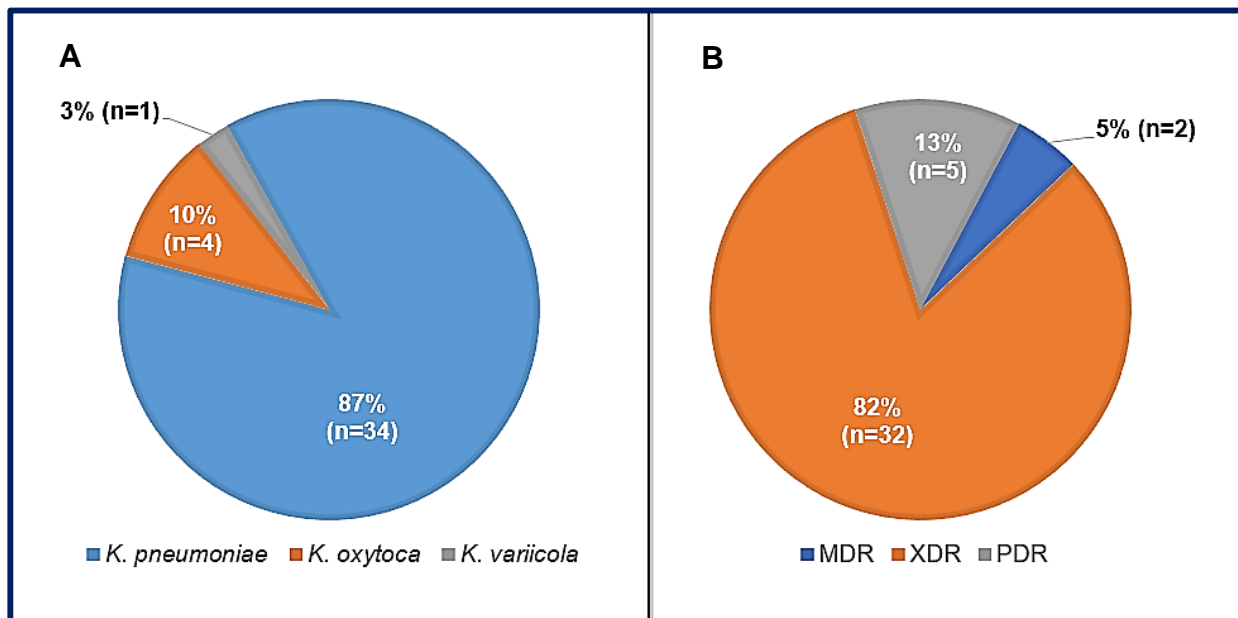


Figura 9. **A:** Distribución de los aislamientos de *Klebsiella* spp. según la especie identificada por el sistema semiautomatizado VITEK-2 y MALDI-TOF. **B:** Clasificación del fenotipo de resistencia encontrado en los aislamientos CRK-coIR. MDR, multidrogorresistente; XDR, extensamente resistente; PDR, pandrogo resistente.

6.3. Estandarización e identificación del gen *mcr-1* por PCR de punto final

La estandarización en la amplificación del gen *mcr-1* resultó correcta al observar una única banda con el tamaño esperado para el control positivo (Figura 10).

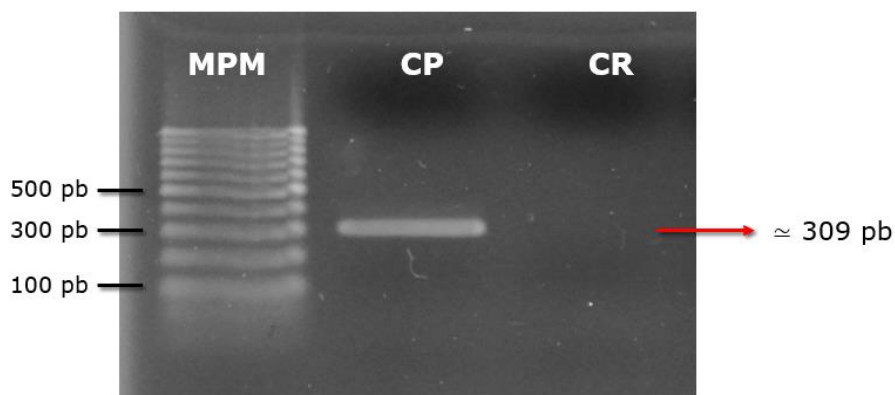


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la estandarización para la amplificación del gen *mcr-1* por PCR en *Klebsiella* spp. MPM, marcador de peso molecular; CP, Control Positivo (*E. coli* NCTC 13846); CR, Control de Reactivos; pb, pares de bases.

La amplificación del gen *mcr-1* para los 39 aislamientos estudiados resultó negativa ya que al realizar la electroforesis no se observó ningún amplicón con el tamaño esperado.

6.4. Estandarización e identificación del gen *mgrB* por PCR de punto final

La estandarización en la amplificación del gen *mgrB* resultó correcta ya que se observa una banda de ≈ 253 pb (Figura 11) utilizando los oligonucleótidos externos (*mgrB_ext*) y una banda de ≈ 110 pb con los oligonucleótidos internos (*mgrB_int*) para el control positivo en ambos casos.

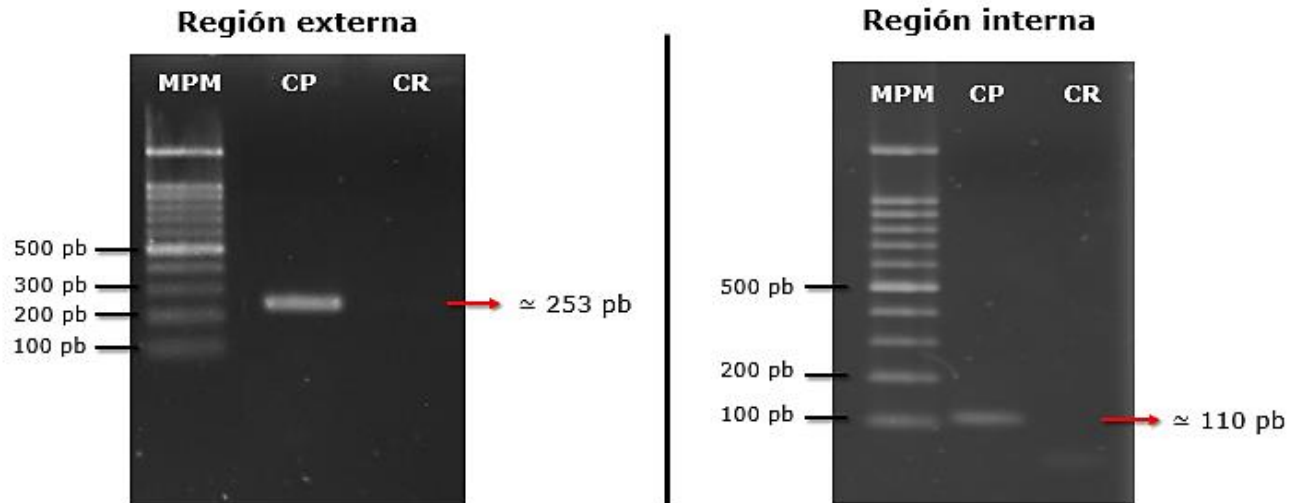


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la estandarización para la amplificación del gen *mgrB* por PCR de punto final. MPM, Marcador de peso molecular; CP, Control Positivo (*K. pneumoniae* ATCC BAA-1705); CR, Control de Reactivos; pb, pares de bases.

