



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ



Identificación molecular de genes productores de β -lactamasas en cepas de *Escherichia coli* provenientes de muestras clínicas de neonatos del Hospital Infantil de México, Federico Gómez.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

SHARONE GARDUÑO GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. EN C. LETICIA VERÓNICA JIMÉNEZ ROJAS

ASESOR DE TESIS: M. EN C. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO 2018.





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.

DIRECTOR DE TESIS

DRA. EN C. LETICIA VERÓNICA JIMÉNEZ ROJAS

INVESTIGADORA DEL DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA, ÁREA DE
BACTERIOLOGÍA EN EL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO, FEDERICO GÓMEZ.

ASESOR

M. EN C. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ

PROFESOR DE TIEMPO COMPLETO EN LA FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA.

Agradecimientos

A la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**, por brindarme los pilares básicos de mi educación y formación como Químico Farmacéutico Biólogo.

Al **Hospital Infantil de México, Federico Gómez**, por prestar sus instalaciones y dar financiamiento para el proyecto de investigación de mi directora de tesis.

A mi directora de tesis, **Dra. en C. Leticia Verónica Jiménez Rojas**, por su apoyo y guía en este proyecto y por darme la oportunidad de trabajar con ella.

A mi profesora, **Dra. Guillermina Campos Valdéz**, por brindarme la oportunidad de trabajar en el área de infectología del Hospital Infantil de México, Federico Gómez.

Al **M. en C. Roberto Cruz González Meléndez**, por su asesoría y apoyo en este proyecto.

A mi profesora, **Q.F.B. Patricia Vidal Millán**, por impulsarme a ser una gran profesionista.

A mi **revisor y sinodales de tesis** por su asesoría y apoyo.

A mis **profesores**, por sus conocimientos transmitidos, por impulsarme a ser mejor cada día y por inculcarme la importancia de mi carrera.

Dedicatoria

Quiero dedicar ésta tesis a mis padres: **María del Carmen González Mata** y **Armando Garduño Ruiz**, porque sin su esfuerzo y apoyo no hubiera llegado hasta donde estoy ahora, por brindarme la oportunidad de estudiar una carrera profesional. Gracias por su amor incondicional, por su paciencia y por todo lo que lucharon y me impulsaron para que cumpliera uno de los más importantes de mis sueños, los amo.

A mi hermano **Aldo Jair Garduño González**, por su apoyo en tareas, por reparar mi laptop, por darme ánimos y por siempre estar cuando lo necesité.

A mi **familia**, por siempre apoyarme en todo momento y por su incondicional amor.

A mi novio, **Ulises Ramírez Cruz**, por compartir su vida conmigo, además de brindarme su apoyo y motivarme a continuar en todo momento.

A mi amiga incondicional, **Zeltzin Yanitsey Palacios Ventura**, por su valiosa amistad y por su gran apoyo a lo largo de la carrera y sobre todo en la vida.

A mis **amigos**, por hacer más amena y divertida mi estancia en la carrera.

A la **vida**, por llenar mis días de tantos momentos, emociones y aprendizajes todos estos años.

La vida en sí, es un sinfín de reacciones químicas.

Índice

	Pág.
Abreviaturas	1
Índice de figuras	2
Índice de cuadros	3
Resumen	4
Introducción	5
Marco teórico	7
Generalidades de la bacteria	7
Epidemiología	11
Infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS).....	11
Antimicrobianos	12
Mecanismos de resistencia.....	17
Historia de las β -lactamasas	19
Clasificación de β -lactamasas.....	20
Reacción en cadena de la polimerasa	24
Electroforesis.....	28
Planteamiento del problema	32
Hipótesis	33
Objetivos	34
Material y métodos	35
Resultados	49
Discusión	58
Conclusión	63
Perspectivas	64
Apéndice I. Cuadros de datos y resultados por cepa de <i>E.coli</i>	65
Referencias	70

Abreviaturas

BLEA. β -lactamasa de espectro ampliado.

BLEE. β -lactamasa de espectro extendido.

DNA. Ácido desoxirribonucleico.

E.coli. *Escherichia coli*.

EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético.

Gp. Grupo.

HIMFG. Hospital Infantil de México, Federico Gómez.

IAAS. Infecciones asociadas a la atención en salud.

IMViC. Indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato.

IAAS-N. Infecciones asociadas a la atención en salud-neonatos.

LPS. Lipopolisacáridos.

OMS. Organización mundial de la salud.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.

RHoVE. Red hospitalaria de vigilancia epidemiológica.

TBE. Disolución de Tris, borato y EDTA.

TAE. Disolución de Tris, acetato y EDTA.

UCIN. Unidad de cuidados intensivos neonatales.

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Estructura de la pared celular de bacterias grampositivas.	7
Figura 2. Estructura de la pared celular de bacterias gramnegativas.	8
Figura 3. Estructura microscópica de <i>E. coli</i> con tinción de Gram.....	9
Figura 4. Estructura antigénica de las enterobacterias.....	10
Figura 5. Mecanismo de acción de los antimicrobianos.....	16
Figura 6. Estructura química de los β -lactámicos.	16
Figura 7. Componentes necesarios para realizar una PCR.....	25
Figura 8. Esquema general de una PCR.....	27
Figura 9. Elementos necesarios para realizar una electroforesis	29
Figura 10. Esquema general de trabajo.....	37
Figura 11. Frecuencias de neonatos de acuerdo al tipo de cultivo de cepas de <i>E.coli</i> provenientes de neonatos en la UCIN del HIMFG (2015-2016)	49
Figura 12. Frecuencias de cepas de <i>E.coli</i> positivas a β -lactamasas por PCR multiplex, aisladas de neonatos en la UCIN del HIMFG (2015-2016).....	50
Figura 13. Frecuencias de cepas de <i>E.coli</i> positivas a β -lactamasas por PCR multiplex, de acuerdo al sexo del neonato, aisladas en la UCIN del HIMFG (2015-2016).....	51
Figura 14. Frecuencias de cepas de <i>E.coli</i> positivas a β -lactamasas por PCR multiplex, de acuerdo al tipo de cultivo del neonato, aisladas en la UCIN del HIMFG (2015-2016).....	51
Figura 15. Frecuencias de cepas de <i>E.coli</i> positivas a β -lactamasas por PCR multiplex, de acuerdo al tipo de cultivo y sexo del neonato, aisladas en la UCIN del HIMFG (2015-2016).....	52
Figuras 16-21. Amplificados de PCR multiplex realizadas.....	54

Índice de cuadros

	Pág.
Cuadro 1. Diferencia de la pared celular entre bacterias grampositivas y gramnegativas	7
Cuadro 2. Resultados de algunas de las pruebas bioquímicas utilizadas para <i>E. coli</i>	9
Cuadro 3. Clasificación de los antimicrobianos por estructura química.	14
Cuadro 4. Clasificación y sustratos de las β -lactamasas de acuerdo a los criterios de Ambler y Bush, Jacoby y Medeiros.	22
Cuadro 5. Mezclas de DNA realizadas con las cepas de <i>E.coli</i> para optimizar material y trabajo de las ocho PCR multiplex	42
Cuadro 6. Cantidades de reactivos por cada tubo de reacción de PCR.	43
Cuadro 7. Oligonucleótidos utilizados en las ocho PCR multiplex grupo específicas para los diferentes tipos de β -lactamasas.....	45
Cuadro 8. Condiciones necesarias para realizar las ocho PCR multiplex.....	46
Cuadro 9. Medidas descriptivas de la población de estudio de acuerdo al sexo y al tipo de cultivo de cepas de <i>E.coli</i> provenientes de neonatos en la UCIN del HIMFG (2015-2016)	49
Cuadro 10. Perfiles de β -lactamasa encontrados de acuerdo al tipo de cultivo y sexo para cepas positivas de <i>E.coli</i> provenientes de neonatos en la UCIN del HIMFG (2015-2016)	53
Cuadro 11. Datos y resultados de cepas de <i>E.coli</i> por oligonucleótido aisladas de neonatos en la UCIN del HIMFG (2015-2016).....	65
Cuadro 12. Cepas individuales de <i>E.coli</i> por perfiles aisladas de neonatos en la UCIN del HIMFG enero 2015-diciem	69

Resumen

Antecedentes: Las β -lactamasas son enzimas producidas por las bacterias, especialmente gramnegativas, como mecanismo de protección frente a antimicrobianos, lo que ha provocado que los tratamientos empíricos sean ineficaces, generando una reducción del número de opciones terapéuticas. Una de esas bacterias es *Escherichia coli* que hoy en día es comúnmente encontrada en IAAS. Sin embargo, la identificación molecular de los tipos de β -lactamasas producidas en la UCIN del HIMFG no ha sido estudiada.

Objetivo: Identificar y determinar los genes prevalentes para las β -lactamasas que inducen a la resistencia bacteriana en cepas de *E. coli* obtenidas de neonatos en la UCIN del HIMFG.

Metodología: Se realizó un estudio experimental descriptivo transversal y prolectivo de 58 muestras de *E. coli* de cultivos provenientes de neonatos en la UCIN del HIMFG en el periodo comprendido entre enero de 2015 a diciembre de 2016. La extracción de DNA se realizó con el estuche comercial "Genomic DNA Purification" según su protocolo de purificación rápida Wizard®. Los tipos de β -lactamasa fueron identificados por ocho PCRs de punto final y se evidenciaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%, con marcador de 100pb, teñido por bromuro de etidio. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS versión 15 para Windows por medio de frecuencias y χ^2 como medida de comparación entre variables con un valor de $p \leq 0.05$.

Resultados: De las 58 cepas de *Escherichia coli* aisladas de neonatos con una edad promedio de 30.26 días, se identificó que 91.4% de las cepas presentaban la β -lactamasa tipo GIM, 89.6% O1-GD2M, 84.5% CTXM Gp-1, 72.4% SIM, 58.6% OXA, 44.8% TEM, 19% OXA-48, 12% SHV y 3.4% CTXM Gp-9. Se encontró una diferencia significativa entre SHV y Sexo ($p=0.015$); O1-GD2M y Sexo ($p=0.036$); TEM y Cultivo ($p=0.029$); SIM y Cultivo ($p=0.028$); SHV, Urocultivo y Sexo ($p=0.004$); O1-GD2M, Varios y Sexo ($p=0.028$). Respecto a los perfiles de β -lactamasas se encontró una frecuencia de 31% para el perfil I, 10.3% para perfil II, 8.6% para perfil III, 5.2% para perfil IV, 3.4% para perfiles V-VIII y 1.7% para el resto de los perfiles. La asociación de β -lactamasas más frecuente fue OXA + CTXM-Gp1 + GIM + SIM + O1-GD2M.

Conclusión: Se identificó y determinó la distribución y prevalencia en de los diferentes tipos de β -lactamasas, aisladas de pacientes con IAAS en la UCIN del HIMFG, así como las asociaciones entre ellas agrupándolas en perfiles. La enzima con mayor frecuencia encontrada fue tipo carbapenemasa clase B (dependiente de Zinc): GIM, seguida de β -lactamasas de espectro extendido: O1-GD2M y CTXM Gp-1. La prevalencia de los perfiles de β -lactamasas estuvo encabezada por el perfil I (OXA + CTXM-1 + GIM + SIM + O1-GD2M) distribuido en mayor parte en los urocultivos.

Introducción

Los antibióticos o antimicrobianos son fármacos utilizados para tratar infecciones producidas por bacterias. Su fin es ser una molécula de alta toxicidad para la bacteria (específica) y una molécula lo menos tóxica para el humano; sin embargo, al poseer un mecanismo de acción tan específico ha ayudado a las bacterias a incluir información de los mismos en su código genético, permitiéndoles generar sustancias que alteren la estructura de estos fármacos.

Una de esas sustancias son las β -lactamasas, que son enzimas producidas por las bacterias, adquiridas por mecanismos tales como, mutaciones o transferencia de plásmidos que implican una amplia variedad de genes codificantes de estas enzimas.

La peculiaridad de este grupo de enzimas es su capacidad de hidrolizar el anillo β -lactámico estructural de una gama de fármacos conocidos como β -lactámicos, inhibiendo sus propiedades farmacológicas. Este hecho ha tomado relevancia a nivel mundial, debido al uso inapropiado de antimicrobianos sin prescripción médica y de tratamientos empíricos inadecuados, además de las constantes mutaciones bacterianas, que ha incrementado la resistencia a los antimicrobianos y ha provocado la reducción de las alternativas de tratamiento para los pacientes.

De acuerdo con un comunicado de prensa de la OMS del 27 de febrero del 2017, *E. coli* es una de las bacterias con alternativas de tratamiento casi nulas, pues se han registrado resistencias a carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación; por ello se ha enlistado como prioridad crítica para la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas.¹

Debido a que las alternativas farmacológicas están disminuyendo, el sector salud debe ser más cuidadoso con el manejo de antimicrobianos y sobre todo detectar y reducir los factores de riesgo para la diseminación de los microorganismos causantes de infecciones asociadas a cuidados sanitarios.

Actualmente, es importante identificar adecuadamente al microorganismo causante de la infección su sensibilidad y resistencia a antibióticos, para administrar el tratamiento adecuado al paciente evitando generar también, nuevas resistencias que provocarían un problema de salud pública aún más serio.

Marco teórico

Las estructuras de las bacterias gramnegativas y grampositivas son similares, sin embargo, existen algunas diferencias en su pared celular (cuadro 1) que permiten a un agente antimicrobiano actuar sobre ellas inhibiendo su crecimiento.²

Cuadro 1. Diferencia de la pared celular entre bacterias grampositivas y gramnegativas.³

	Bacterias grampositivas	Bacterias gramnegativas
Capa de peptidoglicanos	Gruesa (múltiples capas)	Delgado (una sola capa)
Ácidos teicoicos	Presentes	Ausentes
Espacio periplásmico	Ausente	Presente
Membrana externa	Ausente	Presente
Contenido de LPS	Casi nulo	Abundante

Modificado de Tórtora, 2007.

Estructura de las bacterias grampositivas (figura 1):²

- Capa de peptidoglucano: Polímero grueso que consiste en N-acetil murámico y N-acetil glucosamina entrelazados, responsable de mantener la forma del organismo.
- Ácidos teicoicos: Polímeros entrelazados en la capa de peptidoglucano que se extienden en forma de cilios en la superficie de las células.

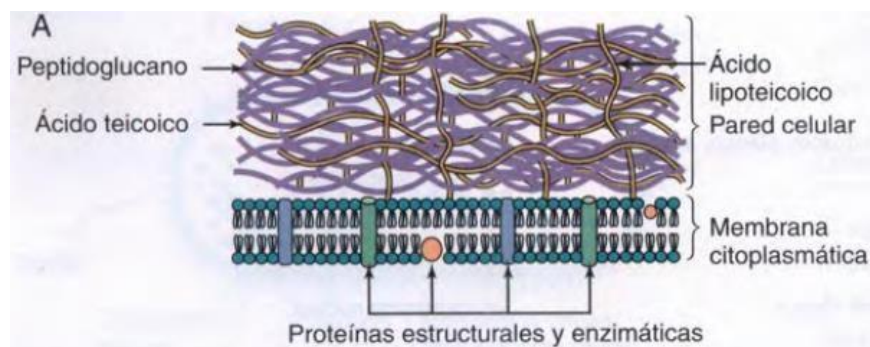


Figura 1. Estructura de la pared celular de bacterias grampositivas.⁴

Estructura de las bacterias gramnegativas (figura 2):²

- Capa de peptidoglicanos: Polímero delgado responsable de mantener la forma del organismo. Se localiza en el espacio periplásmico.
- Espacio periplásmico: Se localiza entre la membrana citoplasmática y la membrana externa. Contiene al peptidoglicano en donde se encuentran numerosas enzimas, entre ellas las β -lactamasas.
- Membrana externa: Funciona como la primera barrera de permeabilidad de la célula y como mecanismo de protección contra los mecanismos de defensa del hospedador.
- Lipopolisacáridos: Localizados en la superficie de la célula, contribuyen a la capacidad de la bacteria para causar enfermedad y aportan carga negativa a las bacterias gramnegativas.
- Porinas: Canales llenos de agua que facilitan el transporte de nutrientes y sustancias de bajo peso molecular a la célula, incluyendo antimicrobianos.

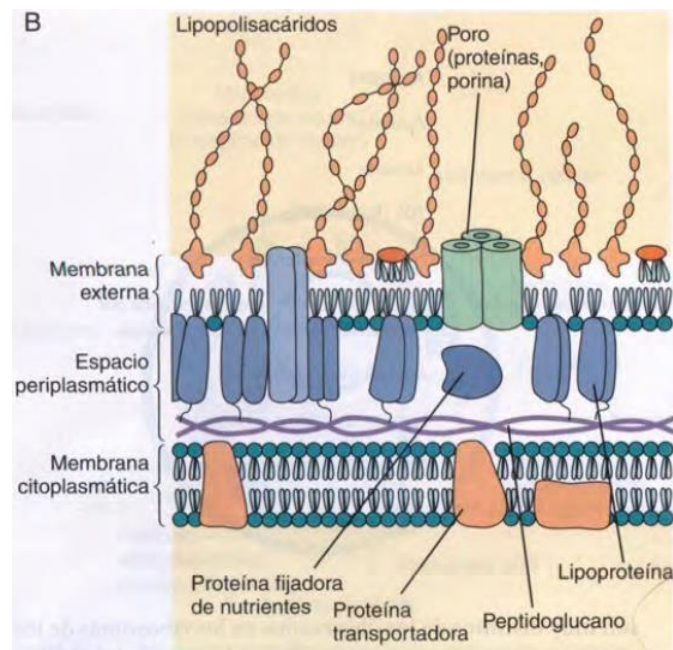


Figura 2. Estructura de la pared celular de bacterias gramnegativas.⁴


Escherichia coli

Es un bacilo gramnegativo (figura 3) con fimbrias y flagelos, anaerobio facultativo, suele producir pruebas positivas para indol, lisina descarboxilasa y fermentación de un gran número de carbohidratos, además de la producción de gas a partir de glucosa (cuadro 2). En agar sangre crece como colonias circulares de bordes enteros, convexas y de color blanquecino.⁵



Figura 3. Estructura microscópica de *E. coli* con tinción de Gram.⁶

Cuadro 2. Resultados de algunas de las pruebas bioquímicas utilizadas para *E. coli*.⁷

Prueba bioquímica	Resultado
Catalasa	Positivo
NO ₃  NO ₂	Positivo
O/F de glucosa	Fermentativo
H ₂ S	Negativo
Glucosa y gas	Positivo
Lactosa	Positivo
L-Arabinosa	Positivo
Maltosa	Positivo
D-Manitol	Positivo
D-Manosa	Positivo
D-Sorbitol	Positivo
Trehalosa	Positivo
D-Xilosa	Positivo
Indol	Positivo
Rojo de Metilo (RM)	Positivo
Voges-Proskauer (VP)	Negativo
Citrato (Simmons)	Negativo
Lisina descarboxilasa	Positivo
Ornitina descarboxilasa	Variable 26-75% positivo
Ureasa (Christensen)	Negativo

MacFaddin, 2004.

Escherichia coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, cuyo hábitat natural es el tubo intestinal del hombre y los animales.⁵

Las enterobacterias poseen una estructura antigénica compleja (figura 4) y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia⁵. Se clasifican en más de 150 antígenos somáticos O termoestables (lipopolisacáridicos), más de 100 antígenos K termolábiles (capsulares) y más de 50 antígenos H (flagelares). Los antígenos O constituyen la parte más externa de los lipopolisacáridos de la pared celular, y consisten en unidades repetidas de polisacáridos. Los antígenos K son externos, algunos son polisacáridos y otros proteínas. Pueden relacionarse con la virulencia (por ejemplo, las cepas de *E. coli* que producen el antígeno K1 que son predominantes en la meningitis neonatal, y los antígenos K de *E. coli* producen fijación de las bacterias a las células epiteliales antes de la invasión de las vías gastrointestinales y urinarias). Los antígenos H están localizados sobre los flagelos, y el calor y el alcohol los desnaturaliza o elimina.⁵

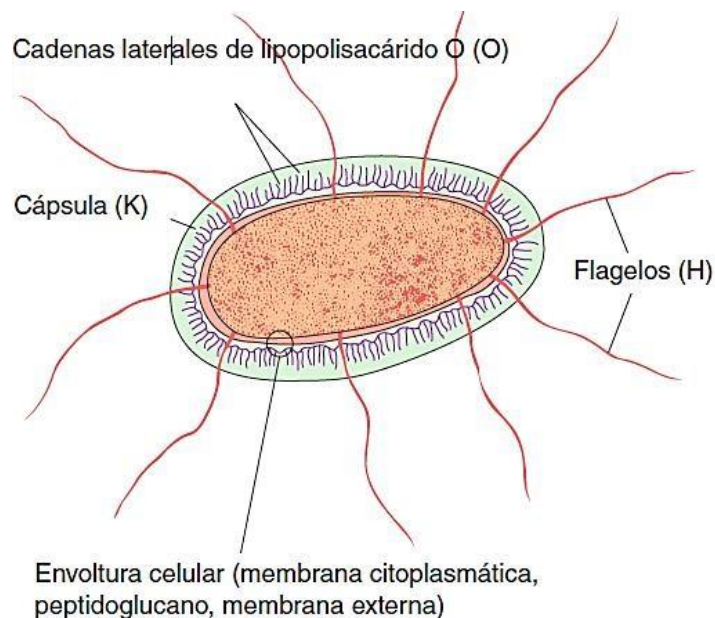


Figura 4. Estructura antigénica de las enterobacterias.⁵

Epidemiología

El feto humano se desarrolla en un ambiente estéril de la cavidad uterina y su colonización comienza durante su paso por el canal vaginal y el contacto con la flora fecal materna durante el parto. Otras fuentes de bacterias para la formación de la población microbiana del tubo digestivo del recién nacido son la piel materna y el medio ambiente que lo rodea. Este último puede transmitirle incluso patógenos de diversos tipos desde los primeros días de vida.⁸

Algunos de los microorganismos intestinales constituyen un problema de primer orden en las infecciones de los hospitales. Dentro de los hospitales y otras instituciones, esas bacterias suelen transmitirse mediante el personal, los instrumentos y los medicamentos parenterales. El control de la diseminación, depende del lavado de manos, asepsia rigurosa, esterilización del equipo, desinfección, limitación del tratamiento intravenoso, y precauciones estrictas para conservar estériles las vías urinarias.⁹

Infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS)

Las IAAS son las denominadas infecciones “hospitalarias” o “nosocomiales”; son infecciones contraídas por un paciente durante su tratamiento en un hospital sin que dicho paciente las presentara con anterioridad ni en el momento de ingreso. Pueden afectar a pacientes en cualquier tipo de entorno y pueden aparecer incluso después de dar de alta al paciente.¹⁰

En México, se calcula que se producen anualmente 450 mil casos de estas infecciones, y que son causantes de 32 defunciones por cada 100 mil habitantes. La vigilancia epidemiológica está a cargo de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHove) donde reportan que

la mayor proporción de infecciones notificadas fueron bacteremias (23.4%) y neumonías (20%) en Medicina Interna, Cirugía General y Unidad de Cuidados Intensivos.¹¹

En neonatos, especialmente en prematuros, representa un mayor riesgo contraer estas infecciones en comparación con pacientes adultos, debido a que su sistema inmunológico es naturalmente inmaduro. Uno de los factores importantes para la adquisición de estas IAAS son las técnicas asépticas y las diferentes prácticas de manejo de los recién nacidos, es decir, los artículos que se encuentran en constante contacto con ellos como: termómetros, estetoscopios e incubadoras contaminadas; así como el acercamiento con su madre y familiares, y las superficies, manos y vestimenta de trabajadores de la salud contaminados.¹²

En el caso de los recién nacidos prematuros que se encuentran internados en las UCIN, tienen aún una desventaja, ya que, requieren de procedimientos invasivos que los hacen más susceptibles a la adquisición de infecciones causadas por bacterias multiresistentes que habitan de manera alarmante esta área médica.¹²

Antimicrobianos

Los antibióticos son sustancias químicas utilizadas para eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos infecciosos. Estos pueden clasificarse de diferentes formas de acuerdo a su origen, espectro de acción, forma y mecanismo de acción y por su estructura:¹³

I. Por su origen:

- a) Biológicos. Producidos por microorganismos. Por ejemplo, penicilina por *Penicillium notatum*.
- b) Sintéticos. Producidos exclusivamente por síntesis química. Por ejemplo, las sulfamidas.
- c) Semisintéticos. Producidos por el microorganismo y se adicionan radicales obtenidos por síntesis.

II. Por su espectro de acción:

El rango de actividad en géneros y especies en los que actúan los agentes antimicrobianos recibe el nombre de espectro. De acuerdo con esto se clasifican en:

- a) De amplio espectro: Interfieren en el crecimiento de numerosas especies bacterianas, como las tetraciclinas.
- b) De espectro intermedio: Actúan frente a un número más limitado de especies, como las penicilinas y macrólidos.
- c) De espectro reducido: Solo actúan frente a un número limitado de especies, como las polimixinas.

III. Por su forma de acción:

- a) Bacteriostáticos: Bloquean el desarrollo y multiplicación de las bacterias. Su efecto es reversible.
- b) Bactericida: Provoca la muerte bacteriana y es irreversible.

IV. Por su mecanismo de acción (figura 5):

Estos agentes pueden interferir o inhibir ciertos mecanismos, tales como la síntesis de la pared celular o membrana citoplasmática, la síntesis de proteínas, la síntesis de ácido nucleico o de

una ruta metabólica.¹³

Por ende, los antimicrobianos se clasifican de acuerdo con el sitio de acción en el que actúan y por su estructura química característica:¹⁴

- a) Antimicrobianos que actúan a nivel de pared celular
- b) Antimicrobianos que actúan a nivel de membrana citoplasmática
- c) Antimicrobianos que actúan sobre la síntesis de proteínas o vías metabólicas
- d) Antimicrobianos que actúan a nivel de la replicación de DNA
- e) Antimicrobianos inhibidores específicos de β -lactamasas

V. Por su estructura química (cuadro 3 y figura 6):^{13 y 15}

Se agrupan en familias que tienen características comunes, no solo químicas, sino también, de mecanismo de acción y espectro semejantes.

Cuadro 3. Clasificación de los antimicrobianos por estructura química.^{13 y 15}

Grupo		Fármacos
β -lactámicos	Penicilinas	Penicilina G Penicilina V Amoxicilina Amoxicilina (+sulbactam) Amoxicilina (+ácido clavulónico) Piperaciclina (+tazobactam)
	Cefalosporinas	Primera generación: Cefalotina Cefalexina Segunda generación: Cefamicinas: Cefoxitina Cefaclor Cefuroxima Tercera generación: Ceftazidima Ceftriaxona Cefotaxima Cuarta generación: Cefpiroma

		Cefepima Quinta generación: Ceftobiprole Ceftarolina
	Monobactamas	Aztreonam
	Carbapenems	Tienamicina (Thienpenem) Meropenem Ertapenem Imipenem Meropenem
Macrólidos		Eritromicina
Aminoglucósidos		Amikacina Estreptomina Gentamicina Neomicina Tobramicina Espectiomina Mupirocina Puromicina
Lincosaminas		Lincomicina Clindamicina
Tetraciclinas		Tetraciclina Clortetraciclina Oxitetraciclina
Polipeptídicos		Polimixina B Vancomicina Bacitracina Cicloserina Actinomicina
Quinolonas		Ácido nalidíxico Ciprofloxacino Levofloxacino Moxifloxacino
Sulfonamidas		Sulfametoxasol Trimetoprim
Ansamidas		Rifampicina Estreptovaricina
Nitrofuranos		Nitrofurantoína Nitrofurazona
Aminocumarínicos		Novobiocina

Modificado de Lorenzo, 2008 y Del Arco, 2014.

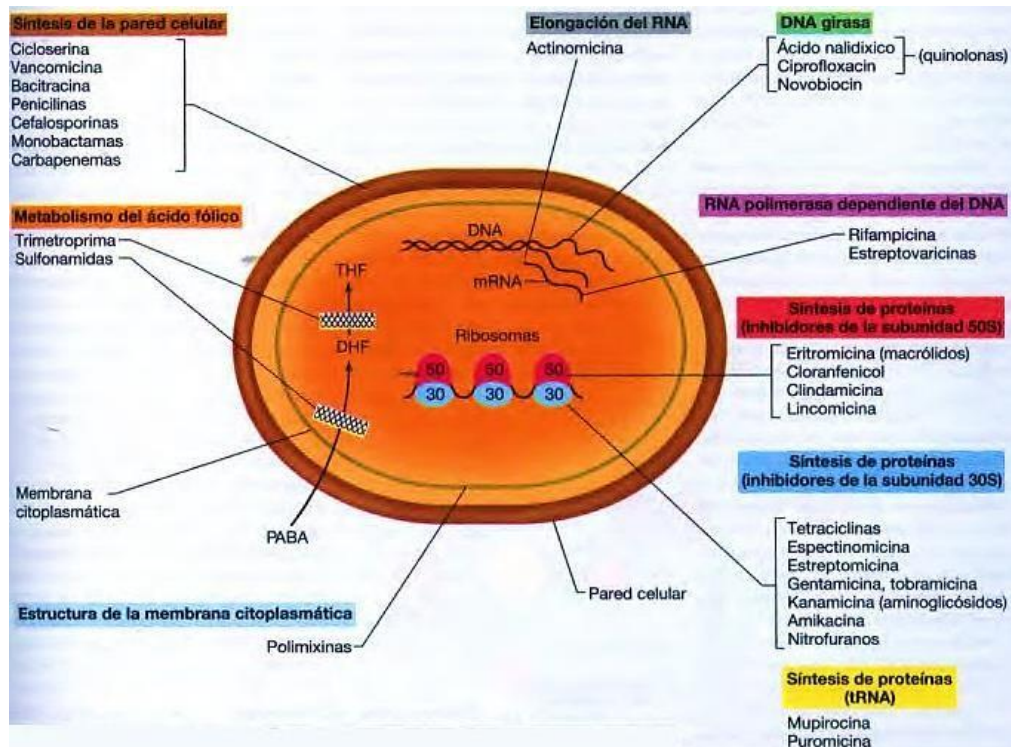


Figura 5. Mecanismo de acción de los antimicrobianos.¹⁶

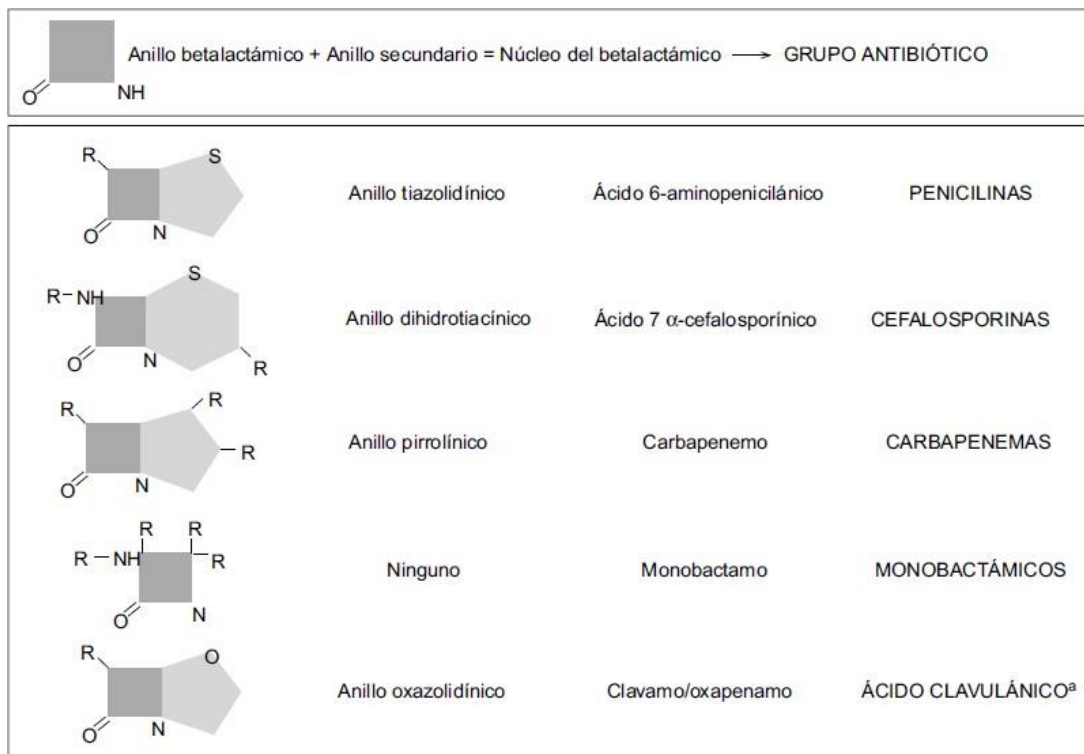


Figura 6. Estructura química de los β -lactámicos.¹⁷

El mecanismo de acción de los medicamentos β -lactámicos es a nivel de síntesis de pared bacteriana. En el caso de las bacterias gramnegativas, como se mencionó anteriormente (cuadro 1); cuentan con una capa delgada de peptidoglucano que consta de una serie de largas cadenas de glúcidos formados por la repetición de moléculas de N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. A su vez, el ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí formando una malla.¹⁷

Para su formación requiere de pentapéptidos y por medio de la pérdida de un aminoácido, se une por medio de transpeptidasas a otro tetrapéptido. El papel de estos agentes β -lactámicos inicia en la fase final de la síntesis de la pared bacteriana, en donde se une covalentemente a la enzima por contar con una similitud estructural a la de los pentapéptidos, por lo que la bloquea e impide la síntesis de la pared celular. Al estar expuestas al medio, son susceptibles a los cambios de presión oncótica.¹⁷

Mecanismos de resistencia

Existen diferentes formas en que los microorganismos son resistentes a los antimicrobianos. Estos incluyen: 1) la bacteria produce enzimas que alteran la estructura del agente antimicrobiano, por lo que ya no puede ser reconocido por su blanco; 2) el sitio blanco es alterado por mutación, de tal manera que ya no permite la unión del agente antimicrobiano; 3) por transferencia de plásmidos entre bacterias.^{2 y 18}

Una de las enzimas que producen las bacterias son las β -lactamasas. La producción de la gran variedad de estas enzimas ocurre por diversas modificaciones en la información genética.