Respecto a los 39 aislamientos CRK-coIR, utilizando los oligonucleótidos externos se obtuvo un amplicón de ≈ 253 pb para 32 aislamientos. De los 7 aislamientos restantes, se obtuvo un amplicón mayor a 1000 pb en 6 de ellos. El aislamiento restante resultó negativo en la PCR con estos oligonucleótidos (Figura 12). Sin embargo, la amplificación con los oligonucleótidos internos (*mgrB_int*) fue positiva para este último aislamiento, confirmando la existencia de secuencias de nucleótidos del gen *mgrB* al observarse un amplicón de ≈ 110 pb (Figura 13).

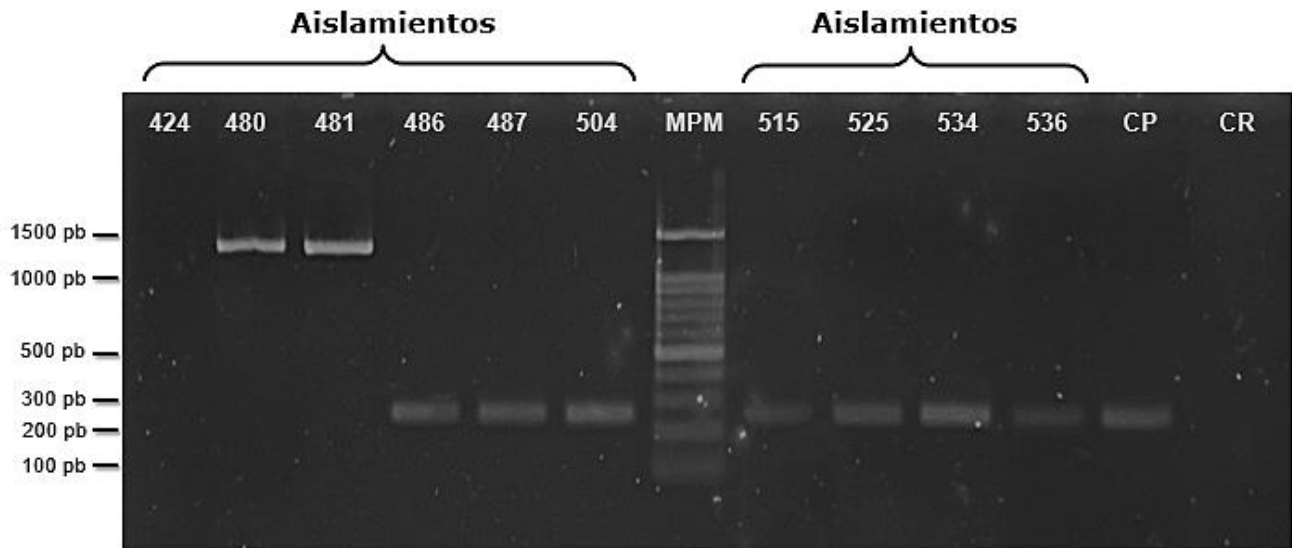


Figura 12. Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la amplificación del gen *mgrB* por PCR con los oligonucleótidos *mgrB_ext* para 10 aislamientos de *Klebsiella* spp. MPM, Marcador de peso molecular; CP, Control Positivo (*K. pneumoniae* ATCC BAA-1705); CR, Control de Reactivos; pb, pares de bases.

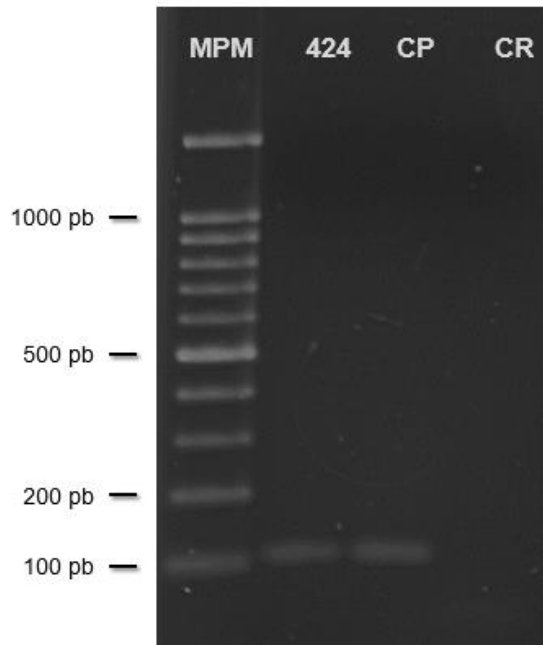


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la amplificación del gen *mgrB* por PCR con los oligonucleótidos *mgrB_int* para el aislamiento 424. MPM, Marcador de peso molecular; CP, Control Positivo (*K. pneumoniae* ATCC BAA-1705); CR, Control de Reactivos; pb, pares de bases.

6.5. Alteraciones encontradas en el gen *mgrB*

Al realizar el análisis de secuencias, se encontró en 21 aislamientos (53.8%) un tipo de mutación (Tabla 3), mientras que en 17 (43.6%) no se observó ninguna diferencia en la secuencia de nucleótidos en comparación con la cepa de referencia, es decir, la secuencia de nucleótidos resultó ser tipo silvestre.

De los 21 aislamientos que presentan alguna mutación en la secuencia del gen, 15 tuvieron una mutación puntual no silenciosa: en 11 se observó una mutación sin sentido en el nucleótido 88 (c.88C>T) que cambia el ORF de “CAG” a “TAG” (Figura 15), lo cual resulta en una proteína trunca de 29 aminoácidos (p.Q30*).

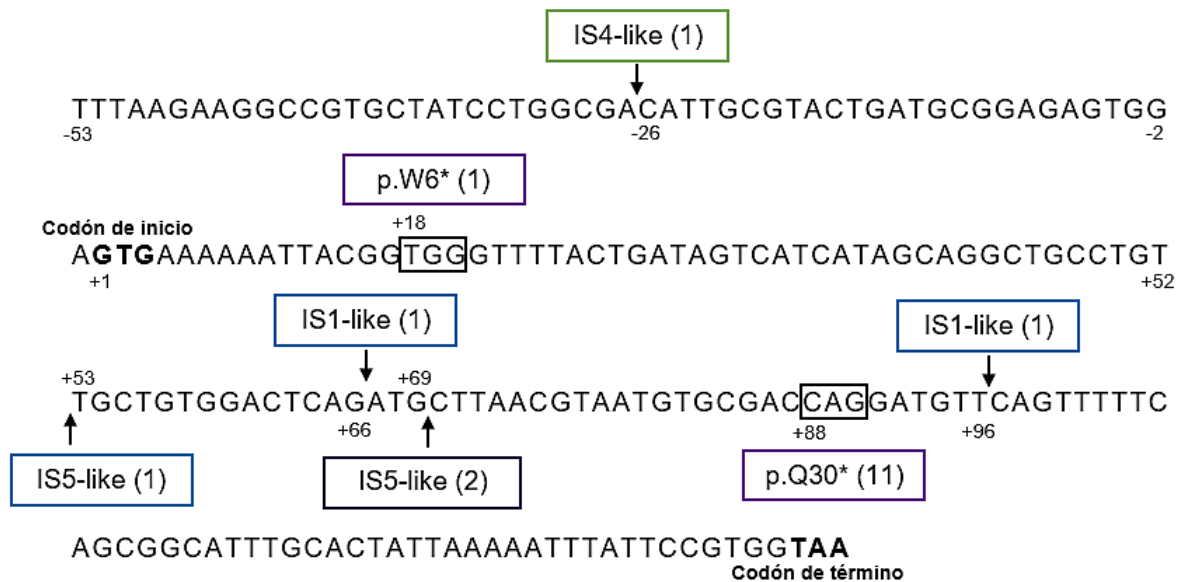


Figura 14. Alteraciones en el gen *mgrB* mediadas por IS o mutaciones puntuales en los aislamientos de *K. pneumoniae* (número de aislamientos). Los sitios de inserción se indican con flechas. Encerrados en rectángulos negros se indican los codones que tienen un cambio de nucleótido y en negritas los codones de inicio y término.

En 3 aislamientos de *K. oxytoca* se identificó una mutación de sentido erróneo en el nucleótido 136 (c.136C>A) que cambia el ORF de “CCC” a “ACC” (Figura 15), teniendo un cambio de aminoácido de prolina por treonina (p.P46T) y en un aislamiento se encontró una mutación sin sentido en el nucleótido 18 (c.18G>A) que cambia el ORF de “TGG” a “TGA”, resultando en una proteína trunca de 5 aminoácidos (p.W6*).

Codón de inicio
GTGAAAAAATTACGCTGGGTTTTGCTGATAGTCATCATCGCAGGTTGTTTACTG
 +1
 CTATGGACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGATCAGGATGTACAGTTCTTCAG
 CGGCATCTGCACTATCAATAAATTTATT**CCC**TGGTAA
 +136 **Codón de término**
 p.P46T (3)

Figura 15. Alteración por mutación puntual en el gen *mgrB* en los aislamientos de *K. oxytoca*. Encerrado en un rectángulo negro se indica el codón que tiene un cambio de nucleótido y en negritas los codones de inicio y término.

Tabla 3. Comparación de los 21 aislamientos CRK-colR con mutaciones en la secuencia del gen *mgrB*

Aislamiento	Institución de origen	Especie	Tipo de mutación	CMI (µg/mL)	Fenotipo de resistencia
428	HCG	<i>K. pneumoniae</i>	p.Q30*	>64	XDR
542	INNN	<i>K. pneumoniae</i>	p.Q30*	64	XDR
544	INNN	<i>K. pneumoniae</i>	p.Q30*	32	XDR
545	INNN	<i>K. pneumoniae</i>	p.Q30*	32	XDR
547	INNN	<i>K. pneumoniae</i>	p.Q30*	64	XDR
549	INNN	<i>K. pneumoniae</i>	p.Q30*	64	XDR
555	INNN	<i>K. pneumoniae</i>	p.Q30*	64	XDR
574	INNN	<i>K. pneumoniae</i>	p.Q30*	8	XDR
599	INNN	<i>K. pneumoniae</i>	p.Q30*	32	XDR
601	INNN	<i>K. pneumoniae</i>	p.Q30*	32	XDR
603	INNN	<i>K. pneumoniae</i>	p.Q30*	32	XDR
592	INNN	<i>K. pneumoniae</i>	p.W6*	4	PDR
469	INNN	<i>K. oxytoca</i>	p.P46T	16	XDR
470	INNN	<i>K. oxytoca</i>	p.P46T	16	XDR
473	INNN	<i>K. oxytoca</i>	p.P46T	16	XDR
176	INR	<i>K. pneumoniae</i>	IS1-like	16	PDR
554	INNN	<i>K. pneumoniae</i>	IS1-like	32	PDR
416	UMAE	<i>K. pneumoniae</i>	IS4-like	32	PDR
480	UMAE	<i>K. pneumoniae</i>	IS903B-like	>64	XDR
481	UMAE	<i>K. pneumoniae</i>	IS903B-like	>64	XDR
498	INNN	<i>K. pneumoniae</i>	IS5-like	64	XDR

HGC, Hospital Civil de Guadalajara; INNN, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía; UMAE, Unidad Médica de Alta Especialidad de Pediatría; INR, Instituto Nacional de Rehabilitación; XDR, Extensamente resistente; PDR, Pandrogo resistente.

En los 6 aislamientos restantes se hallaron secuencias ajenas al gen *mgrB*. Al realizar un alineamiento local en la base de datos IS Finder, se determinó que estos aislamientos presentaban una *secuencia de inserción* (IS) de las familias IS1, IS4 e IS5 con una similitud $\geq 95\%$ respecto a las IS de la base de datos. Cabe aclarar que, debido a esta similitud, las IS fueron nombradas sin asignarle una isoforma y considerando sólo la familia a la que pertenecen. Los detalles de cada IS se encuentran en la Tabla 4. Además, los elementos de inserción muestran diferentes sitios de interrupción de la secuencia del gen (Figura 14).

Tabla 4. Características de las secuencias de inserción encontradas en este estudio

Especie	IS	Familia	Isoforma	Similitud (%)	Longitud (pb)	Especie de origen
<i>K. pneumoniae</i>	IS1-like	IS1	IS1X2	96	768	<i>E. coli</i>
<i>K. pneumoniae</i>	IS1-like		IS1R	99	768	<i>E. coli</i>
<i>K. pneumoniae</i>	IS4-like	IS4	IS10R	99	1329	<i>S. typhimurium</i>
<i>K. pneumoniae</i>	IS5-like	IS5	IS903B	95	1057	<i>E. coli</i>
<i>K. pneumoniae</i>	IS5-like		ISKpn74	99	1056	<i>K. pneumoniae</i>

IS, Secuencia de Inserción; pb, pares de bases.

7. DISCUSIÓN

En los 39 aislamientos CRK-colR puede observarse que su origen biológico, así como la edad de los pacientes tienen una amplia diversidad. Esto es principalmente debido a la institución de origen, ya que en cada una se reciben a distintos tipos de pacientes para la atención de diversas enfermedades. Por ejemplo, el 67% (n=26) de los aislamientos provienen del INNN, la secreción respiratoria y la orina son las muestras más comunes, 15 aislamientos para el primer tipo de muestra y 6 para el segundo. Esto se relaciona a pacientes con condiciones crónicas que necesitan dispositivos médicos para su atención y manejo (cánulas de traqueostomía y sonda urinaria).

En este estudio, la especie predominante fue *K. pneumoniae* con un 87% (n=34), mientras que el 10% (n=4) corresponde a *K. oxytoca* y sólo el 3% (n=1) a *K. variicola*, mostrando una tendencia ya conocida, debido a que *K. pneumoniae* tiene una alta prevalencia en aislamientos clínicos, además se muestra como *K. oxytoca* y *K. variicola* son patógenos emergentes al representar en conjunto un bajo porcentaje del total de aislamientos [13, 37].