Estas pueden ocurrir por dos tipos de mutaciones: cromosómicas o por elementos extracromosómicos.¹⁹

En el tipo cromosómico, la resistencia ocurre por mutaciones en los genes de la bacteria, involucrados en el control de las funciones y estructuras sobre las que actúan los distintos antibióticos, modificando la susceptibilidad de la bacteria a ellos. En este caso, ocurre una modificación en la secuencia de bases del ácido nucleico de la bacteria, transmitiendo esta información a su descendencia o en el transcurso de varias generaciones, haciendo a la bacteria totalmente resistente a la droga. Estas mutaciones ocurren espontáneamente y pueden dar lugar a la alteración o superproducción de una enzima específica,²⁰ o afectar proteínas que participan en la permeabilidad de la membrana alterando así, la entrada del antibiótico, o bien, producen la acumulación de éste en el espacio periplásmico situado entre la membrana externa e interna de las bacterias gramnegativas.²¹

El otro mecanismo de resistencia ocurre por elementos extracromosómicos, portadores de determinada información, como lo son los plásmidos, que tienen la capacidad de transferirse de una bacteria a otra, de igual o diferente género y especie.²²

Con estos mecanismos de resistencia, las bacterias productoras de β -lactamasas han sufrido mutaciones, generando β -lactamasas de espectro extendido²³, que se definen como enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, monobactams y cefalosporinas de tercera generación, pero son inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam.^{24 y 25}

Historia de las β -lactamasas

En 1940; Edward P. Abraham y Ernest Chain, quienes habían participado junto con Howard Florey y Heatley en la purificación y aplicación de las penicilinas, observaron que en ciertos cultivos de *Escherichia coli* había una inactivación de las soluciones de penicilinas por una sustancia producida por dichas bacterias.²⁶ Años después (1944), Kirby identificaría que existían cepas de *Staphylococcus aureus* que producían una sustancia capaz de inactivar las penicilinas, que resultaron ser las penicilinasas.²⁷ La primera β -lactamasa mediada por plásmidos en gramnegativos, TEM-1, se describió a principios de los años 60's. Esta enzima se encontró originalmente en una sola cepa de *E. coli* aislada de un hemocultivo de una paciente llamada Temoeira en Grecia, de ahí la designación TEM.²⁸ Posteriormente, fue aislada una β -lactamasa cromosomal en *K.pneumoniae* y mediada por plásmido en *E.coli*, capaz de inactivar tanto a las aminopenicilinas como a las cefalosporinas de primera generación, carboxipenicilinas y las ureidopenicilinas, le llamaron SHV-1, por la variable sulfhidrilo o tiol.^{28 y 29}

Así continuó el desarrollo de estas enzimas inactivadoras de β -lactámicos hasta que, productos de mutaciones de los genes que codificaban las β -lactamasas tipo TEM-1, TEM-2, SHV-1 aparecieron las actuales β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). En 1983, un grupo de investigadores alemanes, encabezados por Knothe y otros, aislaron de una cepa de *Klebsiella ozaenae* una nueva β -lactamasa producto de mutaciones de la SHV-1, la nombraron SHV-2, la misma era capaz de hidrolizar las cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima) y el aztreonam. Fueron Philippon y otros, en 1989, quienes la llamaron, por primera vez, β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).³⁰ En el momento actual se han descrito más de 160 tipos de TEM y 100 tipos de SHV. Estas enzimas son de

codificación plasmídica y transferibles a otras bacterias por conjugación, lo que favoreció su rápida dispersión.³¹ Un nuevo tipo de BLEE aisladas de enterobacterias hace su aparición en 1989 de forma simultánea en Alemania, Argentina y Francia, fueron llamadas CTX-M, se comprobó que no tenían relación alguna con las BLEE descritas hasta ese momento, eran filogenéticamente diferentes a las TEM y SHV. En la actualidad se reconocen alrededor de 65 tipos de CTX-M.^{24 y 32}

En el año 1991 se aislaron las primeras enzimas del grupo de las oxacilinasas (OXA), el reporte fue realizado en Ankara, Turquía, con un perfil superponible a las BLEE, pero aisladas más frecuentemente de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Continuamente se están descubriendo BLEE, algunas semejantes a las ya conocidas y otras con escasa homología genética a las anteriores, en la actualidad suman más de 200 tipos. Otras familias de BLEE menos prevalentes son las PER, VEB-1 y BES-1, SFO-1, TLA-1, CME-1, GES/IBS.³³

Clasificación de β -lactamasas

Existen dos sistemas principales de clasificación: la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros y su correlación con la clasificación molecular de Ambler (cuadro 4).³⁴

La clasificación de Ambler se basa en la estructura molecular de las β -lactamasas y su secuencia de aminoácidos. En esta clasificación, se reconocen cuatro tipos moleculares designados con la letra A hasta la D. Los tipos A, C y D incluyen grupos de enzimas relacionados por su evolución que poseen serina en su zona activa. Las β -lactamasas de tipo B tienen una o dos moléculas de zinc en su zona activa y son inhibidas por EDTA.^{34 y 35}

- Clase A: Penicilinasas (encontradas en *Staphylococcus aureus*), TEM-1, SHV-1, β -lactamasas cromosomales de *Proteus*, *Klebsiella* y carbapenemasas.
- Clase B: Metalo β -lactamasas que requieren un ión bivalente para su actividad (Zn^{2+}).
- Clase C: β -lactamasas usualmente tipo cromosomal AmpC propia de la mayoría de las enterobacterias.
- Clase D: β -lactamasas mediadas por plásmidos tipo OXA.³⁴

La clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros se basa en los sustratos que la β -lactamasa hidroliza y en la inhibición de su actividad por compuestos como el ácido clavulánico, EDTA y aztreonam u oxacilina. Las mutaciones puntuales pueden alterar la afinidad por el sustrato específico y la susceptibilidad a los inhibidores, cambiando el grupo al que está asignada la enzima. Este modelo define cuatro grupos de acuerdo a los sustratos hidrolizados y perfiles de inhibición.³⁴

- Grupo 1: Cefalosporinasas que no son inhibidas por el ácido clavulánico.
- Grupo 2: Penicilinasas, cefalosporinasas y carbapenemasas que son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.
- Grupo 3: Metalo β -lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes y que son inhibidas por EDTA.
- Grupo 4: Penicilinasas que no son inhibidas por el ácido clavulánico.³⁴

Cuadro 4. Clasificación y sustratos de las β -lactamasas de acuerdo a los criterios de Ambler y Bush, Jacoby y Medeiros.³⁴

β -lactamasas	Bush, Jacoby, Medeiros	Molecular (Ambler)	Familias de β -lactamasas	Sustratos
Espectro Ampliado	2b	A	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Bencilpenicilinas, minopenicilinas, Carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, Cefalosporinas de espectro estrecho**
	2d	D	OXA-1 a OXA-10, PSE-2 (OXA-10)	El mismo sustrato de TEM-1, TEM-2, SHV-1, más cloxacilina, meticilina y oxacilina. Inhibidas escasamente por ácido clavulánico.
Espectro extendido (BLEE)	2be	A	TEM-3 a TEM-26 SHV-2 A SHV-6, K1 de <i>Klebsiella oxytoca</i>	El mismo sustrato del grupo de espectro ampliado más cefalosporinas de tercera generación** y aztreonam
	2br	A	TEM-30 a TEM-36, IRT-2	β -lactamasas tipo IRT (Inhibitor Resistant TEM). Resistentes a los inhibidores de β -lactamasas ácido clavulánico y sulbactam, pero sensible a tazobactam.
	2d	D	OXA-1 a OXA-10	El mismo sustrato del grupo de espectro ampliado más cefepima para algunas enzimas.
	2f	A	Otras (BES-1, familia GES/IBC, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1, VEB-1 y VEB-2)	El mismo sustrato de la familia TEM y SHV
AmpC	1	C	ACC-1, ACT-1, CFE-1, familia CMY, DHA-1, DHA-2, familia FOX, familia LAT, MIR-1, MOX-1 y MOX-2	El mismo sustrato del grupo de espectro ampliado más cefamicinas**. No inhibidas por el ácido clavulánico.
Carbapenemasas	3a, 3b, 3c	B	Familia IMP, familia VIM, GIM-1, SPM-1 y L1 (<i>S. Maltophilia</i>)	El mismo sustrato del grupo de Espectro extendido más cefamicinas**, y carbapenémicos. Aztreonam se mantiene estable. No inhibidas por ácido clavulánico
	2f	A	KPC-1, KPC-2 y KPC-3	El mismo sustrato del grupo de la familia IMP, familia VIM, GIM-1 y SPM-1
	ND*	D	OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40 y OXA-48	El mismo sustrato del grupo de la familia IMP, familia VIM, GIM-1 y SPM-1
Penicilinasas	4	ND*	Penicilinasas cromosómica de <i>B. cepacia</i>	Penicilinasas no incluidas en los otros grupos. No inhibidas por ácido clavulánico

* No determinado
 ** Benzilpenicilinas, penicilina G; aminopenicilinas, amoxicilina y ampicilina; carboxipenicilinas, carbenicilina y ticarcilina; ureidopenicilinas, piperacilina; cefalosporinas de espectro estrecho, cefazolina, cefalotina, cefamandol y cefuroxima, entre otras; cefalosporinas de tercera generación, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, y ceftriaxona; carbapenémicos, ertapenem, imipenem, y meropenem; cefamicinas, cefotetan, cefoxitin.

Martín S, 2014.

β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA): TEM-1, TEM-2 y SHV-1 son las BLEA mediadas por plásmidos comúnmente distribuidas en los bacilos gramnegativos y pertenecen al grupo 2b de la clasificación de Bush, Jacoby, Medeiros.³⁴

- BLEA: hidrolizan aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina) y carboxipenicilinas (carbencilina y ticarcilina). Cefamicinas, cefalosporinas aminotiazólicas (cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima), monobactam y carbapenémicos son estables frente a estas enzimas.
- BLEE: Presentan resistencia a penicilinas y cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Pueden inhibirse por el ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam. Debido a mutaciones su efecto hidrolítico se ha extendido a cefalosporinas de espectro extendido y a los monobactámicos. Han evolucionado a partir de sustituciones de aminoácidos en las penicilinasas, Temoeira (TEM), variable sulfhidrilo (SHV) y oxacilina (OXA). Los carbapenems (imipenem, meropenem y ertapenem) y cefamicinas (cefoxitina y cefotetán) mantienen su actividad frente a estas enzimas.
- Las β -lactamasas CTX-M o cefotaximasas: Pertenecen a la clase molecular A, confieren resistencia a cefuroxima, cefotaxima y cefepima. Son mejor inhibidas por tazobactam que por sulbactam o ácido clavulánico.
- β -lactamasas resistentes a los inhibidores de las β -lactamasas (IRT, por sus siglas en inglés): La producción de estos inhibidores se debe a mutaciones que cambian la secuencia de los aminoácidos en la región de los genes β -lactamasa TEM, responsables de la producción de TEM-1 y TEM-2.^{2 y 34}
- β -lactamasas tipo AmpC: Son β -lactamasas de codificación cromosomal, conocidas como cefalosporinas de tipo AmpC. Son capaces de inactivar aminopenicilinas,

ureidopenicilinas, cefalosporinas de distintas generaciones y cefamicinas. Normalmente están reprimidas y son inducibles sólo en presencia del antibiótico β -lactámico. Por el hecho de ser inducible puede suceder un cambio en el mecanismo regulatorio, es decir, se seleccionen mutantes que generen la producción de β -lactamasas en ausencia del fármaco β -lactámico. No son inhibidas por ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam. El espectro de estas enzimas depende de la cantidad de enzima que produzcan.³⁴

- Carbapenemasas: Hidrolizan todos los β -lactámicos incluyendo carbapenems como imipenem, meropenem y ertapenem. Se transmiten por plásmidos y se han descrito tres diferentes tipos en enterobacterias que pertenecen a las clases A, B y D de Ambler:
 - Clase A (serin-carbapenemasas): Inhibidas por ácido clavulánico. Enzimas tipo KPC, SME, GES, NMC e IMI.^{36 y 37}
 - Clase B (metalo β -lactamasas (MBLs)): Son dependientes de Zinc, sensibles a EDTA y resistentes a los inhibidores de las β -lactamasas. Enzimas tipo GIM, NDM, SPM, SIM, IMP y VIM.^{36 y 37}
 - Clase D (grupo OXA): Variantes de los subtipos OXA-23, OXA-24, OXA-143, OXA-51 Y OXA-48.³⁸

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una de las técnicas más empleadas en los laboratorios de investigación, basada en la replicación *in vitro* de una molécula de ADN genómico o complementario por medio de ciclos repetidos que constan de tres temperaturas.³⁹

La longitud del producto amplificado la delimitan los oligonucleótidos, de cuyo diseño depende el resultado de la PCR.³⁹

Los componentes de una PCR son los siguientes (figura 7):³⁹

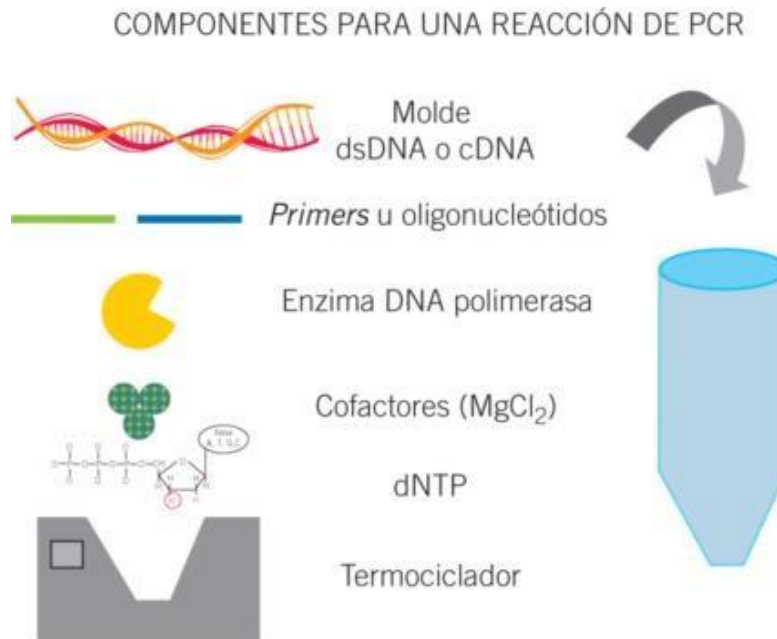


Figura 7. Componentes necesarios para realizar una PCR.³⁹

- ✓ DNA molde: Puede obtenerse de cualquier muestra biológica.
- ✓ DNA polimerasa: La Taq DNA polimerasa, es una enzima que polimeriza una nueva cadena de DNA de una cadena molde existente. Proviene de una bacteria encontrada en un géiser *Thermophilus aquaticus*, que soporta temperaturas elevadas (como la requerida en PCR: 95°C). La concentración recomendada es de 1-2.5 U/reacción de PCR.
- ✓ Desoxinucleótidos (dNTP: dATP, dGTP, dCTP y dTTP): Se requieren para que la polimerasa pueda llevar a cabo su función de síntesis de una nueva hebra de DNA. Se requiere que estén en su forma trifosfatada para su estabilidad y para proporcionar un

grupo fosfato para formar el enlace fosfodiéster en la unión nucleótido-nucleótido. Su concentración óptima es entre 50 y 200µM.

- ✓ Cloruro de Magnesio: Funciona como cofactor de la DNA polimerasa y su concentración ideal es entre 1.0 y 2.5mM, ya que el exceso produce amplificación inespecífica y una falta de éste disminuye la producción de amplificado.
- ✓ Oligonucleótidos: Poseen una secuencia específica y se emplean para reconocer por complementariedad secuencias blanco del DNA molde. Su función es proporcionar un extremo 3' libre al que se añadan los nucleótidos consecutivos mediante enlace fosfodiéster, ya que la DNA polimerasa requiere un extremo 3'OH preexistente. A partir de ahí, la síntesis se realiza en dirección 5'→3' (este iniciador se conoce como sentido o forward). El iniciador antisentido o reverse, es complementario y antiparalelo a la cadena 5'→3' por lo que la polimerización dará origen a la cadena 3'→5'. Su concentración ideal es de 0.3-1µM.
- ✓ Termociclador: Es el equipo que lleva a cabo los cambios de temperatura, por calentamiento/enfriamiento, en cuestión de segundos para realizar la PCR. Normalmente los rangos de temperatura que abarca van desde los 4 a los 96°C. Cuenta con una tapa a 103°C para evitar la condensación de agua en las tapas que podría afectar la concentración de los solutos en la reacción. El enfriamiento se realiza por medio de flujos de aire frío.³⁹

Una PCR incluye los siguientes pasos (ver figura 8):³⁹

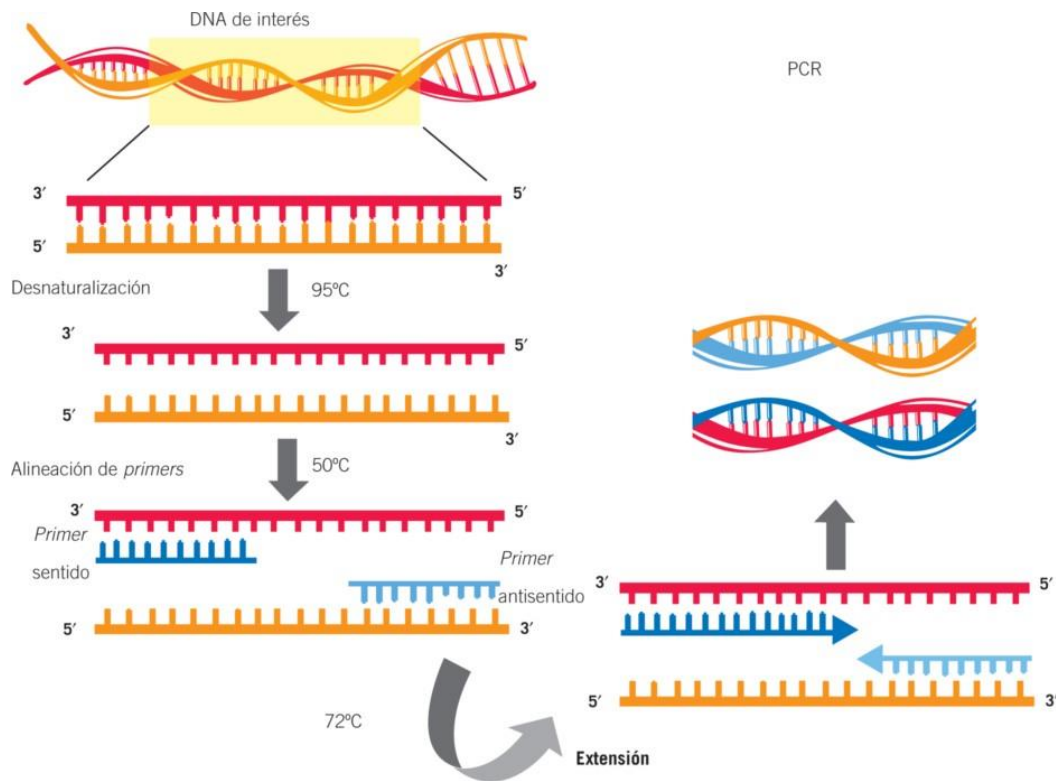


Figura 8. Esquema general de una PCR.³⁹

- a) Inicio de la desnaturalización: Se requiere de una temperatura de 95°C para la desnaturalización de la doble cadena de DNA, esto permite el acceso de los oligonucleótidos. Se mantiene por 5 minutos al inicio de la PCR.
- b) Ciclos de amplificación: Consta de tres temperaturas
- 1) 95°C : desnaturalización por unos 30s.
 - 2) $55\text{-}60^{\circ}\text{C}$: Alineación por 30-40s. Se requiere esta temperatura para generar la energía cinética necesaria para que los oligonucleótidos busquen en el DNA su secuencia complementaria y formen puentes de hidrógeno, dejando el extremo 3'OH libre para que la enzima DNA polimerasa incorpore los nucleótidos.
 - 3) 72°C : Extensión, según considerando la longitud del producto que se va a amplificar. Esta temperatura es la óptima para que trabaje la DNA polimerasa.

- c) Amplificación final: Una vez terminados los ciclos, se mantiene esta temperatura para que la polimerasa termine la extensión.
- d) Almacenamiento temporal: Se programa un ciclo a 4°C por varias horas, lo que permite conservar los productos de PCR hasta que se retiren del termociclador y se refrigeren a -20°C.³⁹

PCR múltiple o multiplex

En este tipo de PCR se realiza la amplificación de más de un fragmento de ADN en una sola reacción de PCR con dos o más juegos de oligonucleótidos. Presenta la ventaja de que ahorra tiempo y reactivos, pero presenta el inconveniente de que el diseño de los oligonucleótidos debe ser adecuado para que no se complementen entre ellos (hibridaciones inespecíficas).³⁹

PCR en punto final

Es aquella en la que el producto se analiza después de 25-35 ciclos. Se basa en la detección del producto de amplificación mediante electroforesis de agarosa o acrilamida. El producto se visualiza como una banda. La intensidad de la banda se considera proporcional a la cantidad de producto amplificado y su longitud se verifica interpolando contra un marcador de peso molecular. Una desventaja es que depende de la resolución del gel y la cantidad de material de inicio da lugar a una cantidad diferente de producto final.³⁹

Electroforesis

Debido a que los grupos fosfato les confieren carga negativa a los ácidos nucleicos, estos migrarán al polo positivo; es decir al ánodo. El principio de la electroforesis consiste en la migración proporcional de las moléculas a través de un gel con características porosas, según el peso molecular o tamaño; debido a un movimiento generado por un campo eléctrico.³⁹

Los elementos para realizar una electroforesis son los siguientes (ver figura 9):



Figura 9. Elementos necesarios para realizar una electroforesis.³⁹

La cámara de electroforesis es un dispositivo capaz de generar un campo eléctrico, éste se genera dentro de una solución amortiguadora en la que se encuentra sumergido el gel con las muestras. El alto contenido en electrolitos le permite la transmisión de la corriente eléctrica,

manteniendo el pH estable. La cámara cuenta con dos polos (rojo/positivo/ánodo y negro/negativo/cátodo) que se conectan a una fuente de poder.³⁹

Otro componente de la electroforesis es el gel, siendo éste el medio de soporte donde se colocan las muestras. El soporte ideal es un gel semisólido o gelatinoso, compuesto por polímeros que forman una especie de malla porosa, por donde avanzan las moléculas de diferente peso molecular, permitiendo su separación por tamaño. Existen geles de agarosa y acrilamida que se preparan con la solución buffer de corrimiento pesando la cantidad que se requiere y calentando hasta su disolución, posteriormente, se vacía en un molde con un peine previamente colocado para la formación de los pozos. Una desventaja de la agarosa (extraída de algas marinas), sobre la acrilamida es su poder de resolución, ya que ésta última permite un mejor corrimiento y una mejor visualización al transiluminador.³⁹

Respecto al buffer de corrimiento, es de la misma composición y pH que el que se emplea para preparar el gel. Éste proporciona un medio adecuado para transmitir la corriente eléctrica y mantener el pH. Esta puede ser TBE o TAE para los ácidos nucleicos. El buffer TBE contiene Tris-base, ácido bórico y EDTA y maneja un pH de 7.2 y en el caso de TAE es Tris-base, ácido acético y EDTA con pH final de 8.5.³⁹

El marcador de peso molecular, son proteínas o moléculas de DNA que permiten determinar el tamaño, por comparación, de los fragmentos. Pueden ser fagos o plásmidos sometidos a un corte con enzimas de restricción para generar fragmentos de distintos tamaños, o son DNA sintético denominados escaleras, porque contienen fragmentos con incrementos de tamaño gradual.³⁹

El buffer de carga tiene como finalidad, brindar peso, densidad y color a la muestra, lo que facilita su depósito en los pocillos y evita su salida del gel. Además, permite observar el avance del corrimiento en el gel. Contiene Tris, azul de bromofenol, azul de xileno y glicerol.³⁸

Por último, el transiluminador ultravioleta, excita la molécula cromogénica emitiendo energía fluorescente. En general emiten longitud de onda de 302nm, aunque también existen de 254 y 365nm.³⁹

Para la visualización de las muestras se emplean colorantes fluorescentes, uno de ellos es el bromuro de etidio, que tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas observándose de color rojo al transiluminador. Es teratogénico, mutagénico y cancerígeno por lo que debe manejarse con extremo cuidado y siempre con uso de guantes. Actualmente existen otros colorantes como SYBR®-Green que es más fluorescente que el bromuro de etidio y resulta una alternativa menos peligrosa y tóxica.^{39 y 40}

Planteamiento del problema

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un grave problema de salud pública, en particular por la producción de β -lactamasas. Estas enzimas hidrolizan antibióticos β -lactámicos, los cuales son utilizados comúnmente para tratar infecciones a nivel del tracto urinario, del torrente sanguíneo y de líquidos biológicos como cefalorraquídeo y peritoneal.

El uso irracional de antibióticos y los tratamientos empíricos utilizados por los médicos son la principal causa de resistencia bacteriana, por lo que las alternativas farmacológicas cada vez se ven más reducidas y el empleo de carbapenems es una de las últimas alternativas. Por ello es importante identificar los tipos de β -lactamasa generados en el ambiente hospitalario para su control y manejo.

Por lo anteriormente mencionado, se plantean las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Cuáles son los genes productores de β -lactamasas que inducen a la resistencia bacteriana en cepas de *E. coli* obtenidas en el área de neonatología en el Hospital Infantil de México, Federico Gómez?
- ¿Existe relación entre el tipo de muestra biológica, el sexo, y el o los tipos de β -lactamasas encontradas?

Hipótesis

Si se identifican de manera molecular los genes productores de los diferentes tipos de β -lactamasas en cepas de *E. coli* causantes de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales, entonces comprenderemos su distribución entre cepas de esta bacteria, frecuentemente aislada en nuestro ámbito hospitalario.

Objetivos

GENERAL

Identificar y determinar los genes prevalentes para las β -lactamasas que inducen a la resistencia bacteriana en cepas de *E. coli* obtenidas de neonatos en la UCIN del HIMFG.

PARTICULARES

- Identificar y caracterizar las cepas de *E. coli* determinando presencia y ausencia de los diferentes genes que producen los diferentes tipos de β -lactamasa en estudio.
- Identificar los genes más frecuentes que codifican para β -lactamasas en las cepas de estudio.
- Determinar si existe alguna asociación entre las variables clínicas sexo, tipo de muestra biológica y el o los tipos de β -lactamasas encontradas.

Material y métodos

Tipo de estudio: Experimental, descriptivo transversal y prolectivo.

Población de estudio: La muestra estuvo constituida por 58 cepas de *E. coli* aisladas de cultivos causantes de IAAS provenientes de neonatos atendidos en la UCIN del HIMFG ubicado en la Ciudad de México, durante el periodo comprendido entre enero del 2015 a diciembre del 2016. El procedimiento mediante el cual se procesaron las muestras, se encuentra en la figura 10.

Criterios de selección:

Inclusión:

- Cepas de *E. coli* aisladas de neonatos hospitalizados en la UCIN del HIMFG y asociadas a IAAS.

Exclusión:

- Cepas no pertenecientes al género-especie *E. coli*
- Cepas que al sembrarse estén contaminadas o no viables (sin crecimiento).

Variables

- **Independiente:** Cepas de *E. coli*
- **Dependiente:** Presencia de amplificadores de los genes para los diferentes tipos de β -lactamasa.

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO DE VARIABLE	CATEGORÍA
Cepa productora de β -lactamasas	Bacterias que producen enzimas inactivadoras de β -lactámicos	Cualitativa nominal	Positiva Negativa

Técnicas: Extracción de DNA, PCR en punto final y electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Análisis estadístico: Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS versión 15 para Windows por medio de frecuencias y porcentajes, además de la prueba de χ^2 , como medida de comparación entre variables con un valor de $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo.

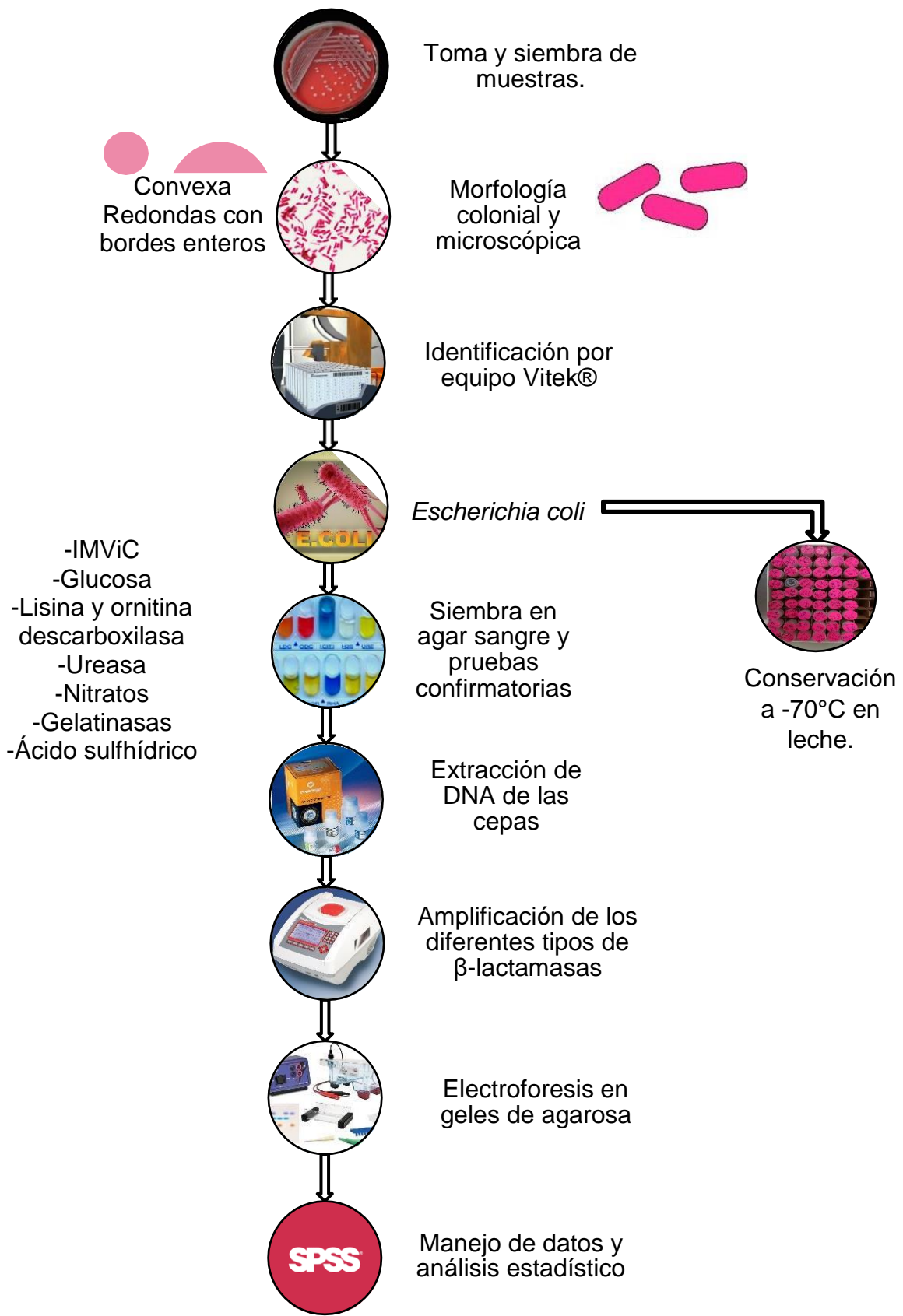


Figura 10. Esquema general de trabajo.

Toma y siembra de muestras: Se llevó a cabo por personal del Laboratorio Central del Hospital Infantil de México, Federico Gómez.

Identificación de la bacteria: La identificación de las cepas de *E. coli* se realizó por medio del equipo *Vitek*® en el Laboratorio Central del HIMFG, a partir de diferentes tipos de cultivo (urocultivo, hemocultivo y cultivo de líquidos biológicos) obteniendo 58 muestras; el almacenamiento de todas las cepas para conservación se llevó a cabo en leche y ultracongelación a -70°C.

El equipo *Vitek*® es un sistema automatizado de identificación bacteriana y estudio de sensibilidad antimicrobiana. La identificación de las bacterias se basa en la inoculación (por capilaridad) de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas cuyos resultados se comparan en una base de datos.⁴¹

Una vez identificadas, cada cepa fue etiquetada y rotulada de acuerdo a una clave interna del laboratorio de Infectología como se muestra a continuación:

IAAS-N. (número) *E. coli*

IAAS-N: Infecciones asociadas a la atención en salud-neonatos.

Número: Asignado por la directora de tesis, Dra. en C. Leticia Verónica Jiménez Rojas.

Nombre abreviado del microorganismo *Escherichia coli*.

Con el fin de protección de datos personales, se ordenaron las cepas de menor a mayor de acuerdo con la clave asignada en el hospital y se les reasignó un número consecutivo (1-58).

Siembra en agar sangre y pruebas confirmatorias: Realizadas con el fin de confirmar que las cepas conservadas en leche coincidan con el género y especie *Escherichia coli*.

➤ IMViC (Indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citratos)

- a) Indol: El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidada por algunas bacterias para formar indol. En este proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasas. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovac's o Erlich, para originar un compuesto color rojo, indicativo de una prueba positiva.
- b) Rojo de metilo Voges-Proskauer: La glucosa puede ser metabolizada por los microorganismos a través de distintas vías metabólicas. Según la vía utilizada, se originarán productos finales ácidos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico), o productos neutros (acetil-metil-carbinol). El rojo de metilo detecta los productos ácidos, mientras que el α -naftol y el hidróxido de potasio evidencian los productos finales neutros. Los productos ácidos hacen virar el indicador rojo de metilo de rojo a amarillo y en presencia de acetil-metil-carbinol se desarrolla un color rojo.
- c) Citrato de Simmons: Se caracteriza por diferenciar los microorganismos en base a su capacidad para utilizar citrato como única fuente de carbono y el fosfato monoamónico como única fuente de nitrógeno. El metabolismo de citrato se realiza por las bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarbóxico generando productos alcalinos que hacen virar el indicador azul de bromotimol de verde a azul de Prusia.
- d) Carbohidratos (por ejemplo, glucosa): Determina la capacidad del organismo para emplear o degradar un hidrato de carbono específico, produciendo ácido, y en algunos casos gas haciendo virar el indicador rojo de fenol, de rojo a amarillo.

- e) Lisina descarboxilasa: Se basa en la descarboxilación de la lisina, dando como origen una amina llamada cadaverina que alcaliniza el medio haciendo virar el indicador púrpura de bromocresol de amarillo a violeta.
- f) Ornitina descarboxilasa: Se basa en la descarboxilación de la ornitina, dando como resultado putrescina que alcaliniza el medio, haciendo virar el indicador púrpura de bromocresol, de amarillo a violeta.
- g) Urea de Christensen: Se basa en la hidrólisis de urea por la presencia de ureasas que liberan amoníaco y dióxido de carbono que alcalinizan el medio, haciendo virar el indicador rojo de fenol, de amarillo a rojo.
- h) Nitratos: Determina la capacidad de un organismo de reducir nitrato a nitrito o hasta nitrógeno libre. Esta prueba permite detectar una respiración anaerobia, que emplea nitrato como aceptor final de electrones. Para esta prueba se requiere de α -naftilamina y ácido sulfanílico, además de zinc. Una prueba positiva para la reducción a nitritos se evidencia por un color rojo después de adicionar α -naftilamina y ácido sulfanílico; mientras que la reducción a nitrógeno libre se evidencia por medio de zinc sin presencia de color.
- i) Gelatinasas: Se basa en la presencia de la enzima gelatinasa capaz de hidrolizar la proteína de la gelatina que le permite gelificar, por lo que un resultado positivo implica la pérdida de gelificación.
- j) Ácido sulfhídrico: Se basa en la producción bacteriana de ácido sulfhídrico, que se identifica por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir de tiosulfato de sodio y sulfato de hierro y amonio.⁴²

Extracción de DNA: La extracción de DNA de todas las cepas de *Escherichia coli* se realizó con el estuche comercial “Genomic DNA Purification” según su protocolo de purificación rápida Wizard®, con algunas modificaciones, para muestras bacterianas:

1. Descongelar y sembrar las cepas en agar sangre al 5% por estría en cuatro cuadrantes, incubar a 37°C durante 24 horas.
2. Enumerar tubos Eppendorf de 1.5mL de acuerdo a cada cepa.
3. Añadir 1mL de “Lysis Cell Solution” en cada tubo, en condiciones de esterilidad.
4. Tomar de cada cepa aproximadamente de 3-5 colonias y colocarlas en su tubo Eppendorf por difusión.
5. Mezclar vigorosamente los tubos y centrifugar a 10,000rpm/2minutos.
6. Decantar el sobrenadante y repetir los pasos 3-5.
7. Adicionar 200µL de “Nucleic Lysis Solution” en cada tubo.
8. Mezclar vigorosamente los tubos e incubar a 80°C 5 minutos o hasta que la solución se vuelva transparente.
9. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente.
10. Añadir 10µL de RNAsa e incubar 15 minutos a 37°C.
11. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente.
12. Adicionar 100µL de “Protein Precipitation Solution”.
13. Mezclar durante 10-15 segundos.
14. Incubar en hielo por 5 minutos.
15. Etiquetar tubos Eppendorf de 1mL con el número de cepas correspondientes.
16. Adicionar 200µL de isopropanol frío a los tubos de 1mL.
17. Sacar los tubos de 1.5mL del hielo y centrifugar a 10,000rpm/5minutos.
18. Transferir el sobrenadante a los tubos Eppendorf que contienen el isopropanol frío.
19. Mezclar suavemente por inversión varias veces hasta observar la formación de DNA.

20. Centrifugar a 10,000 rpm/2 minutos y decantar el sobrenadante.
21. Lavar con etanol al 70% el botón de DNA dos veces.
22. Decantar el sobrenadante y dejar secando toda la noche.
23. Adicionar 50µL de “Rehydration Solution” y dejar reposar una hora.
24. Congelar a -20°C hasta su posterior uso.

Preparación de mezclas de DNA de cepas: Se prepararon 7 mezclas de DNA de las 58 cepas de *E. coli* con el fin de optimizar material y trabajo, de tal manera que las mezclas de DNA negativas se descartaban y se preparó la mezcla de reacción para las cepas individuales de las mezclas de DNA que resultaron positivas (cuadro 5).

Cuadro 5. Mezclas de DNA realizadas con las cepas de *E.coli* para optimizar material y trabajo de las ocho PCR multiplex.

Número de pool	Cepas que incluyó
Pool 1	1-9.
Pool 2	10-18.
Pool 3	19-27.
Pool 4	28-35.
Pool 5	36-38, 42, 44-47.
Pool 6	39, 41, 43, 54-58.
Pool 7	43, 48-52.

Reacción en cadena de la polimerasa: Realizar las amplificaciones mediante PCRs multiplex de punto final con controles negativo y positivo en cada corrida (cuadro 6).

Se llevaron a cabo un total de ocho PCRs multiplex para todas las cepas de *E. coli*.

La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 25µL según las condiciones descritas en el protocolo GoTaq® Green Master Mix de Promega; Buffer de reacción pH 8.5, 400µM dNTPs y 3mM de MgCl₂.

Las PCR multiplex se realizaron en un termociclador digital AXYGEN Modelo: Maxygen II.

Los oligonucleótidos, marca IDT, se diluyeron hasta obtener una concentración de 50ng/µL.