En cuanto a los valores de CMI de la Tabla 2, se observa que existe un amplio rango de concentraciones que varía desde 4 µg/mL a > 64 µg/mL, con una CMI₅₀ = 32 µg/mL y una CMI₉₀ > 64 µg/mL. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en otros estudios, en donde el rango de CMI para aislamientos con o sin mutaciones en el gen *mgrB* es el mismo [34, 38, 39] e incluso este rango puede ser más amplio, desde 4 µg/mL a > 256 µg/mL [40, 41]. Además, en dos de estos trabajos se informaron valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ similares a las determinadas en este estudio, a saber, CMI₅₀ = 16 y 64 µg/mL, y CMI₉₀ = 32 y > 128 µg/mL, demostrando que existen una amplia diversidad y nivel de significancia en cuanto a la CMI de colistina en aislamientos CRK de origen clínico en varias partes del mundo [34, 41].

La clasificación del fenotipo de resistencia es utilizada para definir a los microorganismos que son resistentes a un número significativo de medicamentos terapéuticamente activos [7]. Los resultados revelaron que el 82% (n=32) de los aislamientos CRK-colR son XDR, seguido del fenotipo PDR con un 13% (n=5) y solamente el 5% (n=2) resultó MDR (Figura 9).

Curiosamente, obtener 2 aislamientos MDR contrasta con la idea de que las cepas por ser resistentes a carbapenémicos y colistina, podrían llegar a ser XDR e incluso PDR. Sin

embargo, esto puede indicar que la resistencia a colistina pudo haber evolucionado de forma independiente en los pacientes por tener una exposición previa al fármaco o haber surgido debido a la resistencia cruzada entre la colistina y los péptidos antimicrobianos catiónicos del hospedero [30].

Por otro lado, el surgimiento de cepas de *Klebsiella* spp. XDR es preocupante por sí mismo cuando se considera su resistencia a los carbapenémicos, uno de los grupos de antibióticos de mayor uso en los hospitales de nuestro país [22], limitando las opciones terapéuticas para los pacientes infectados por estos patógenos, además de contribuir a la alta incidencia de IAAS y pobres resultados en el tratamiento [6, 24]. El problema se agrava en los 5 aislamientos clasificados como PDR ya que no se cuentan con más opciones terapéuticas considerando los antibióticos evaluados en este estudio.

Desde el 2015, cuando se encontraron cepas de *E. coli* portadoras del gen *mcr-1*, se consideró la posibilidad de que la resistencia a colistina fuera posible por medio de la transferencia horizontal de este determinante genético. Esto es preocupante sobre todo porque a través de la conjugación puede ser posible la diseminación de variantes del gen *mcr* entre BGN como *Klebsiella* sp. [33].

En el presente estudio no se encontró la variante *mcr-1* en ninguno de los 39 aislados CRK-colR por medio de PCR. Sin embargo, a nivel mundial, los estudios en los que se ha encontrado el gen *mcr-1* y sus variantes se centran en el continente asiático, específicamente en China. En un estudio en el que se incluyeron 47 países de los cinco continentes, se investigó la presencia de genes tipo *mcr* en 15 géneros bacterianos, de los cuales 11 pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae*. Se reportó que *E. coli*, seguido de *Salmonella* sp., y *Klebsiella* sp. son las bacterias portadoras más comunes. A partir de 112,649 aislamientos se identificaron genes *mcr* en 5,191 (4.6% del total). Las cepas provenían principalmente de muestras de animales (53%, n=2696) y origen clínico (39%, n=2068), y en menor medida a partir de muestras ambientales y de alimentos (8%, n=330). De estas 5,191 cepas, la variante *mcr-1* fue identificada como la más común en 4,917 (95%), y el resto de variantes *mcr* en 274 (5%) aislamientos. En lo que respecta al género *Klebsiella*, de las 4,917 cepas portadoras del gen *mcr-1*, 133 (2.7%) pertenecían a *Klebsiella* spp.; 126 fueron identificadas como *K. pneumoniae*, 4 cepas como *K. oxytoca* y 3 como *K. variicola*. Los resultados de este estudio muestran que la variante *mcr-1* se identifica frecuentemente a partir

de muestras animales y principalmente en la especie *E. coli* (93.5%), permitiendo observar que las cepas de *Klebsiella* spp. portadoras de genes tipo *mcr* son poco comunes [42].

Considerando sólo al continente americano el panorama es similar al resto del mundo. Existen múltiples estudios que identifican genes *mcr* en enterobacterias, en los cuales la variante *mcr-1* se ha encontrado como la más común. En México se ha reportado la presencia de *mcr-1* únicamente en cepas de *E. coli* de origen animal en 2018, y en el 2019 a partir de una muestra de materia fecal de un infante hospitalizado [25].

En el resto de América se ha encontrado el gen *mcr-1* en cepas de *K. pneumoniae* en Brasil, Colombia, Perú, E.U.A y Paraguay. En *K. oxytoca* se ha observado la presencia de esta variante sólo en Perú. En lo que respecta al resto de variantes de genes *mcr*, en *K. pneumoniae* se han encontrado la *mcr-3*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9* y *mcr-10*. La variante *mcr-9* parece ser la más frecuente en el continente americano ya que se ha reportado en países como Argentina, Brasil, Canadá, E.U.A. y México. En *K. oxytoca* se ha detectado la presencia de *mcr-9* y *mcr-10* [25].

Las razones por las cuales se ha incrementado los reportes a nivel mundial pueden ser el uso prolongado de las polimixinas en medicina veterinaria en países como China, Reino Unido, España e Italia, así como el sobre uso de la colistina en medicina humana para el tratamiento de infecciones por patógenos altamente resistentes [42].

Por otra parte, de los 39 aislamientos CRK-coIR en este estudio, el 53.8% (n=21) presentan algún tipo de mutación en la secuencia del gen *mgrB*. Estos resultados son similares a los encontrados en dos investigaciones en donde observaron que las cepas CRKp tenían alteraciones en el gen *mgrB* en 59% (n=33) [34] y 65% (n=32) [43] de los aislamientos. En otros estudios el porcentaje ha sido incluso mayor (85%) [40, 44, 45], sugiriendo que el mecanismo de resistencia adquirida a colistina en *Klebsiella* spp. de origen clínico está basado principalmente en la inactivación del gen *mgrB* mediante la interrupción de la secuencia por una IS, mutaciones de sentido erróneo o por mutaciones sin sentido que conducen a codones de paro [24, 26, 45]. Además, se cree que este mecanismo de resistencia pudo surgir y diseminarse mundialmente como resultado de un fenómeno natural debido al movimiento de secuencias de inserción dentro de genomas y plásmidos bacterianos [30].

La mutación sin sentido c.88C>T (p.Q30*) hallada en 11 aislamientos de *K. pneumoniae* (28.2%, N=39) ha sido reportada previamente en diferentes estudios de Asia, Europa y América [39, 40, 43, 45 - 51], mientras que la mutación sin sentido c.18G>A (p.W6*) encontrada en 1 aislamiento de *K. pneumoniae* y la mutación de sentido erróneo c.136C>A (p.P46T) en 3 aislamientos de *K. oxytoca* no se han reportado previamente. Además, se han localizado otras alteraciones en el nucleótido número 88, a saber, p.Q30R [39, 48] y una secuencia repetida de 80 nucleótidos que inicia en este sitio [52]. Estos hallazgos sugieren que la posición +88 en el gen *mgrB* es una región crítica, propensa a mutar y desencadenar la resistencia a la colistina [47]. En lo que respecta a la especie *K. variicola*, la secuencia del gen *mgrB* resultó ser tipo silvestre. Esta especie ha sido poco estudiada, sin embargo, en una investigación se encontró una alteración por delección de una citosina en la posición +93 del gen *mgrB*, demostrando que sí puede presentarse alguna alteración en este determinante genético y ser responsable de la resistencia a colistina en *K. variicola* [53].