Cuadro 6. Cantidades de reactivos por cada tubo de reacción de PCR.

Mezcla base o Master Mix (MM)	12.5µL
Oligonucleótidos	2µL de mezcla de oligonucleótidos
Agua (H₂O)	Cuanto baste para 25µL
DNA	2µL

Procedimiento general para todas las PCR:

1. Preparar la campana de flujo laminar, realizando previa limpieza con alcohol, posteriormente colocar material a emplear (gradillas, puntas, pipetas y tubos), y radiar con UV por 10-15 minutos.
2. Enumerar los tubos correspondientes al número de cepas a analizar en tubos para PCR (58 cepas + un control negativo+ un control positivo= 60).

3. Ajustar las cantidades de reactivos por número de muestras (con un total de 60).
4. Etiquetar con mezcla de reacción un tubo Eppendorf de 1.5mL y adicionar las cantidades de reactivo correspondientes para 60 muestras sin adicionar DNA.
5. Adicionar en cada tubo para PCR 23 μ L de mezcla de reacción.
6. Incorporar a cada tubo 2 μ L de DNA (mezclar bien succionando y expulsando el líquido de la punta sin hacer burbujas), revisando que la numeración tubo-cepa sea la correspondiente.
7. Cerrar los tubos y colocarlos en el termociclador con las condiciones establecidas para la PCR e iniciarla (ver cuadros 5 y 6).
8. Al finalizar, se colocan los tubos con amplificados en una gradilla y se congelan a -20°C.
9. Analizar el producto de amplificación por electroforesis en gel de agarosa.

Cuadro 7. Oligonucleótidos utilizados en las ocho PCR multiplex grupo específicas para los diferentes tipos de β -lactamasas.^{37 y 43}

PCR y β -lactamasa objetivo	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Tamaño del amplificado en pares de bases (pb).
I⁴³ TEM-1 y TEM-2, SHV-1, OXA-1, OXA-4 y OXA-30	TEM-SO-F	CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT C	800
	TEM-SO-R	CGT TCA TCC ATA GTT GCC TGA C	
	SHV-SO-F	AGC CGC TTG AGC AAA TTA AAC	713
	SHV-SO-R	ATC CCG CAG ATA AAT CAC CAC	
	OXA-SO-F	GGC ACC AGA TTC AAC TTT CAA G	564
	OXA-SO-R	GAC CCC AAG TTT CCT GTA AGT G	
II⁴³ CTXM grupo 1 (1,3 y 15), 2 (2), 9 (9 y 14) y 8/25 (8,25, 26 y 39-41)	CTXMGp1-F	TTA GGA ART GTG CCG CTG YA	688
	CTXMGp1-2-R	CGA TAT CGT TGG TGG TRC CAT	404
	CTXMGp2-F	CGT TAA CGG CAC GAT GAC	
	CTXMGp9-F	TCA AGC CTG CCG ATC TGG T	561
	CTXMGp9-R	TGA TTC TCG CCG CTG AAG	
	CTXMGp8/25-F	AAC RCR CAG ACG CTC TAC	326
CTXMGp8/25-R	TCG AGC CGG AAS GTG TYA T		
III⁴³ IMP (9,16, 18,22 y 25), VIM (1 y 2) y KPC (1 y 5)	IMP-F	TTG ACA CTC CAT TTA CDG	139
	IMP-R	GAT YGA GAA TTA AGC CAC YCT	
	VIM-F	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A	390
	VIM-R	CGA ATG CGC AGC ACC AG	
	KPC-F	CAT TCA AGG GCT TTC TTG CTG C	538
	KPC-R	ACG ACG GCA TAG TCA TTT CG	
IV⁴³ GES (1-9 y 11), PER (1 y 3) y VEB (1-6)	GES 1,9,11-F	AGT CGG CTA GAC CGG AAA G	399
	GES 1,9,11-R	TTT GTC CGT GCT CAG GAT	
	PER 1 y 3-F	GCT CCG ATA ATG AAA GCG T	520
	PER 1 y 3-R	TTC GGC TTG ACT CGG CTG A	
	VEB 1-6-F	CAT TTC CCG ATG CAA AGC GT	648
	VEB 1-6-R	CGA AGT TTC TTT GGA CTC TG	
V³⁷ SME (1-3) e IMI (1-3 y NMC-A)	SME-GAM-F	GAG GAA GAC TTT GAT GGG AGG AT	334
	SME-GAM-R	TCC CCT CAG GAC CGC CAA G	
	IMI-GS-F	GGT GTC TAC GCT TTA GAC ACT GGC TC	536
	IMI-GS-R	GCA CGA ATA CGC GCT GCA CCG G	
VI³⁷ GIM-1, SIM-1, NDM-1 Y SPM-1	GIM-GBM-F	CGT TGC CAG CTT TAG CTC AGG	279
	GIM-GBM-R	GCA ACT TGA TAC CAG CAG TGC G	
	SIM-GBM-F	TTG CGG AAG AAG CCC AGC CAG	613
	SIM-GBM-R	GCG TCT CCG ATT TCA CTG TGG C	
	NDM-GBM-F	CCC GGC CAC ACC AGT GAC A	129
	NDM-GBM-R	GTA GTG CTC AGT GTC GGC AT	
	SPM-GBM-F	GGG TGG CTA AGA CTA TGA AGC C	447
	SPM-GBM-R	GCC GCC GAG CTG AAT CGG	

Cuadro 7 (continuación). Oligonucleótidos utilizados en las ocho PCR multiplex grupo específicas para los diferentes tipos de β -lactamasas.^{37 y 43}

PCR	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Tamaño del amplificado en pares de bases (pb).
VII³⁷ OXA-23^a, OXA-24^b y OXA-48^c	O23-GDM-F	CCT GAT CGG ATT GGA GAA CCA G	516
	O23-GDM-R	GAT GCC GGC ATT TCT GAC CG	
	O24-GDM-F	GGT CGA TAA TTT TTG GTT AGT TGG CCC	237
	O24-GDM-R	CCA TTA GCT TGC TCC ACC CAA CCA G	
	O48-GDM-F	CCA AGC ATT TTT ACC CGC ATC KAC C	389
	O48-GDM-R	GYT TGA CCA TAC GCT GRC TGC G	
VIII³⁷ OXA-1^d, OXA-2^e y OXA-51^f	O1-GD2M-F	CAA CGG ATT AAC AGA AGC ATG GCT CG	198
	O1-GD2M-R	GCT GTR AAT CCT GCA CCA GTT TTC CC	
	O2-GD2M-F	GAC CAA GAT TTG CGA TCA GCA ATG CG	256
	O2-GD2M-R	CYT TGA CCA AGC GCT GAT GTT CYA CC	
	O51-GD2M-F	GAC CGA GTA TGT ACC TGC TTC GAC C	497
	O51-GD2M-R	GAG GCT GAA CAA CCC ATC CAG TTA ACC	

Las letras R y F en el nombre del primer significan, R: Reverse y F: Forward.

Variantes: ^a23, 27, 49, 73, 133, 146. ^b24, 33, 40, 25, 26, 72, 139, 160 y (OXA-43 y 182) ^c48, 54 y (OXA-181)

^d1, 30, 31, 47 ^e2, 3, 15, 21, 32, 34, 36, 46, 53, 141, 144, 161 y (OXA-118 y 119) ^fGrupo 51 (51, 64-71, 75-80, 82-84, 86-95, 98-100, 106-113, 115-117, 128, 130-132, 138, 144, 148-150 y 172-180).

En las secuencias: Y= T o C, R= A o G, S= G o C, D= A o G o T, K= T o G.

Cuadro 8. Condiciones necesarias para realizar las ocho PCR multiplex.

PCR I, II, VI y VIII.	Temperaturas				Tiempo	Número de ciclos
	PCR III	PCR IV	PCR V	PCR VII		
95°C	94°C	94°C	94°C	95°C	5 minutos	30x
95°C	94°C	94°C	94°C	95°C	40 segundos	
60°C	55°C	57°C	60°C	59°C	40 segundos	
72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	1 minuto	
72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	7 minutos	
4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	Término	

Electroforesis en gel de agarosa: Los amplificadores de PCR se corrieron electroforéticamente en geles de agarosa al 2% con TBE al 0.5%.

Preparación de TBE 0.5%

1. Pesar 27.5g de ácido bórico
2. Pesar TRIS 54g
3. Añadir 20mL de EDTA (pH 7.6) 0.5M
4. Cuanto baste de agua para 1L.

Nota: En caso de no disolverse, introducir a la autoclave 15 minutos a 121°C o 15lb de presión. Diluir el TBE que queda al 5% tomando 100mL de éste y adicionando 900mL de agua estéril para que su concentración final sea 0.5%.

Preparación de gel de agarosa:

1. Pesar 0.8g de agarosa y colocarlos en un matraz Erlenmeyer de 125mL.
2. Medir 40mL de TBE al 0.5% y adicionarlos al matraz.
3. Mezclar y meter al horno o calentar para disolver la agarosa.
4. Una vez disuelta dejar enfriar hasta que el calor sea soportable al tacto y sin que se generen vapores, para adicionar 3µL de bromuro de etidio 1:10.
5. Colocar los peines, con el número de pozos a emplear, en el molde de acrílico para geles de electroforesis.
6. Verter en el molde y dejar enfriar.
7. Una vez gelificado, retirar los peines.
8. Colocar el molde en la cámara de electroforesis y adicionar TBE al 0.5% hasta la marca de llenado.

9. Adicionar en cada pozo los amplificadores de la PCR dejando los primeros pozos libres de cada fila para el marcador de 100pb.
10. Adicionar en el primer pozo 5 μ L de marcador de 100pb Promega.
11. Correr las muestras a 70V y 45mA para amplificadores entre 100-300pb o a 90V y 45mA para amplificadores mayores a 400pb por 1 hora.
12. Una vez terminado el corrimiento, colocar el gel en un transiluminador UVP y observar.

Resultados

De un total de 58 muestras positivas a *E.coli*, aisladas de neonatos en la UCIN del HIMFG en el periodo comprendido entre enero de 2015 a diciembre de 2016, se obtuvo un 56.9% de neonatos que pertenecían al sexo masculino y 43.1% de neonatos que pertenecían al sexo femenino, con una edad promedio de 30.26 días. La muestra biológica que presentó mayor frecuencia de presencia de *E.coli* fue la orina, con un 62% del total de las muestras (cuadro 9 y figura 11).

Cuadro 9. Medidas descriptivas de la población de estudio de acuerdo al sexo y al tipo de cultivo de cepas de *E.coli* provenientes de neonatos en la UCIN del HIMFG (2015-2016).

SEXO	TIPO DE CULTIVO			TOTAL
	Hemocultivo (H)	Urocultivo (U)	Varios (V)	
Masculino (M)	4 (12.1%)	21 (63.7%)	8 (24.2%)	33 (56.9%)
Femenino (F)	6 (24%)	15 (60%)	4 (16%)	25 (43.1%)
TOTAL	10 (17.2%)	36 (62%)	12 (20.7%)	58 (100%)

Edad promedio de los neonatos: 30.26 días.

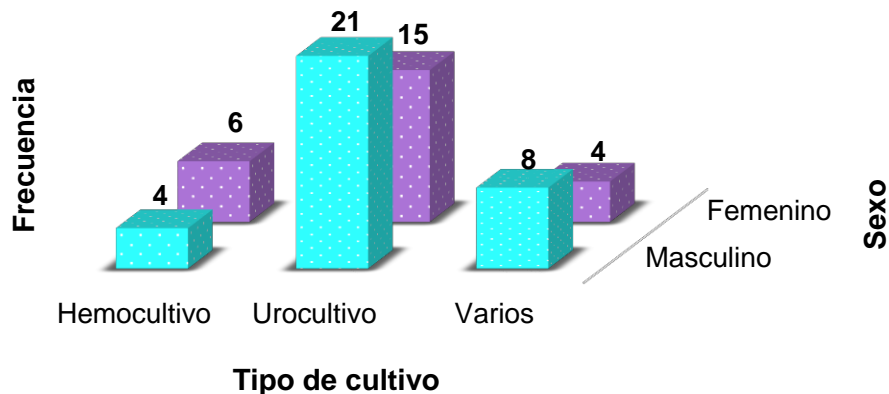


Figura 11. Frecuencias de neonatos de acuerdo al tipo de cultivo de cepas de *E.coli* provenientes de neonatos en la UCIN del HIMFG (2015 a 2016).

A continuación, se detallan las medidas descriptivas generales y de acuerdo con el sexo y el tipo de cultivo del paciente para las ocho PCR multiplex de las 58 cepas de *E.coli*, aisladas de neonatos en la UCIN en el periodo comprendido entre enero del 2015 a diciembre del 2016, analizadas en el laboratorio de Infectología área de Bacteriología, en el HIMFG (figuras 12-15).

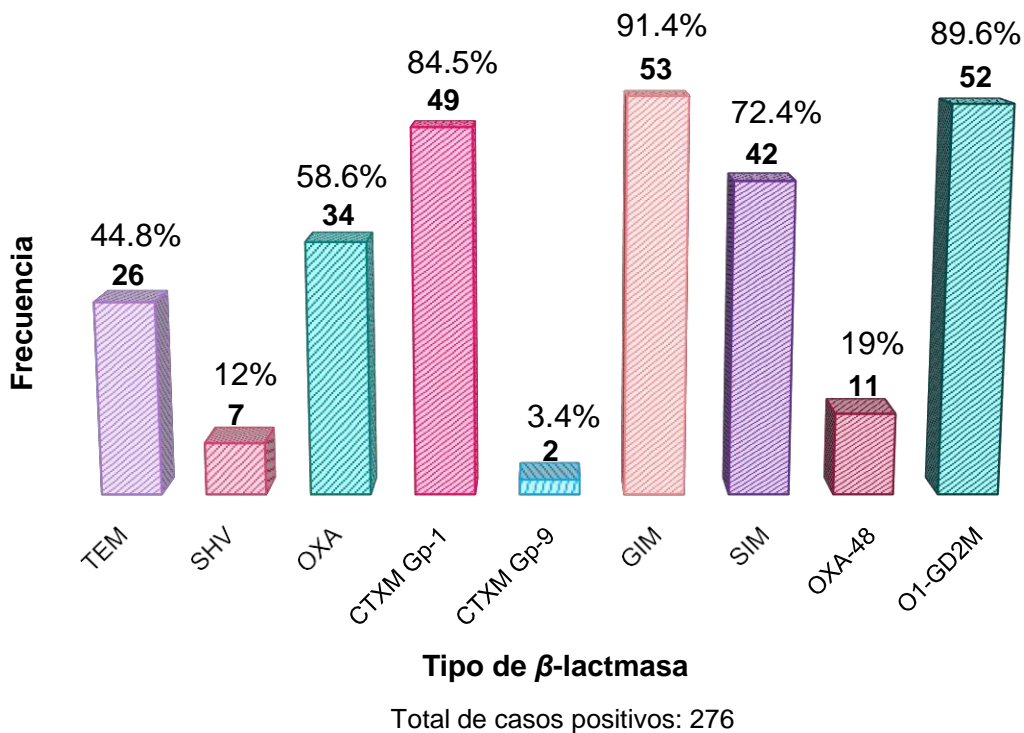
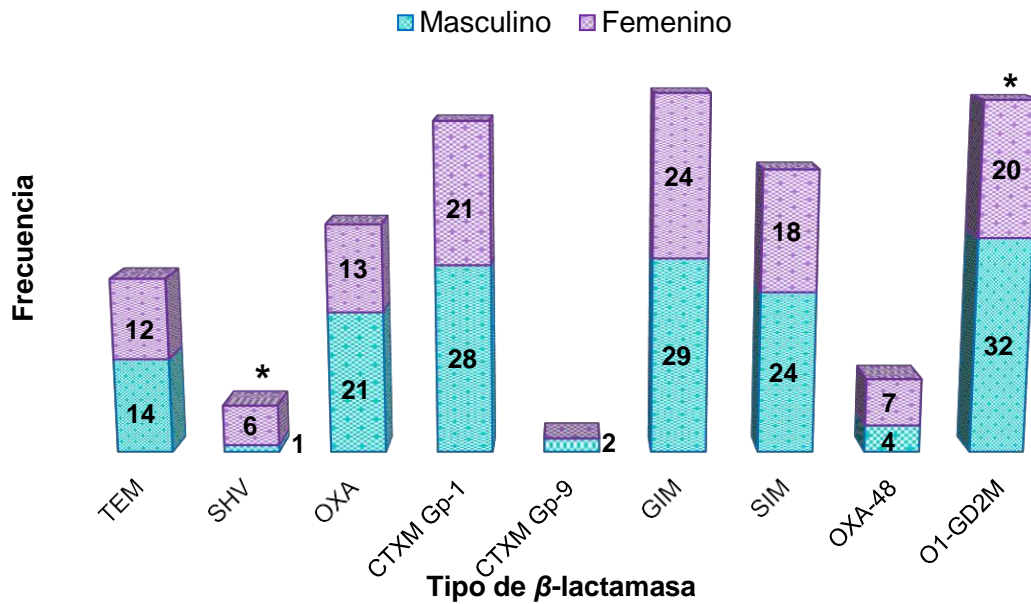
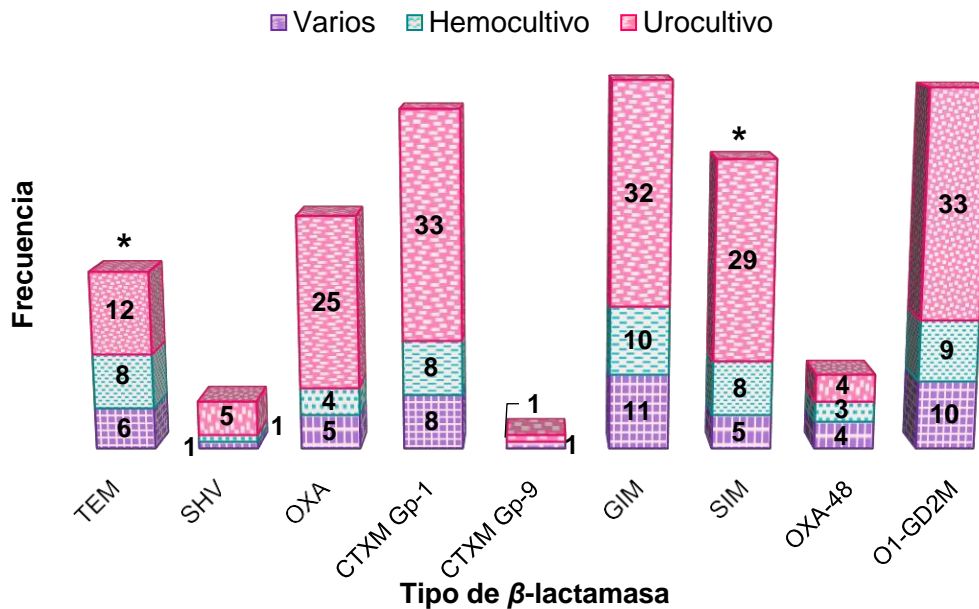


Figura 12. Frecuencias de cepas de *E.coli* positivas a los genes productores de los tipos de β -lactamasas por PCR multiplex, aisladas de neonatos en la UCIN del HIMFG (2015-2016).



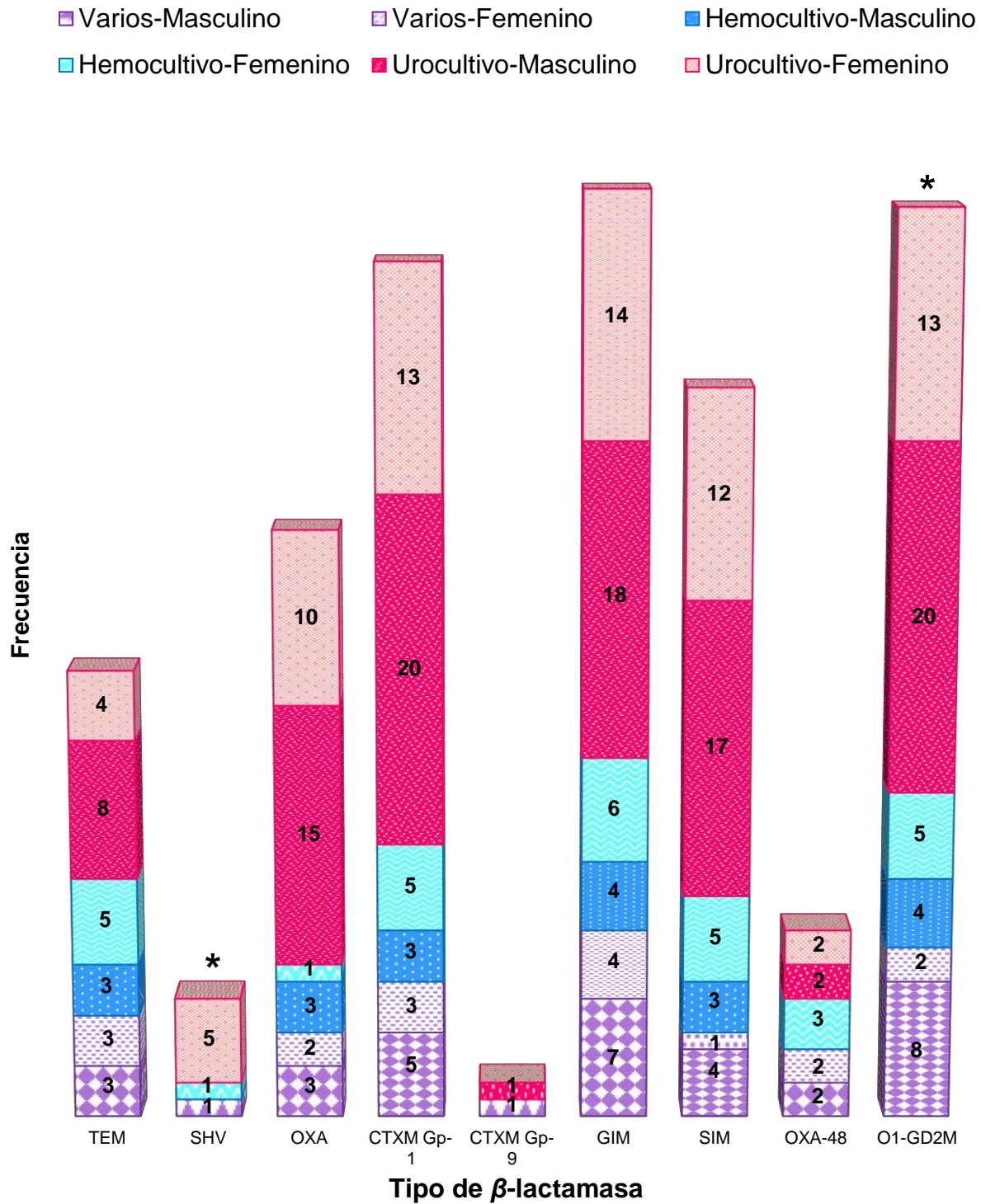
SHV y Sexo: $\chi^2= 5.894$ con $p= 0.015$
 O1-GD2M y Sexo: $\chi^2=4.416$ con $p=0.036$

Figura 13. Frecuencias de cepas de *E.coli* positivas a β -lactamasas por PCR multiplex, de acuerdo al sexo del neonato, aisladas en la UCIN del HIMFG (2015-2016).



TEM y Cultivo: $\chi^2= 7.055$ con $p= 0.029$
 SIM y Cultivo: $\chi^2=7.162$ con $p=0.028$

Figura 14. Frecuencias de cepas de *E.coli* positivas a β -lactamasas por PCR multiplex, de acuerdo al tipo de cultivo del neonato, aisladas en la UCIN del HIMFG (2015-2016).



SHV, Urocultivo y Sexo: $\chi^2= 8.129$ con $p= 0.004$
 O1-GD2M, Varios y Sexo: $\chi^2=4.8$ con $p=0.028$

Figura 15. Frecuencias de cepas de *E.coli* positivas a β -lactamasas por PCR multiplex, de acuerdo al tipo de cultivo y sexo del neonato, aisladas en la UCIN del HIMFG (2015-2016).

Al observar la asociación enzimática en las cepas de *E.coli*, se agruparon en perfiles asignados de acuerdo con la frecuencia que presentaban. El total de perfiles encontrados fue de 25, dentro de los cuales el más común está representado con las enzimas tipo OXA + CTXM Gp-1 + GIM + SIM + O1-GD2M, con una frecuencia de 18 cepas, aisladas en su mayoría de urocultivos (cuadro 10).

Cuadro 10. Perfiles de β -lactamasa encontrados de acuerdo al tipo de cultivo y sexo para cepas positivas de *E.coli* provenientes de neonatos en la UCIN del HIMFG (2015-2016).

Número de perfil	Perfil de β -lactamasas	Cantidad de cepas que lo presentan	Tipo de cultivo			SEXO	
			H	U	V	M	F
I	OXA CTXM-Gp1 GIM SIM O1-GD2M	18	2	15	1	10	8
II	TEM OXA CTXM-Gp1 GIM SIM O1-GD2M	6	1	4	1	4	2
III	TEM CTXM-Gp1 GIM SIM O1-GD2M	5	2	2	1	3	2
IV	TEM CTXM-Gp1 GIM O1-GD2M	3	1	2	0	3	0
V	OXA CTXM-Gp1 GIM SIM OXA-48 O1-GD2M	2	0	2	0	1	1
VI	SHV CTXM-Gp1 GIM SIM O1-GD2M	2	0	1	1	1	1
VII	TEM SHV CTXM-Gp1 GIM OXA-48	2	0	2	0	0	2
VIII	TEM CTXM-Gp1 GIM OXA-48	2	0	1	1	1	1
IX	OXA CTXM-Gp1 SIM O1-GD2M	2	0	2	0	2	0
X	GIM OXA-48 O1-GD2M	1	0	0	1	1	0
XI	TEM CTXM-9 GIM OXA-48 O1-GD2M	1	0	0	1	1	0
XII	GIM O1-GD2M	1	0	0	1	1	0
XIII	TEM GIM SIM OXA-48 O1-GD2M	1	1	0	0	0	1
XIV	OXA CTXM-Gp1 GIM O1-GD2M	1	0	0	1	0	1
XV	TEM OXA GIM SIM O1-GD2M	1	1	0	0	1	0
XVI	TEM SHV	1	0	1	0	0	1
XVII	SHV CTXM-Gp1 GIM O1-GD2M	1	0	1	0	0	1
XVIII	TEM OXA GIM O1-GD2M	1	0	0	1	0	1
XIX	TEM OXA CTXM-Gp1 O1-GD2M	1	0	1	0	1	0
XX	TEM CTXM-Gp1 GIM SIM OXA-48 O1-GD2M	1	1	0	0	0	1
XXI	SHV GIM SIM O1-GD2M	1	0	1	0	0	1
XXII	TEM CTXM-Gp1 GIM SIM OXA-48	1	0	0	1	0	1
XXIII	OXA CTXM-Gp1 O1-GD2M	1	0	0	1	1	0
XXIV	OXA CTXM-9 GIM SIM O1-GD2M	1	1	0	0	1	0
XXV	CTXM-Gp1 GIM SIM O1-GD2M	1	0	1	0	1	0

H: Hemocultivo U: Urocultivo V: Varios

En seguida, se muestran los geles de electroforesis con los amplificados correspondientes a cada PCR multiplex a la que resultaron positivas las cepas de *E.coli* (figuras 16-21).

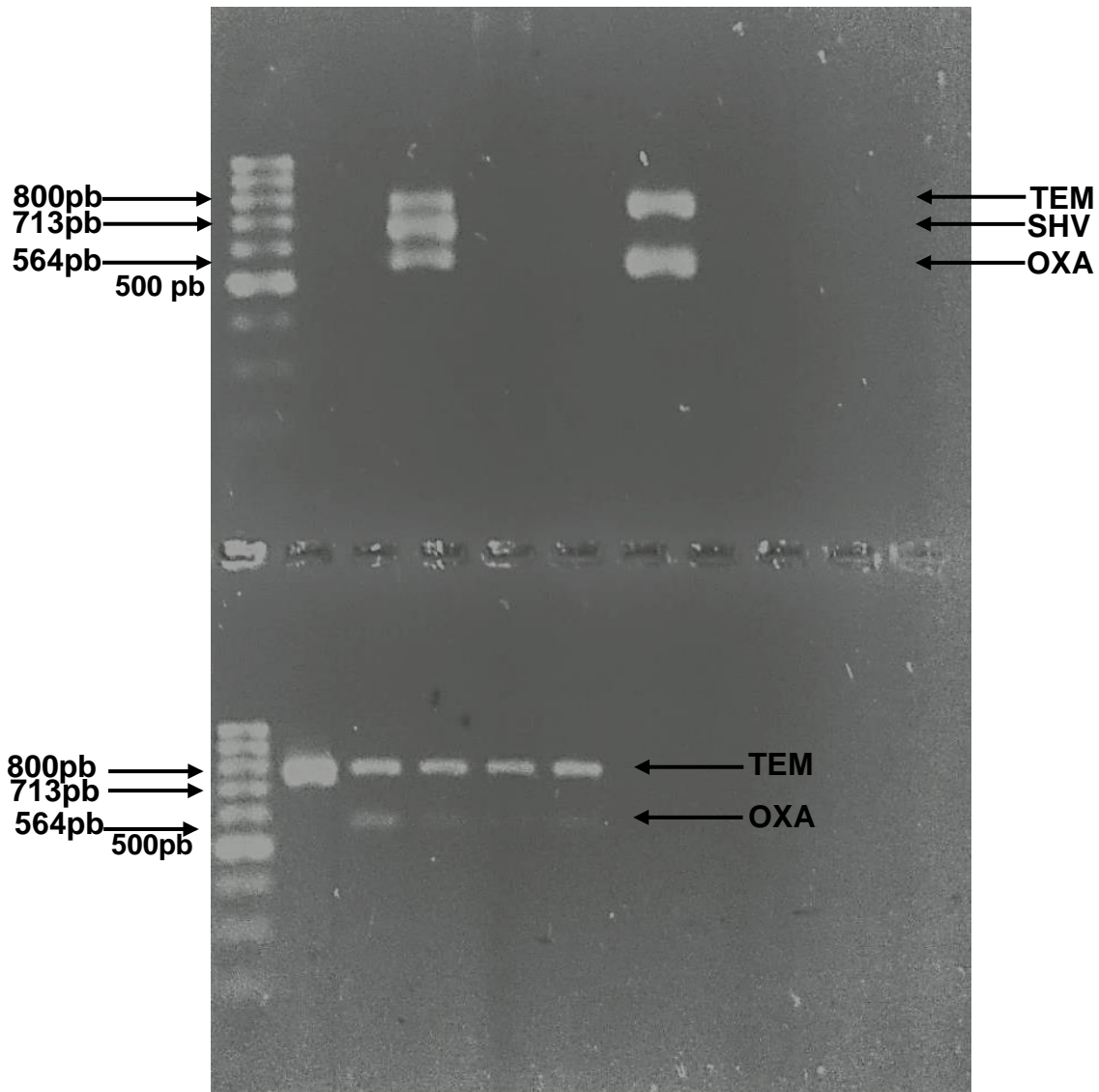


Figura 16. Amplificados de PCR I multiplex para los genes de β -lactamasas tipo TEM, SHV y OXA. Carril 1 superior e inferior: Marcador de peso molecular Promega 100pb, Carril 2: control negativo, carril 3: control positivo TEM + OXA + SHV (cepa de *Klebsiella pneumoniae*); carriles superiores 4-6 y carriles inferiores 2-6 cepas de *E. coli* provenientes de neonatos hospitalizados en la UCIN del HIMFG (2015-2016).

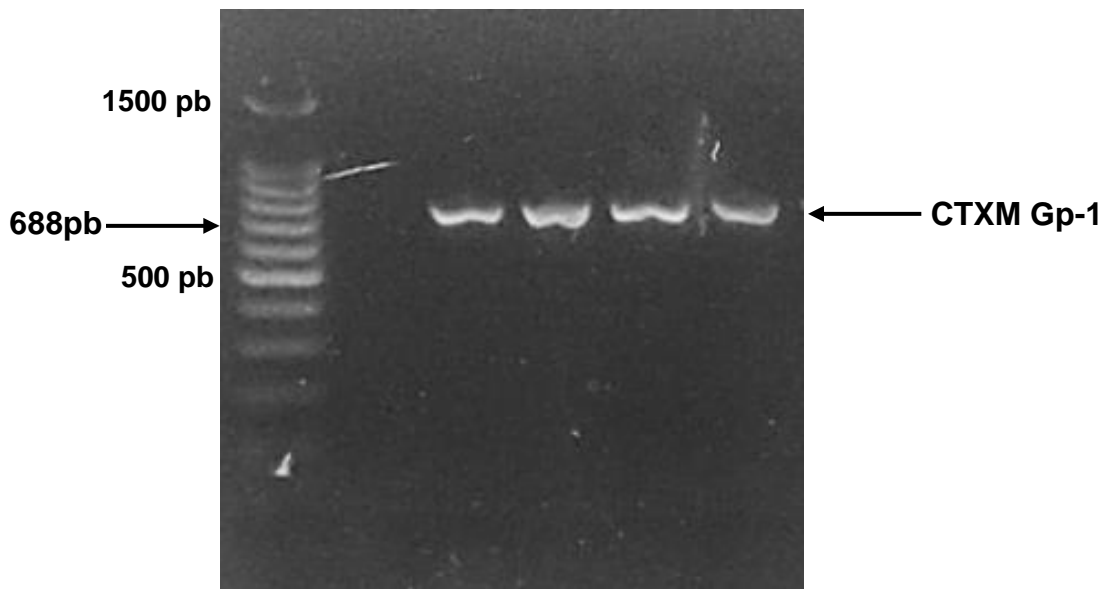


Figura 17. Amplificados de PCR II multiplex para los genes de β -lactamasas tipo CTXM-Gp-1, CTX-MGp-9 y CTX-MGp-8/25. Carril 1: Marcador de peso molecular Promega 100pb, Carril 2: control negativo, carril 3: control positivo CTX-MGp-1 (cepa de *Klebsiella pneumoniae*); carriles 4-6 cepas de *E. coli* provenientes de neonatos hospitalizados en la UCIN del HIMFG (2015-2016).

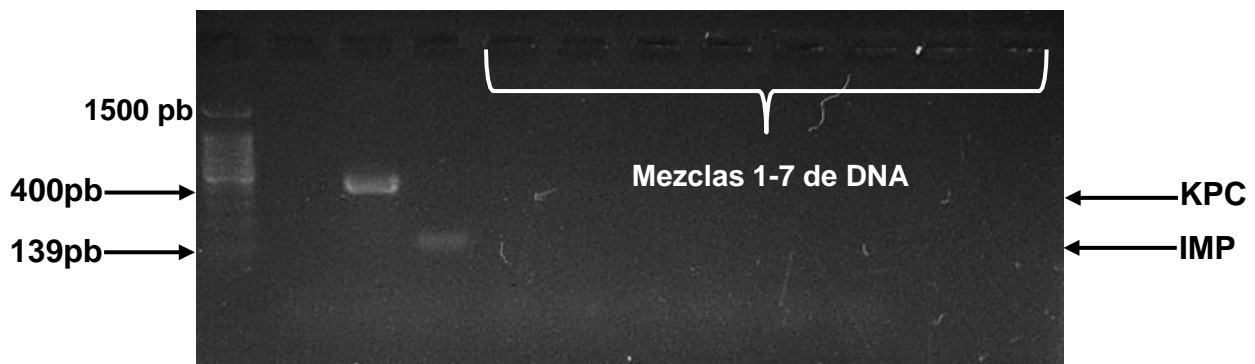


Figura 18. Amplificados de PCR III multiplex para los genes de β -lactamasas tipo IMP, VIM y KPC. Carril 1: Marcador de peso molecular Promega 100pb, Carril 2: control negativo, carril 3: control positivo KPC (cepa de *Klebsiella pneumoniae*), carriles 4 control positivo IMP (de cepa de *Burkholderia cepacea*), carriles 5-10 mezclas de DNA de cepas de *E. coli* provenientes de neonatos hospitalizados en la UCIN del HIMFG (2015-2016).