En diferentes investigaciones sobre las alteraciones en el gen *mgrB* en cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* productoras de BLEEs y carbapenemasas se ha observado que las secuencias de inserción juegan un papel fundamental en la resistencia a la colistina. Las IS son elementos genéticos móviles pequeños de aproximadamente 0.7 a 2.5 kpb que se encuentran en la mayoría de los genomas bacterianos, incluido el género *Klebsiella*, particularmente *K. pneumoniae* representa la especie que frecuentemente alberga elementos de inserción. Se cree que estos elementos son esenciales para la evolución adaptativa de las bacterias al promover la diversidad genética [29, 54].

Las IS que se encuentran con mayor frecuencia son la IS1-like, IS1F, ISKpn14, IS903B, IS10R e IS5-like. Asimismo, los elementos de la familia IS5 parecen ser los más comunes en todo el mundo debido a los múltiples reportes en Europa, Asia y América [26, 29, 30, 44, 45, 47]. Estos antecedentes concuerdan con los datos de la presente investigación, ya que en 3 de los 6 aislamientos CRK-colR se encontraba un elemento perteneciente a la familia IS5; 2 de estos 3 aislamientos contienen la isoforma IS903B (IS5-like) en la posición +69, la cual ya ha sido reportada previamente [46, 55], en el aislamiento restante se encontró la isoforma ISKpn74 (IS5-like) en la posición +52, la cual no ha sido reportada con anterioridad, sin embargo, cabe la posibilidad de que en otros estudios se encuentre reportada como IS5-like sin especificar la isoforma [39, 45, 47, 52, 56 - 58]. De forma similar, podría ocurrir lo mismo para la IS1X2 (IS1-like) en la posición +96, ya que existen reportes únicamente como IS1-like

[38, 44, 47, 58]. Respecto a las IS restantes, IS10R (IS4-like) e IS1R (IS1-like), ya han sido reportadas [41, 43, 45, 50].

Los cinco tipos de IS halladas tienen distintos sitios de inserción, sin embargo, parece ser que como ocurre con la mutación puntual p.Q30*, puede que las IS tengan regiones más propensas para su inserción dentro del gen, debido a que se ha observado que en el segundo tercio de la secuencia de nucleótidos (+48 a +96), frecuentemente se reportan IS interrumpiendo la secuencia del gen en esta región [39, 40, 43 - 45, 52, 55, 56, 59].

Asimismo, en el aislamiento 424, la amplificación con los oligonucleótidos externos del gen *mgrB* resultó negativa (Figura 12), sin embargo, la amplificación con los oligonucleótidos internos resultó positiva (Figura 13). Este resultado sugiere que existe una mutación puntual o la interrupción de la secuencia por una IS en el sitio de unión de los oligonucleótidos externos con la secuencia del gen, resultando en el silenciamiento genético del gen *mgrB* y consecuentemente la disminución en la expresión de la proteína MgrB, sin embargo, se necesitan más estudios para probar esta hipótesis [45, 47].

En México, la información acerca de mutaciones en el gen *mgrB* relacionadas con la resistencia a colistina en cepas de *Klebsiella* spp. es escasa. Únicamente existe una publicación que informa el hallazgo en otros estudios acerca de mutaciones por el cambio del marco de lectura (frameshift), mutaciones por deleción e interrupciones de la secuencia codificante debido a elementos de inserción, sin embargo, no se especifica el tipo de IS ni posición del nucleótido que sufre tal cambio [25].

Sin embargo, el gen *mgrB* no es el único determinante genético en el que se han encontrado mutaciones responsables de la resistencia a la colistina. En un estudio del 2022 se realizó una investigación a nivel mundial sobre la prevalencia de las mutaciones en genes cromosómicos y el gen *mcr-1* en aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a colistina. La mayoría de las mutaciones se pudieron observar en el gen *mgrB*, pero también en los genes *pmrB*, *phoQ* y *pmrA* [29]. Asimismo, en *K. variicola* sólo se han hallado mutaciones en el gen *phoQ* [53, 60].

Por otra parte, al realizar una comparación de los aislamientos con mutaciones en *mgrB* con respecto a la CMI y el fenotipo de resistencia determinados (Tabla 3), se observa que no existe una relación clara entre estos factores y el tipo de mutación encontrada, ya que los

aislamientos presentan un amplio rango de CMI (4 a >64 µg/mL). Las diferencias en los valores de CMI entre los aislamientos con las mismas alteraciones genéticas pueden ser atribuidas a alteraciones en otros loci o involucrar otros mecanismos de resistencia como el incremento del LPS capsular, bombas de eflujo o mutaciones en otros genes reguladores [38, 39, 47]. Curiosamente, los 3 aislamientos de *K. oxytoca* que presentan el mismo tipo de mutación (p.P46T), también provienen de la misma institución y tienen el mismo valor de CMI, así como el mismo fenotipo de resistencia; esto podría ser atribuido a que las cepas tengan el mismo origen clonal y se haya diseminado dentro de la institución, sin embargo, se necesitan más estudios para obtener la evidencia suficiente que compruebe esta hipótesis.

8. CONCLUSIONES

La CMI de los 39 aislamientos CRK-colR tuvo un amplio rango que varía desde 4 hasta >64 µg/mL, demostrando la amplia diversidad existente entre estas cepas. Además, los resultados del fenotipo de resistencia muestran la importancia que tienen *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *K. variicola* en el entorno clínico, por lo que un entendimiento de los fenómenos relacionados al surgimiento de cepas MDR y XDR es crucial para evitar el desarrollo de cepas PDR.

En la búsqueda del mecanismo molecular responsable de la resistencia a la colistina, se obtuvo un resultado negativo en la amplificación por PCR del gen *mcr-1*, por lo que encontrar cepas que porten este determinante genético sigue siendo un hecho esporádico.

Por otra parte, el mecanismo de resistencia a colistina en 21 aislamientos CRK-colR (53.8%) puede ser atribuido a mutaciones en el gen *mgrB*, ya sean mutaciones puntuales o secuencias de inserción que interrumpen la secuencia nativa del gen, apoyando la hipótesis de que el principal mecanismo molecular de resistencia a colistina en cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* es debido a alguna alteración en la secuencia del gen *mgrB*. Por lo tanto, es crucial la vigilancia epidemiológica para mantenerse actualizado sobre las mutaciones en este determinante genético, sobre todo, de los elementos móviles en *K. pneumoniae*, lo que podría detener la propagación de la resistencia a la colistina y reducir el riesgo de fracaso en el tratamiento terapéutico.

9. PERSPECTIVAS

En los 17 aislamientos que no se encontró ninguna alteración en la secuencia del gen *mgrB* ni la presencia del gen *mcr-1*, el mecanismo de resistencia a colistina puede estar relacionado con mutaciones en otros genes cromosómicos, la adquisición de variantes de genes tipo *mcr* o una alteración en la región del promotor del gen *mgrB*.

Por lo tanto, se propone la búsqueda de los genes *mcr-3*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9* y *mcr-10* en los 15 aislamientos de *K. pneumoniae*, y de los genes *mcr-9* y *mcr-10* en el aislamiento de *K. oxytoca*, así como la búsqueda de alguna mutación en los genes cromosómicos *pmrB*, *phoQ* y *pmrA* para ambas especies. Mientras que para el aislamiento identificado como *K. variicola*, la búsqueda de una mutación en el gen *phoQ*.

En el aislamiento 424, en el cual la amplificación con los oligonucleótidos externos del gen *mgrB* resultó negativa, pero con los oligonucleótidos internos resultó positiva, es posible evaluar una mutación puntual o la interrupción de la secuencia por una IS en el sitio de unión de los oligonucleótidos externos con la secuencia del gen.

Por último, se puede investigar los mecanismos de resistencia a colistina en otras especies de enterobacterias distintas al género *Klebsiella*.

10. REFERENCIAS

- [1]. Etebu, E. & Ariekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 4, 90-101. https://www.researchgate.net/publication/319881509_Antibiotics_Classification_and_mechanisms_of_action_with_emphasis_on_molecular_perspectives
- [2]. Darby, E., et al. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature reviews. Microbiology*, 21(5), 280–295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
- [3]. Hutchings, M., et al. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- [4]. Pulingam, T., et al. (2022). Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 170, 106104. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106103>
- [5]. Christaki, E., et al. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of molecular evolution*, 88(1), 26–40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
- [6]. Bassetti, M., et al. (2017). Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. *Intensive care medicine*, 43(10), 1464–1475. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4878-x>
- [7]. Magiorakos, A., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- [8]. Blair, J., et al. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- [9]. Organización Mundial de la Salud (2017, 27 de febrero). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. [Comunicado de prensa]. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- [10]. Sosa, O., et al. (2019). Infecciones asociadas a la atención de la salud por bacterias del grupo eskape en un hospital de la Ciudad de México 2013-2017. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 39 (2): 59-64. Disponible en <https://www.amimc.org.mx/wp-content/uploads/2019/08/EIM2-2019w.pdf> (fecha de acceso: septiembre 2023).
- [11]. RHOVE (2022). *Panorama epidemiológico de las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS)*. Boletín Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud. México. Disponible en

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/770528/BOLET_NRHOVEAGOSTO2022_Final_21102022_1.pdf (fecha de acceso: septiembre 2023).

[12]. Giono, S., *et al.* (2020). Antimicrobial resistance. Its importance and efforts to control it. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta médica de México*, 156(2), 171–178. <https://doi.org/10.24875/GMM.M20000358>

[13]. Dong, N., *et al.* (2022). *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *EBioMedicine*, 79, 103998. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103998>

[14]. Wyres, K. & Holt, K. (2020). *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. *Trends in microbiology*, 24(12), 944–956. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.007>

[15]. Wang, G., *et al.* (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of environmental research and public health*, 17(17), 6278. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>

[16]. CDC (s. f.). *Antibiotic Resistance & Patient Safety Portal* [Base de datos]. Disponible en <https://arpsp.cdc.gov/profile/antibiotic-resistance?tab=antibiotic-resistance>

[17]. Breijyeh, Z., *et al.* (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(6), 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>

[18]. Wu, W., *et al.* (2019). NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clinical microbiology reviews*, 32(2), e00115-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00115-18>

[19]. Ayobami, O., *et al.* (2022). Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low- and lower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Emerging microbes & infections*, 11(1), 443–451. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2030196>

[20]. OPS (s. f.). *Resistencia antimicrobiana: Porcentajes de resistencia de patógenos seleccionados* [Base de datos]. Disponible en <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/resistencia-antimicrobiana/567-amr-vig-es.html>

[21]. Amabile, C. (2021). Antibiotic usage and resistance in Mexico: an update after a decade of change. *Journal of infection in developing countries*, 15(4), 442–449. <https://doi.org/10.3855/jidc.13467>

[22]. PUCRA (2023). UNAM, Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA). *Resistencia antimicrobiana en México 2017-2022*. Reporte de los hospitales de la Red PUCRA: Resistencia antimicrobiana y consumo de antibióticos. Disponible en: <http://www.puis.unam.mx/>

[23]. Garza, E., *et al.* (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PloS one*, 14(3), e0209865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209865>

- [24]. Andrade, F., *et al.* (2020). Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms*, 8(11), 1716. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111716>
- [25]. Rodríguez, J., *et al.* (2021). Polymyxin resistance in Enterobacterales: overview and epidemiology in the Americas. *International journal of antimicrobial agents*, 58(5), 106426. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106426>
- [26]. El-Sayed Ahmed, M., *et al.* (2020). Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerging microbes & infections*, 9(1), 868–885. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133>
- [27]. Stefaniuk, E., & Tyski, S. (2019). Colistin Resistance in Enterobacterales Strains - A Current View. *Polish journal of microbiology*, 68(4), 417–427. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-055>
- [28]. Sun, Z., & Palzkill, T. (2021). Deep Mutational Scanning Reveals the Active-Site Sequence Requirements for the Colistin Antibiotic Resistance Enzyme MCR-1. *mBio*, 12(6), e0277621. <https://doi.org/10.1128/mBio.02776-21>
- [29]. Yusof, N., *et al.* (2022). Prevalence of Mutated Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Tropical medicine and infectious disease*, 7(12), 414. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7120414>
- [30]. Olaitan, A., *et al.* (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 5, 643. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>
- [31]. CLSI (2023). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 33 ed. CLSI supplement M100. Table 3D. Test for Colistin Resistance for Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa*.
- [32]. Liu, Y., *et al.* (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet. Infectious diseases*, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- [33]. Cannatelli, A., *et al.* (2014). MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(10), 5696–5703. <https://doi.org/10.1128/AAC.03110-14>
- [34]. Vila, A., *et al.* (2016). Bacteremia due to *Escherichia coli* with the Plasmid-Mediated Colistin Resistance (COL-R) MCR-1 gene. *Open Forum Infectious Diseases*, 3(suppl_1). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw172.235>
- [35]. Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular (s.f.). ISFinder [Base de datos]. Disponible en <https://www-is.biotoul.fr/>
- [36]. National Center for Biotechnology Information. (s.f.). Translated BLAST: blastx [Herramienta bioinformática]. Disponible en

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

[37]. Stewart, J., *et al.* (2022). Epidemiology and genomic analysis of *Klebsiella oxytoca* from a single hospital network in Australia. *BMC Infect Dis* **22**, 704. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07687-7>

[38]. Khoshbayan, A., *et al.* (2022). Mutation in mgrB is the major colistin resistance mechanism in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Tehran, Iran. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 10.1556/030.2022.01679. Advance online publication. <https://doi.org/10.1556/030.2022.01679>

[39]. Olaitan, A., *et al.* (2014). Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. *International journal of antimicrobial agents*, *44*(6), 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.07.020>

[40]. Hamel, M., *et al.* (2020). Inactivation of mgrB gene regulator and resistance to colistin is becoming endemic in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Greece: A nationwide study from 2014 to 2017. *International journal of antimicrobial agents*, *55*(4), 105930. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105930>