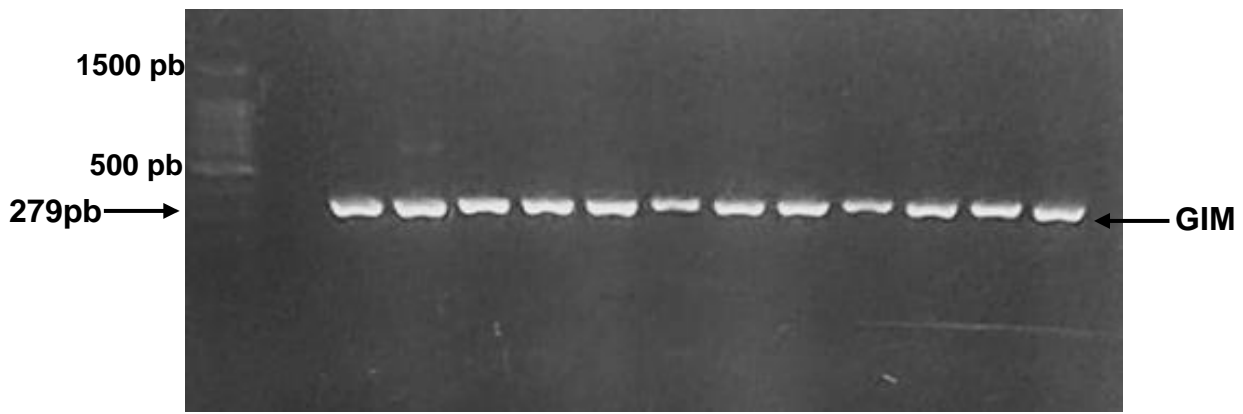


Figura 19. Amplificados de PCR VI para el gen de β -lactamasa tipo GIM. Carril 1: Marcador de peso molecular Promega 100pb, Carril 2: control negativo, carriles 3-14 cepas de *E. coli* provenientes de neonatos hospitalizados en la UCIN del HIMFG (2015-2016).

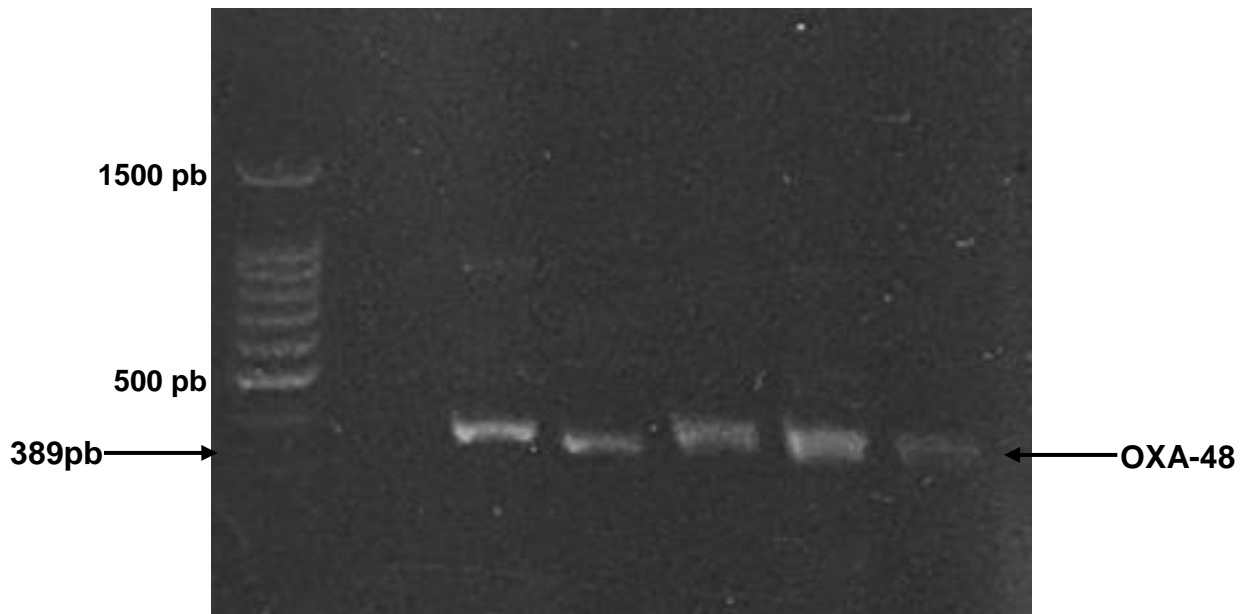


Figura 20. Amplificados de PCR VII multiplex para los genes de β -lactamasa tipo OXA-23, OXA-24 y OXA-48. Carril 1: Marcador de peso molecular Promega 100pb, Carril 2: control negativo, carriles 3-7 cepas de *E. coli* provenientes de neonatos hospitalizados en la UCIN del HIMFG (2015-2016).

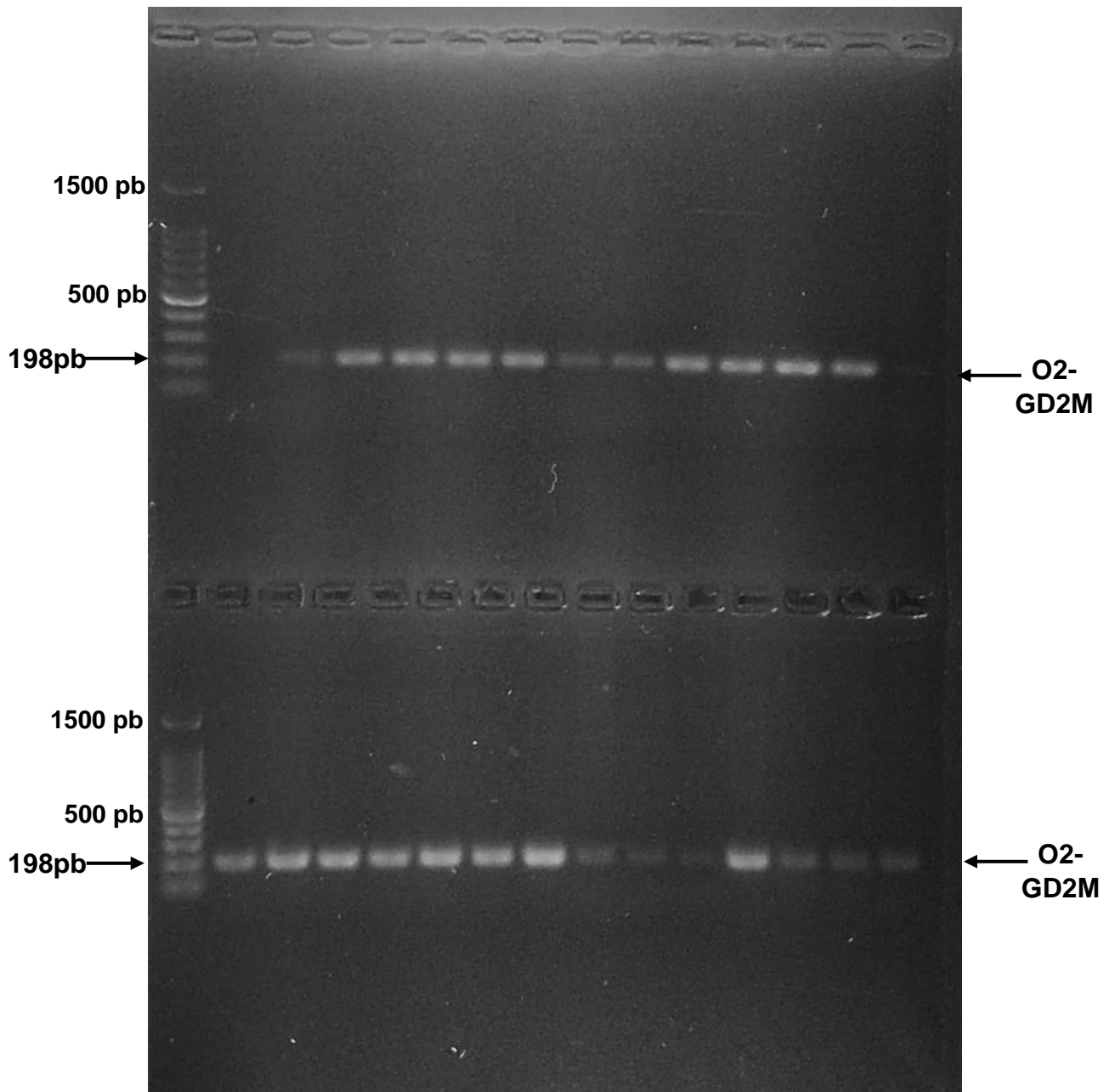


Figura 21. Amplificados de PCR VIII multiplex para los genes de β -lactamasas tipo O1-GD2M, O2-GD2M y O51-GD2M. Carril 1 superior e inferior: Marcador de peso molecular Promega 100pb, Carril 2: control negativo, carril 3: control positivo O1-GD2M (cepa de *Klebsiella pneumoniae*), carriles 4-14 superiores y 2-15 inferiores cepas de *E. coli* provenientes de neonatos hospitalizados en la UCIN del HIMFG (2015-2016).

Discusión

La frecuencia de bacterias resistentes a antimicrobianos es elevada en todo el mundo y la producción de β -lactamasas constituye el mecanismo de resistencia más común encontrado en el ambiente hospitalario.

Las bacterias con más relevancia médica son gramnegativas, entre ellas *E.coli*, causante de infecciones asociadas a la atención de la salud, debido al desarrollo de fenotipos con amplia resistencia a antimicrobianos. En Latinoamérica, pocos estudios han reportado la prevalencia de los diferentes tipos de β -lactamasas para *E.coli*, como Blanco *et al.*, 2015, que reporta prevalencias variables que van desde el 1.7% en infecciones urinarias en México, Argentina, Brasil, Chile y Venezuela.⁴⁴

Algunos estudios realizados en México, como los de Reyna-Flores *et al.*, 2013 y Castro, 2014 mencionan que los tipos de β -lactamasas que se encuentran con mayor frecuencia son CTX-M, TEM y SHV. Reyna-Flores *et al.*, 2013 reportó una prevalencia de 96.4% para CTX-M-15, 59% para TEM-1 y 3.5% para SHV; Castro, 2014 reportó una prevalencia de 95% para TEM, 50% para CTX-M y 5.5% para SHV.^{35 y 45}

En cambio, el presente trabajo mostró que en la población estudiada se incluyen otros tipos de β -lactamasas (no solo BLEE), detectando que enzimas tipo GIM, O1-GD2M, CTX-M Gp-1, SIM, OXA, TEM, OXA-48, SHV y CTX-M Gp-9 se encuentran con mayor frecuencia, siendo GIM la más representativa con un 91% (figura 12).

Uno de los problemas a los que se enfrenta el sector salud de México es el aumento en la frecuencia de casos de infecciones provocadas por bacterias productoras de β -lactamasas. Estas se presentan, tanto en el ambiente ambulatorio como hospitalario y sobre todo en las unidades de cuidados intensivos en donde se han tomado medidas para evitar la aparición de

carbapenemasas. Afortunadamente ninguna cepa analizada en este trabajo presentó este tipo de enzimas, pero ya existe la presencia de carbapenemasas clase D (OXA-48) con un porcentaje de 58.6% ocupando el quinto lugar entre los tipos de β -lactamasas, y clase B (metalo- β -lactamasas) dependientes de Zinc como GIM y SIM que ocupan el primer y cuarto lugar en positividad entre los tipos de β -lactamasas, con un 91.4% y 72.4% respectivamente en la UCIN del HIMFG.

Cura, 2015 indica que existen ciertos factores de riesgo para que los neonatos se infecten por BLEEs, mencionando que un peso menor a 1000g presenta mayor susceptibilidad (37.5%) y que la cesárea (11.7%) y parto natural (5.9%) son otros factores predisponentes a IAAS.⁴⁶ Nordberj *et al*, 2017 menciona que existen ciertas características que predisponen al paciente pediátrico a la infección por enterobacterias productoras de BLEE indicando el porcentaje de casos positivos dependiendo el factor de predisposición, tales como: las semanas de gestación (42%), el sexo masculino (57%), el peso entre 1000g-2499g al nacer (50%), el tipo de tratamiento como el que se administra en la UCIN (79%) y el tiempo de hospitalización entre 21-60 días (50%). Los factores predisponentes más significativos son el tipo de tratamiento en la UCIN y el sexo del paciente (el sexo masculino es más susceptible), presentan mayor número de bacterias BLEE.⁴⁷ Finalmente, O'Connor, 2017 agrega que el sistema inmune inmaduro, el cuidado en incubadoras, la leche contaminada y la exposición a cefalosporinas de 3^a generación son características considerables para la susceptibilidad a desarrollar infecciones asociadas a cuidados sanitarios causadas por la enzima CTX-M.⁴⁸

Debido a que en este trabajo realizado en la UCIN del HIMFG no se cuenta con toda la información que comentan los autores previamente mencionados, solo se analizaron los resultados obtenidos en comparación con el sexo y el tipo de cultivo realizado, observando 2 diferencias estadísticamente significativas entre SHV y Sexo ($p= 0.015$) y, O1-GD2M y Sexo

($p=0.036$), indicando que solo en estos dos tipos de enzima el sexo femenino es un determinante para que la infección por SHV se presente y el sexo masculino es un predisponente para que la infección por O1-GD2M se presente.

De acuerdo con Cura, 2015 el tipo de infección que se presentó en mayor proporción fue en sangre (50%), seguida por líquido cefalorraquídeo (20.6%), infecciones urinarias (14.7%), neumonía (10.3%) y piel y tejidos blandos (4.4%), sin embargo, no hay evidencia de la relación del tipo de cultivo con cierto tipo de β -lactamasa.⁴⁷ Para el caso de la UCIN del HIMFG se encontró un mayor porcentaje de urocultivos, seguido por los cultivos de diversos y finalmente hemocultivos con porcentajes de 62%, 20.7% y 17.2%, respectivamente. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre TEM y Cultivo ($p= 0.029$) y, SIM y Cultivo ($p=0.028$), indicando que el tipo de enzima encontrado tiene relación con el tipo de cultivo del cual se obtuvo.

Al incluir el sexo, tipo de cultivo y tipo de enzima encontrado (como se observa en la figura 15), se encontró que SHV, Urocultivo y Sexo ($p= 0.004$) y, O1-GD2M, Varios y Sexo ($p=0.028$) presentan una diferencia estadísticamente significativa lo que implica que, la enzima SHV presenta relación con los urocultivos y depende del sexo del paciente; mientras que la enzima O1-GD2M está relacionada con los cultivos diversos y depende del sexo del paciente, como se había mencionado anteriormente, SHV en niñas y O1-GD2M en niños.

Para este estudio, se llevó a cabo la clasificación en perfiles de β -lactamasas (cuadro 10) de acuerdo a los resultados de las 58 cepas con las ocho PCR multiplex realizadas. Si bien, no se ha encontrado un reporte similar al de este estudio, se han encontrado referencias que presentan asociación de enzimas, como por ejemplo Morfín-Otero, 2013 que presenta

asociación entre las enzimas CTX-M y SHV⁴⁹; Wójkowska-Mach, 2013 indica asociación entre CTX-M-3 y TEM-1 y CTX-M-15 y TEM-1⁵⁰ y finalmente Poirel, 2014 observó asociación entre CTX-M-3 + OXA-1 + TEM-1 en *E.coli*.⁵¹

Con base en los resultados, el perfil que obtuvo un mayor número de cepas fue el I (OXA + CTXM-1 + GIM + SIM + O1-GD2M) seguido por el perfil II (TEM + OXA + CTXM-1 + GIM + SIM + O1-GD2M) y III (TEM + CTXM-1 + GIM + SIM + O1-GD2M). Analizando estos resultados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en lo que refiere al sexo del paciente-tipo de perfil, tipo de cultivo-tipo de perfil y sexo del paciente-tipo de cultivo-tipo de perfil, respectivamente. Esto indica que el tipo de perfil que se presenta no depende de ninguna de las variables anteriores.

Deben considerarse medidas para la prevención de IAAS, como lo menciona Cura, 2015 con un lavado de manos, suficiente papel para su secado y uso de guantes estériles durante el cuidado neonatal.⁴⁷ En contraste, O'Connor, 2017 indica que se requiere de la separación de equipo limpio y usado, un ambiente limpio, suficiente personal con servicio de higiene y personal de limpieza y suficientes dispensadores de alcohol para manos, además de evitar el contacto padres-hijo puesto que se considera que los padres son el principal vector para introducir a la UCIN organismos asociados a la multirresistencia farmacológica.⁴⁸

Otro factor que debe considerarse, es la transmisión vertical madre-hijo como una de las principales causas de infección por β -lactamasas, debido a que las madres positivas a estas enzimas pueden transmitir las a sus hijos en el momento del parto. Como menciona Rettedal, 2015 y Peretz *et al*, 2016 el canal de parto de la madre es un determinante en la colonización

de neonatos al momento de dar a luz por lo que se recomienda un estudio de seguimiento de las pacientes positivas y de sus hijos positivos aún después de su alta médica.^{52 y53}

En lo que respecta a este trabajo, puede enriquecerse con los datos de semanas de gestación, peso al nacer del neonato, tratamiento del neonato, presencia de β -lactamasas en leche materna o en el intestino de las madres, duración de hospitalización, admisión a la UCIN y datos de hospitalización previa de las madres para determinar los factores de riesgo que hacen propenso a un neonato de adquirir uno o más de los diferentes tipos de β -lactamasas.

El HIMFG debe seguir tomando medidas especiales para el manejo y control de los diferentes tipos de β -lactamasas encontradas en la UCIN, en especial para las carbapenemasas clase B, evitando su diseminación y la aparición de nuevas resistencias por carbapenemasas que dificulten el tratamiento y recuperación de los neonatos. Así, también informar al hospital para la elaboración de una nueva guía de tratamientos empíricos en la UCIN.

Conclusión

Se identificaron y determinaron los genes productores de los diferentes tipos de β -lactamasas que inducen a la resistencia bacteriana en cepas de *E.coli* obtenidas de neonatos en la UCIN del HIMFG, para comprender su distribución y prevalencia en esta unidad, resultando ésta de: 91.4% para GIM, 89.6% para O1-GD2M, 84.5% para CTXM Gp-1, 72.4% para SIM, 58.6% para OXA, 44.8% para TEM, 19% para OXA-48, 12% para SHV y 3.4% para CTXM Gp-9.

Además, existe asociación entre:

- ✓ Tipo de β -lactamasa SHV y sexo.
- ✓ Tipo de β -lactamasa O1-GD2M y sexo.
- ✓ Tipo de β -lactamasa TEM y tipo de cultivo.
- ✓ Tipo de β -lactamasa SIM y tipo de cultivo.
- ✓ Tipo de β -lactamasa SHV, urocultivo y sexo.
- ✓ Tipo de β -lactamasa O1-GD2M, varios y sexo.

No existe diferencia estadísticamente significativa entre el perfil de β -lactamasas, sexo y tipo de cultivo.

El perfil con mayor prevalencia (31%) fue el I (OXA + CTXM-Gp1 + GIM + SIM + O1-GD2M) implicando la asociación de cinco tipos de β -lactamasas, destacando que GIM y SIM son carbapenemasas clase B (dependientes de Zinc), y podrían traer graves consecuencias para el tratamiento con carbapenems, por lo que debe mantenerse una revisión constante de las mismas.