[41]. Conceição, O., *et al.* (2022). Polymyxin Resistance in Clinical Isolates of *K. pneumoniae* in Brazil: Update on Molecular Mechanisms, Clonal Dissemination and Relationship With KPC-Producing Strains. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *12*, 898125. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.898125>

[42]. Elbediwi, L., *et al.* (2019). Global Burden of Colistin-Resistant Bacteria: Mobilized Colistin Resistance Genes Study (1980–2018). *Microorganisms*, *7*(10), 461. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms7100461>

[43]. Yang, T., *et al.* (2020). Contributions of insertion sequences conferring colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of antimicrobial agents*, *55*(3), 105894. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105894>

[44]. Shein, A., *et al.* (2022). High prevalence of mgrB-mediated colistin resistance among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* is associated with biofilm formation and can be overcome by colistin-EDTA combination therapy. *Scientific reports*, *12*(1), 12939. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17083-5>

[45]. Poirel, L., *et al.* (2015). The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *70*(1), 75–80. <https://doi.org/10.1093/jac/dku323>

[46]. Markovska, R., *et al.* (2022). Detection of different colistin resistance mechanisms among multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Bulgaria. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, *69*(3), 220–227. <https://doi.org/10.1556/030.2022.01746>

- [47]. Haeili, M., *et al.* (2017). MgrB Alterations Mediate Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Iran. *Frontiers in microbiology*, 8, 2470. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02470>
- [48]. Leung, L., *et al.* (2017). Structural modification of LPS in colistin-resistant, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 72(11), 3035–3042. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx234>
- [49]. Liu, X., *et al.* (2022). Emergence of colistin-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (CoR-HvKp) in China. *Emerging microbes & infections*, 11(1), 648–661. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2036078>
- [50]. Elias, R., *et al.* (2022). A phylogenomic approach for the analysis of colistin resistance-associated genes in *Klebsiella pneumoniae*, its mutational diversity and implications for phenotypic resistance. *International journal of antimicrobial agents*, 59(6), 106581. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106581>
- [51]. Rocha, V., *et al.* (2022). Prolonged Outbreak of Carbapenem and Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* at a Large Tertiary Hospital in Brazil. *Frontiers in microbiology*, 13, 831770. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.831770>
- [52]. da Silva, K., *et al.* (2020). Molecular and epidemiological surveillance of polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from Brazil with multiple mgrB gene mutations. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 310(7), 151448. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151448>
- [53]. Lenzi, M., *et al.* (2021). A new mutation in mgrb mediating polymyxin resistance in *Klebsiella variicola*. *International journal of antimicrobial agents*, 58(5), 106424. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106424>
- [54]. Fordham, S., *et al.* (2022). Prevalence of insertion sequence elements in plasmids relating to mgrB gene disruption causing colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *MicrobiologyOpen*, 11(1), e1262. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1262>
- [55]. da Silva, D., *et al.* (2021). Insertion sequences disrupting mgrB in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Journal of global antimicrobial resistance*, 24, 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.11.003>
- [56]. Cannatelli, A., *et al.* (2013). In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(11), 5521–5526. <https://doi.org/10.1128/AAC.01480-13>
- [57]. Longo, L., *et al.* (2019). Colistin resistance emerges in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Rio de Janeiro, Brazil. *International journal of antimicrobial agents*, 54(5), 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.08.017>
- [58]. Morales, F., *et al.* (2020). Colistin Heteroresistance among Extended Spectrum β -lactamases-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Microorganisms*, 8(9), 1279. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091279>

- [59]. Cienfuegos, A., *et al.* (2017). Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Mediated by Chromosomal Integration of Plasmid DNA. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(8), e00404-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00404-17>
- [60]. Lu, Y., *et al.* (2018). Occurrence of colistin-resistant hypervirulent *Klebsiella variicola*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(11), 3001–3004. <https://doi.org/10.1093/jac/dky301>
- [61]. de Araújo, L., *et al.* (2021). Emergence of *mgrB* locus deletion mediating polymyxin resistance in pandemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 lineage. *Journal of medical microbiology*, 70(3), 10.1099/jmm.0.001309. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001309>
- [62]. Garza, U., *et al.* (2021). *Klebsiella variicola* Reference Strain F2R9 (ATCC BAA-830) Genome Sequence. *Microbiology resource announcements*, 10(26), e0032921. <https://doi.org/10.1128/MRA.00329-21>
- [63]. Bouza, E., & Cercenado, E. (2002). *Klebsiella* and *Enterobacter*: antibiotic resistance and treatment implications. *Seminars in respiratory infections*, 17(3), 215–230. <https://doi.org/10.1053/srin.2002.34693>
- [64]. Motta, S., Cluzel, P., & Aldana, M. (2015). Adaptive resistance in bacteria requires epigenetic inheritance, genetic noise, and cost of efflux pumps. *PloS one*, 10(3), e0118464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118464>
- [65]. Pang, Z., *et al.* (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>

11. ANEXOS

Anexo 1. Identificación y determinación del perfil de resistencia/susceptibilidad antimicrobiana

- a) Preparación del inóculo bacteriano para la identificación y análisis de susceptibilidad antimicrobiana mediante el sistema automatizado VITEK-2

A partir de un cultivo puro de 24 h en agar MH, se preparó el inóculo del microorganismo al 0.5 de la escala de McFarland en 3 mL de solución salina estéril (SS) al 0.45% en un tubo de 12x75 mm para obtener una densidad aproximada de 1.5×10^8 UFC/mL. Posteriormente se transfirieron 145 μ L a otro tubo con 3 mL de SS. En el primer tubo se colocó la tarjeta de identificación microbiana para BGN y en el segundo tubo la tarjeta para el análisis de susceptibilidad antimicrobiana.

La tarjeta de susceptibilidad antimicrobiana que se empleó fue la AST-272 que cuenta con los antibióticos:

- Ampicilina/sulbactam
- Piperaciclina/tazobactam
- Cefoxitina
- Ceftazidima
- Ceftriaxona
- Cefepima
- Doripenem
- Ertapenem
- Imipenem
- Meropenem
- Amikacina
- Gentamicina
- Ciprofloxacino
- Tigeciclina
- Colistina*

* La resistencia/susceptibilidad fue determinada por medio de la microdilución/macrodilución en caldo ya que es el método de referencia según el CLSI [31].

Anexo 2. Descripción de los ensayos de microdilución y macrodilución en caldo para la determinación de la CMI de colistina

a) Preparación de las diluciones de colistina

Se partió de una concentración de 5120 µg/mL de colistina, de la cual se realizó una dilución 1:10 con 900 µL de CAMHB. Posteriormente se realizaron las diluciones del esquema de la Figura X.

En el caso de la macrodilución en caldo se utilizaron discos de papel impregnados con sulfato de colistina a una concentración de 10 µg/mL. Un disco fue resuspendido en 5 mL de CAMHB y se incubó durante 1 h a 35°C. Transcurrido el tiempo, se colocó 1 mL en un tubo de 12x75 mm en donde se adicionó el inóculo bacteriano.