Perspectivas

- ✓ Secuenciar las cepas productoras de β -lactamasas TEM, SHV, OXA, CTXM, GIM, SIM, OXA-48 y 01-GD2M para determinar su variable.
- ✓ Determinar los factores predisponentes a adquirir infecciones por bacterias productoras de β -lactamasas.
- ✓ Replantear las opciones terapéuticas empíricas, de acuerdo con lo reportado, con el fin de reducir resistencia a antibióticos.
- ✓ Llevar a cabo vigilancia de brotes para su manejo y control.
- ✓ Realizar la desinfección de materiales u objetos que estuvieron en contacto con el paciente infectado con bacterias portadoras de β -lactamasas.

Apéndice I. Cuadros de datos y resultados por cepa de E.coli.

Cuadro 11. Datos y resultados de cepas 1-30 de *E.coli* por oligonucleótido (PCR I a PCR V) aisladas de neonatos en la UCIN del HIMFG en un periodo comprendido de enero del 2015 a diciembre del 2016.

# de cepa	Edad (días)	Sexo	Tipo de cultivo	TEM	SHV	OXA	CTXM Gp-1	CTXM Gp-9	CTXM Gp-8/25	IMP	VIM	KPC	GES	PER	VEB	SME	IMI
1	7	M	Varios	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	7	M	Varios	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	7	M	Varios	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	7	M	Varios	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	28	F	Hemocultivo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	30	M	Urocultivo	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	60	M	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	60	M	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	25	M	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	90	M	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	90	F	Hemocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	30	F	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	28	F	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	60	M	Varios	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	22	M	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	30	F	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	27	F	Urocultivo	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	27	F	Urocultivo	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	9	M	Urocultivo	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	9	M	Urocultivo	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	8	M	Hemocultivo	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	9	F	Varios	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	13	M	Varios	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	13	M	Hemocultivo	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	27	F	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	30	F	Urocultivo	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	60	F	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	9	F	Varios	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	30	M	Urocultivo	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	23	M	Urocultivo	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 11 (continuación). Datos y resultados de cepas 31-58 de *E.coli* por oligonucleótido (PCR I a PCR V) aisladas de neonatos en la UCIN del HIMFG en un periodo comprendido de enero del 2015 a diciembre del 2016.

# de cepa	Edad (días)	Sexo	Tipo de cultivo	TEM	SHV	OXA	CTXM Gp-1	CTXM Gp-9	CTXM Gp-8/25	IMP	VIM	KPC	GES	PER	VEB	SME	IMI
31	27	M	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	30	M	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	60	M	Urocultivo	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	30	M	Urocultivo	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	14	M	Hemocultivo	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	60	F	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	15	F	Hemocultivo	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	15	F	Hemocultivo	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	12	F	Urocultivo	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	12	F	Urocultivo	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	30	F	Urocultivo	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	30	M	Urocultivo	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	30	M	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	30	F	Varios	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	30	F	Varios	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	30	M	Hemocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	60	F	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	60	M	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	15	M	Varios	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	60	F	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	30	M	Varios	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	30	M	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	30	M	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	25	F	Hemocultivo	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	25	F	Hemocultivo	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	30	F	Urocultivo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	30	M	Urocultivo	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	30	M	Urocultivo	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 11 (continuación). Datos y resultados de cepas 1-30 de *E.coli* por oligonucleótido (PCR VI a PCR VIII) aisladas de neonatos en la UCIN del HIMFG en un periodo comprendido de enero del 2015 a diciembre del 2016.

de cepa	Edad (días)	Sexo	Tipo de cultivo	GIM	SIM	NDM	SPM	O23 GDM	O24 GDM	O48 GDM	O1 GD2M	O2 GD2M	O51 GD2M
1	7	M	Varios	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2	7	M	Varios	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
3	7	M	Varios	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
4	7	M	Varios	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
5	28	F	Hemocultivo	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
6	30	M	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
7	60	M	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
8	60	M	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
9	25	M	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
10	90	M	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
11	90	F	Hemocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
12	30	F	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
13	28	F	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
14	60	M	Varios	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
15	22	M	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
16	30	F	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
17	27	F	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
18	27	F	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
19	9	M	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
20	9	M	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
21	8	M	Hemocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
22	9	F	Varios	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
23	13	M	Varios	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
24	13	M	Hemocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
25	27	F	Urocultivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	30	F	Urocultivo	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
27	60	F	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
28	9	F	Varios	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
29	30	M	Urocultivo	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
30	23	M	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-

Cuadro 11 (continuación). Datos y resultados de cepas 31-58 de *E.coli* por oligonucleótido (PCR VI a PCR VIII) aisladas de neonatos en la UCIN del HIMFG en un periodo comprendido de enero del 2015 a diciembre del 2016.

# de cepa	Edad (días)	Sexo	Tipo de cultivo	GIM	SIM	NDM	SPM	O23 GDM	O24 GDM	O48 GDM	O1 GD2M	O2 GD2M	O51 GD2M
31	27	M	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
32	30	M	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
33	60	M	Urocultivo	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
34	30	M	Urocultivo	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
35	14	M	Hemocultivo	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
36	60	F	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
37	15	F	Hemocultivo	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
38	15	F	Hemocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
39	12	F	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
40	12	F	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
41	30	F	Urocultivo	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
42	30	M	Urocultivo	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
43	30	M	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
44	30	F	Varios	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
45	30	F	Varios	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
46	30	M	Hemocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
47	60	F	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
48	60	M	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
49	15	M	Varios	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
50	60	F	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
51	30	M	Varios	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
52	30	M	Urocultivo	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
53	30	M	Urocultivo	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
54	25	F	Hemocultivo	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
55	25	F	Hemocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
56	30	F	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
57	30	M	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
58	30	M	Urocultivo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-

Cuadro 12. Cepas individuales de *E.coli* por perfiles aisladas de neonatos en la UCIN del HIMFG enero 2015-diciembre 2016.

Número de perfil	Perfil de β-lactamasas	Número de cepa	Cantidad de cepas que lo presentan	Tipo de cultivo			SEXO	
				H	U	V	M	F
I	OXA CTXM-Gp1 GIM SIM O1-GD2M	7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 27, 31, 32, 43, 46, 47, 48, 49, 50 y 56	18	2	15	1	10	8
II	TEM OXA CTXM-Gp1 GIM SIM O1-GD2M	6, 17, 18, 21, 23 y 30	6	1	4	1	4	2
III	TEM CTXM-Gp1 GIM SIM O1-GD2M	2, 19, 20, 38 y 55	5	2	2	1	3	2
IV	TEM CTXM-Gp1 GIM O1-GD2M	33, 34 y 35	3	1	2	0	3	0
V	OXA CTXM-Gp1 GIM SIM OXA-48 O1-GD2M	8 y 36	2	0	2	0	1	1
VI	SHV CTXM-Gp1 GIM SIM O1-GD2M	14 y 40	2	0	1	1	1	1
VII	TEM SHV CTXM-Gp1 GIM OXA-48	41 y 54	2	0	2	0	0	2
VIII	TEM CTXM-Gp1 GIM OXA-48	42 y 45	2	0	1	1	1	1
IX	OXA CTXM-Gp1 SIM O1-GD2M	52 y 53	2	0	2	0	2	0
X	GIM OXA-48 O1-GD2M	1	1	0	0	1	1	0
XI	TEM CTXM-9 GIM OXA-48 O1-GD2M	3	1	0	0	1	1	0
XII	GIM O1-GD2M	4	1	0	0	1	1	0
XIII	TEM GIM SIM OXA-48 O1-GD2M	5	1	1	0	0	0	1
XIV	OXA CTXM-Gp1 GIM O1-GD2M	22	1	0	0	1	0	1
XV	TEM OXA GIM SIM O1-GD2M	24	1	1	0	0	1	0
XVI	TEM SHV	25	1	0	1	0	0	1
XVII	SHV CTXM-Gp1 GIM O1-GD2M	26	1	0	1	0	0	1
XVIII	TEM OXA GIM O1-GD2M	28	1	0	0	1	0	1
XIX	TEM OXA CTXM-Gp1 O1-GD2M	29	1	0	1	0	1	0
XX	TEM CTXM-Gp1 GIM SIM OXA-48 O1-GD2M	37	1	1	0	0	0	1
XXI	SHV GIM SIM O1-GD2M	39	1	0	1	0	0	1
XXII	TEM CTXM-Gp1 GIM SIM OXA-48	44	1	0	0	1	0	1
XXIII	OXA CTXM-Gp1 O1-GD2M	51	1	0	0	1	1	0
XXIV	OXA CTXM-9 GIM SIM O1-GD2M	57	1	1	0	0	1	0
XXV	CTXM-Gp1 GIM SIM O1-GD2M	58	1	0	1	0	1	0

Referencias

1. Organización de Mundial de la Salud. [Internet]. Ginebra: OMS; 2018 [consultado 20 marzo 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
2. McCarter YS. *Modos de acción de los antimicrobianos*. En: Coyle MB, editor. *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. Seattle, Washington: American Society for Microbiology; 2005. p. 3-4, 156-160.
3. Tortora G., Funke B. Case C. *Introducción a la microbiología*. 9ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007. p. 88.
4. Murray P. Rosenthal K. Pfaller M. *Microbiología médica*. 6ª ed. España: Elsevier; 2008. p. 12 y 41-42.
5. Brooks G., Carroll K., Butel J., Morse S., Mietzner T. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 25ª ed. México: Editorial Manual Moderno S.A. de C.V.; 2011. p. 249-263.
6. Manning S. *Deadly diseases and epidemics Escherichia coli infections*. 2a ed. Nueva York: Chelsea House Publishers; 2010. p. 22. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=abOOioRJ9ucC&printsec=frontcover&dq=Escherichia+coli+infections+deadly+diseases+and+epidemics&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiF-sfl2vbaAhWJ2YMKHW8zDkEQ6AEIJzAA#v=onepage&q=Escherichia%20coli%20infections%20deadly%20diseases%20and%20epidemics&f=false>
7. MacFaddin J. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3ª ed. Estados Unidos: Médica Panamericana; 2004. p. 690-691.
8. Brunser O. *El desarrollo de la microbiota intestinal humana, el concepto de probiótico y su relación con la salud humana*. Rev Chel Nutr. 2013; 40 (3): 283-289.
9. García C., Astocondor L., Banda C. *Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y Perú*. Acta Méd. Peruana. 2012; 29 (3): 163-168.
10. Organización Mundial de la Salud. [Internet]. *Una atención limpia es una atención más segura*: OMS; 2010 [consultado 20 marzo 2018]. Disponible en: http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/es/

11. Senado de la República. [Internet]. *Iniciativa con Proyecto de decreto por el que se reforman el artículo 46; la fracción III del artículo 133; las fracciones XIII y XV del artículo 134, y se adicionan la fracción XIV del artículo 134, y el artículo 135 BIS de la Ley General de Salud*: Senado de la República; 2017 [consultado 20 marzo 2018]. Disponible en: [http://www.senado.gob.mx/sgsp/gaceta/63/2/2017-03-02-1/assets/documentos/Inic PRD Art-27 133 y 134 Ley Gral Salud Higiene Manos.pdf](http://www.senado.gob.mx/sgsp/gaceta/63/2/2017-03-02-1/assets/documentos/Inic_PRD_Art-27_133_y_134_Ley_Gral_Salud_Higiene_Manos.pdf)
12. Oliveira P., Marques A., Prado M. *Infecciones relacionadas con la asistencia a la salud en unidades de terapia intensiva neonatal: una revisión integradora*. *Enferm glob*. 2017; 16 (45): 508-522.
13. Lorenzo P., Moreno A., Lizasoain I., Leza J., Moro M., Portolés A. *Farmacología básica y clínica/ Velázquez*. 18ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008. p: 791-804.
14. Calvo J., Martínez L. (2008). *Mecanismo de acción de los antimicrobianos*. *Enferm Infecc Microbiol Clín*. 2008; 27 (1): 44-52.
15. Del Arco J. *Antibióticos: situación actual*. *Farmacia profesional*. 2014; 28 (5): 29-33.
16. Madigan M., Marinko J., Parker J. *Brock Biología de los microorganismos*. 10ª ed. Estados Unidos de América: Pearson; 2004. p. 701.
17. Suárez C., Gudiol F. *Antibióticos betalactámicos*. *Enferm Infecc Microbiol Clín*. 2008; 27 (2): 116-129.
18. Abarca G., Herrera M. *Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio*. *Rev méd Hosp nac niños (Costa Rica)*. 2001; 36 (1-2). Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462001000100011
19. Bush K., Jacoby G. & Medeiros A. *A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39 (6): 1211
20. Bush K. *Is it important to identify extended-spectrum β -lactamase-producing?* *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996; 15 (5): 361.
21. Tafur J., Torres J., Villegas M. *Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas*. *Infectio*. 2008; 12 (3): 223-233.
22. Galán J. *Antibióticos clásicos en Atención Primaria*. *Rev Esp Quimioter*. 2003; 16 (1): 115-117.
23. Morejón M. *Betalactamasas de espectro extendido*. *Rev Cubana med*. 2013; 52 (4): 272-280.

24. Cantón R., González-Alba J., Galán J. *CTX-M enzymes: Origin and diffusion*. Front Microbiol. 2012; 3 (110): 1-19.
25. Arce Z., Llontop J., Alarcón E., López E. *Detección de los genes SHV, TEM y CTX-M en cepas de Escherichia coli β -lactamasas de espectro extendido procedentes de un hospital de Chiclayo-Perú*. Rev Cuerpo Med. HNAAA. 2014; 7 (3): 37-30.
26. Casellas JM. *Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología*. Rev Panam Salud Pública. 2011; 30 (6): 519-528.
27. Morejón M., Salup R., Cue M. *Actualización en antimicrobianos sistémicos*. La Habana: Editorial Ciencias médicas; 2005. p. 51.
28. Medeiros A. *β -lactamasas*. British Medical Bulletin. 1984; 40 (1): 18-27.
29. Knothe H., Shah P., Kremery V., Antal M., Mitshashi S. *Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens*. Infection. 1983; 11(6): 315-317.
30. Cantón R., Valverde A., Novais A., Baquero F., Coque T. *Evolución y panorama actual de las BLEE*. Enferm Infecci Microbiol Clín. 2007; 25 (2): 2-10.
31. Oteo J., Navarro C., Cercenado E., Delgado-Iribarren A., Wilhelmi I., Orden B., et al. *Spread of Escherichia coli strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions*. J Clin Microbiol. 2006; 44 (7): 2359-2366.
32. Novais A., Cantón R., Moreira R., Peixe L., Baquero F., Coque TM. (2007). *Emergence and dissemination of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids*. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51 (2): 796-799.
33. Espinosa F. *Patógenos multirresistentes emergentes. Hospital "Hermanos Ameijeiras". 2009*. Rev Acta Médica. 2011; 13 (1): 38-45.
34. Martín S., Martín MT, Liso F. *Tratamiento de infecciones producidas por betalactamasas de espectro extendido (BLEE)*. Madrid, Complejo Hospitalario Universitario Infanta Cristina: Ferrer; 2014. 2 (4): 97-127.
35. Castro N., Salgado J., Ocampo R., Silva J., Ruíz M. *Caracterización de beta-lactamasas de espectro extendido producidas por Escherichia coli de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, México*. Tlamati. 2014; 5 (1): 14-23.

36. García-Tello A., Gimbernat H., Redondo C., Arana D., Cacho J., Angulo J. *Betalactamasas de espectro extendido en las infecciones del tracto urinario causadas por enterobacterias: aproximación a su conocimiento y pautas de actuación*. Actas Urol Esp. 2014; 38 (10): 678-684.
37. Voets G., Fluit A., Scharringa J., Cohen J., Leverstein-van Hall M. *A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC β -lactamases and OXA β -lactamases*. Int J Antimicrob Agents. 2011; 37 (4): 359-359.
38. Navarro F., Calvo J., Cantón R., Fernández-Cuenca F. Mirelis B. *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos*. Enferm Infecc Microbiol Clín. 2011; 29 (7): 524-534.
39. Salazar A., Sandoval A., Armendáriz J. *Biología Molecular, fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. México: Mc Graw Hill; 2013. p. 110-199 y 145-157.
40. Karp G. *Biología celular y molecular*. 5ª ed. México: Mc Graw Hill; 2009. p. 754-755 y 763-765.
41. Vargas L. et al. *Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana*. Acta Bioquím Clín Latinoam. 2005; 39 (1): 19-25.
42. García A. Zamudio M. *Manual de Microbiología Médica*. 2ª ed. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; 2010. p. 267-274.
43. Dallenne C. Da Costa A. Decré D. Favier C. Arlet G. *Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae*. J. Antimicrob Chemother. 2010; 65: 490-495.
44. Blanco V. et al. *Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por Escherichia coli productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia*. Enferm Infecc Microbiol Clín. 2015; 34 (9): 559-565.
45. Reyna-Flores F. et al. *Molecular epidemiology of Escherichia coli O25b-ST131 isolates causing community-acquired UTIs in Mexico*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013; 76 (3): 396-398.
46. Cura C., Ozen M., Akaslan A., Alkan G. Sesli E. *Health care-associated infection surveillance in a tertiary neonatal intensive care unit: A prospective clinical study after moving to a new building*. Am J Infect Control. 2016; 1; 44 (1): 80-84.
47. Nordberg V. et al. *Neonatal intestinal colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae-a 5-year follow-up study*. Clin Microbiol Infect. 2018; 1-6.

48. O'Connor C. et al. *The first occurrence of a CTX-M ESBL-producing Escherichia coli outbreak mediated by mother to neonate transmission in an Irish neonatal intensive care unit.* BMC Infect Dis. 2017; 5; 17 (1): 1-7.
49. Morfín-Otero. Et al. *Characterization of Enterobacteriaceae isolates obtained from tertiary care hospital in Mexico, which produces extended-spectrum β -lactamase.* Microbi Drug Resist. 2013; 19 (5): 378-383.
50. Wójkowska-Mach. et al. *Enterobacteriaceae infections of very low birth weight infants in Polish neonatal intensive care units: resistance and cross-transmission.* Pediatr Infect Dis J. 2013; 32 (6): 594-598.
51. Poirel L. et al. *Spread of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in a neonatal intensive care unit, Istanbul, Turkey.* Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58 (5): 2929-2933.
52. Peretz A. et al. *Peripartum maternal transmission of extended-spectrum β -lactamase organism to newborn infants.* Diagn Microbiol Infect Dis. 2017; 87 (2): 168-171.
53. Rettedal S., Löhr IH., Bernhoff E., Natås OB., Sundsfjord A. Oymar K. *Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae among pregnant women in Norway: prevalence and maternal-neonatal transmission.* J Perinatol. 2015; 35 (11): 907-912.