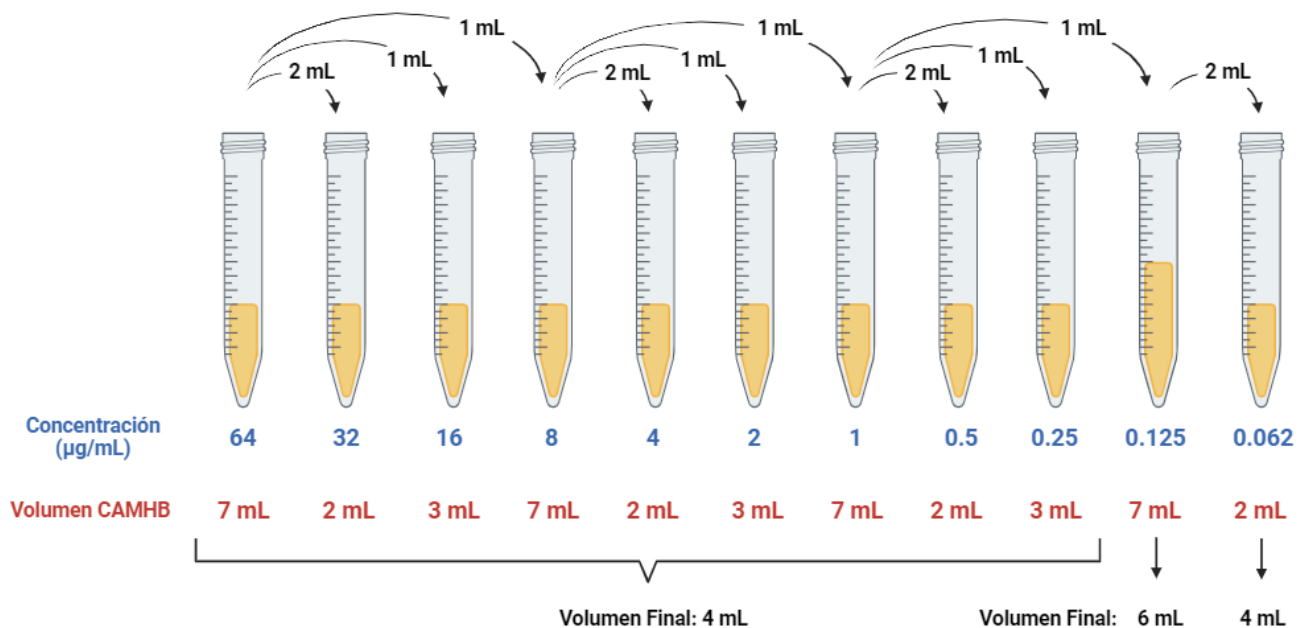


Figura 16. Esquema de la preparación de diluciones de colistina para el ensayo de microdilución en caldo. La concentración final de colistina se muestra en azul; el volumen agregado inicialmente de CAMHB se muestra en rojo.

b) Preparación del inóculo bacteriano para la determinación de la CMI a colistina

A partir de un cultivo puro de 24 h en agar MH, se preparó el inóculo del microorganismo al 0.5 de la escala de McFarland en 3 mL de SS al 0.9% en un tubo de 12x75 mm para obtener una densidad aproximada de 1.5×10^8 UFC/mL. Posteriormente se realizó una dilución 1:20 transfiriendo 100 μ L de la primera suspensión a otro tubo de 12x75 mm con 1.9 mL de SS para lograr una densidad aproximada de 7.5×10^6 UFC/mL. Este tubo se empleó para realizar la inoculación con 10 μ L en cada pocillo de la microplaca para la microdilución en caldo.

Para la macrodilución en caldo, a partir de la suspensión del microorganismo al 0.5 de McFarland, se tomaron 6.6 μ L y adicionaron al tubo de 12x75 mm con 1 mL de colistina ajustado a 2 μ g/mL. Con estas series de diluciones se logra una concentración final del inóculo de 7.5×10^5 UFC/mL [31].

Anexo 3. Protocolo para la detección de los genes *mcr-1* y *mgrB*.

a) Características de los oligonucleótidos

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Gen	Oligonucleótido	Secuencia 5' – 3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>mcr-1</i>	CLR'5-F	CGGTCAGTCCGTTTGTTTC	309	Liu, Y., <i>et al.</i> (2016)
	CLR'5-R	CTTGGTCGGTCTGTA GGG		
<i>mgrB</i>	mgrB_extF	AAGGCGTTCATTCTACCACC	253	Cannatelli, A., <i>et al.</i> (2014)
	mgrB_extR	TTAAGAAGGCCGTGCTATCC		
	mgrB_intF	CGGTGGGTTTTACTGATAGTCA	110	
	mgrB_intR	ATAGTGCAAATGCCGCTGA		

C, citosina; G, guanina; A, adenina; T, timina.

b) Preparación de la mezcla de reacción de PCR

Los volúmenes y concentraciones empleadas de cada reactivo se indican en la tabla X. El volumen total de 25 μ L es para una reacción de PCR. La mezcla de reacción para la amplificación del gen *mgrB* es la misma tanto para la región interna como la externa.

Tabla 6. Mezcla de reacción de PCR para amplificar los genes *mcr-1* y *mgrB*

Gen <i>mcr-1</i>		Gen <i>mgrB</i>	
Reactivo (concentración)	Volumen (μL)	Reactivo (concentración)	Volumen (μL)
Amortiguador (10X)	2.50	Amortiguador (10X)	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	0.75	MgCl ₂ (25 mM)	1.5
dNTPs (10 μM c/u)	0.50	dNTPs (10 μM c/u)	0.5
Oligonucleótido F (10 μM)	0.50	Oligonucleótido F (15 μM)	0.5
Oligonucleótido R (10 μM)	0.50	Oligonucleótido R (15 μM)	0.5
Taq polimerasa (5U/μL)	0.15	Taq polimerasa (5U/μL)	0.2
H ₂ O libre de nucleasas	17.10	H ₂ O libre de nucleasas	14.3
ADN (17-21 ng/μL)	3.00	ADN (17-21 ng/μL)	5.0
Volumen final	25.0 μL	Volumen final	25.0 μL

c) Preparación del amortiguador TBE 5X

Para la preparación de 500 mL de TBE 5X, se pesaron 27.0 g de tris base, 13.75 g de ácido bórico y se mezclaron con 10 mL de EDTA a un pH=8.0. Posteriormente se aforó a 500 mL y transfirió a un vaso de precipitados en donde, con agitación constante, se ajustó el pH a 8.3.

Anexo 4. Secuencias de referencia utilizadas en este estudio

La cepa control susceptible a colistina (*K. pneumoniae* ATCC BAA-1705) fue comparada previamente con la secuencia de referencia de la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700721 MGH78578 (No. de acceso de GenBank [CP000647.1](#)) [39, 40, 61] para establecer la correcta comparación entre los aislamientos identificados como *K. pneumoniae* y la cepa control susceptible a colistina. Además, se emplearon las secuencias de referencia de las cepas susceptibles a colistina *K. oxytoca* KCTC 1686 (No. de acceso de GenBank [CP003218.1](#)) [39] y *K. variicola* ATCC BAA-830 (No. de acceso de GenBank [CP072130.1](#)) [62] para la comparación de las secuencias de los aislamientos identificados como *K. oxytoca* y *K. variicola* respectivamente.