

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
FACULTAD DE MEDICINA
MÉXICO UNIDAD DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA



**“Evaluación de la prueba NG-Test MCR-1 en bacilos
gram negativos con resistencia a colistina, estudio
multicéntrico”**

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
SUBESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA

PRESENTA

Dra. Julieta Medina Galindo

TUTORA

Dra. Ana Patricia Rodríguez Zulueta

CD. MX., 2022



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y ESPECIALIZACIÓN**

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

FIRMAS DE AUTORIZACIÓN

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser "Ana Patricia Rodríguez Zulueta".

**Dra. Ana Patricia Rodríguez Zulueta
Asesora clínica e investigadora principal de Tesis
Adscrita al Servicio de Infectología
Hospital General Dr. Manuel Gea González**

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser "Patricia Amalia Volkow Fernández".

**Dra. Patricia Amalia Volkow Fernández
Profesora Titular del Curso de Infectología
Médico Especialista en Medicina Interna e Infectología
Instituto Nacional de Cancerología**

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser "Julieta Medina Galindo".

**Dra. Julieta Medina Galindo
Autor de Tesis
Residente de Infectología
Instituto Nacional de Cancerología**

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

Mi especial aprecio y agradecimiento al Instituto Nacional de Cancerología y Hospital Gea González: a todas mis maestras y maestros, en especial a mi asesora Dra. Patricia Rodríguez Zulueta que me ayudaron en mi formación de Infectología y a todos mis compañeros de especialidad que me acompañaron a este camino.

Por su apoyo en este proyecto a todo el Servicio de Infectología y al Laboratorio de Microbiología Instituto de Rehabilitación, pero en especial M.C Melissa Hernández Durán y Dra. Claudia Adriana Colín Castro por su colaboración particular y al Dr. Braulio José Méndez Sotelo por su asesoría.

Antecedentes y marco teórico

Introducción

A partir de la década de 1970 nos encontramos en una crisis global de resistencia antibiótica principalmente entre los bacilos gram negativos, con limitaciones importantes en los tratamientos disponibles para estos patógenos, en particular aquellos que causan infecciones hospitalarias. Los microorganismos que muestran más frecuentemente un patrón de resistencias extenso (XDR), panresistentes (PDR) y “de difícil tratamiento” son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. (1)

El aumento de esta resistencia extendida ha provocado volver a utilizar las polimixinas como antibióticos de último recurso en caso de infecciones causadas por Enterobacterales productores de carbapenemasas, en ocasiones por la falta de acceso a nuevos antimicrobianos, el retraso en la autorización, el alto costo y la distribución desigual del fármaco en algunas partes del mundo como en América Latina. (2)

Las polimixinas (polimixina B y polimixina E también conocida como colistina) son fármacos antimicrobianos que fueron descubiertos en 1947 (3) a partir de la síntesis de productos naturales de la bacteria *Paenibacillus polymixa*. La diferencia entre estas moléculas consiste en el cambio puntual del aminoácido fenilalanina por leucina en la posición 6 (colistina). (2) Posteriormente, se informó en Japón (1947) que la colistina es un metabolito secundario de la subespecie *colistinus* de la bacteria gram positiva *P. polymyxa* (4).

Son moléculas anfipáticas y apolares, clasificadas como lipopéptidos catiónicos grandes (1200 Da), su estructura consiste en la unión de un heptapéptido cíclico a un tripéptido acilado en el extremo N-terminal por una cadena de ácidos grasos de longitudes variables, esta última determina las formulaciones comerciales: polimixina B1 y B2 y colistina A y B. (2)

Colistina y polimixina B ya se han utilizado durante décadas de forma ininterrumpida en medicina veterinaria. (1) Principalmente para el tratamiento y profilaxis de infecciones gastrointestinales causadas por Enterobacterales, pero también para promover el crecimiento en cerdos, aves y terneros. (2)

La colistina se ha utilizado desde su descubrimiento y sin interrupción para el tratamiento de la diarrea causada por *E. coli* en lechones destetados, y durante varias décadas, ha sido una de las principales opciones de tratamiento en cerdos. (5)

Debido al aumento en la incidencia de casos de resistencia a colistina en cepas humanas y animales; en México está prohibido el uso de colistina para uso

animal con el fin de promover el crecimiento animal y se incluye en los fármacos prohibidos para este uso en el Diario Oficial de la Federación desde 2003. (6)

Es casi seguro que la emergencia de resistencia a colistina adquirida mediante plásmidos se vio exacerbada por el uso de colistina en granjas chinas y del sudeste asiático (7)(8) a partir de donde se propagó a otros países y entre diversas especies de la familia Enterobacteriaceae, reportándose un aumento en la incidencia de forma exponencial en ciertas regiones. (4)

En 2016, el Ministerio de Agricultura de China retiró formalmente la colistina como aditivo alimentario para animales y restringió su uso para tratamiento de infecciones por microorganismos MDR en humanos; por otro lado, en 2017, el Departamento de Desarrollo Ganadero de Tailandia también prohibió oficialmente la colistina como aditivo alimentario. (9)

En la medicina humana; en 1959, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de América aprobó la colistina para tratar varios tipos de diarrea e infecciones del tracto urinario (4). Sin embargo, suspendió su uso en 1970 debido a la alta nefrotoxicidad; restringiéndose únicamente a población específica como enfermos de fibrosis quística y a soluciones tópicas para infecciones en oculares y óticas. (1)

Debido al incremento de la resistencia antimicrobiana mundial, en los últimos años estos fármacos se han vuelto a introducir en la práctica clínica como terapia de rescate en infecciones contra bacilos gram negativos XDR y PDR como única opción de tratamiento y también para proporcionar un efecto sinérgico. (3) Actualmente, las polimixinas están clasificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de los antimicrobianos de mayor prioridad (crítica) en medicina humana. (10)

Efecto antimicrobiano de colistina

La colistina se une a la membrana externa aniónica de las bacterias, específicamente a los grupos fosfato del lípido A, desplazando competitivamente los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (que unen moléculas de LPS adyacentes), para posteriormente insertar la sección hidrofóbica en la capa de fosfolípidos, esto lleva a la formación de agregados, alteración de la permeabilidad de la membrana, fuga de iones y otro contenido celular, desembocando en la muerte bacteriana. (2) (11) El LPS es una estructura muy compleja por ser heterogénea entre muchas especies bacteriana, sin embargo el lípido A (una porción específica de la membrana celular) está conformado por cinco o seis colas lipídicas en una estructura laminar estable y relativamente conservado en las especies bacterianas. (11)

También se ha propuesto un mecanismo de acción adicional considerado secundario que consiste en la inhibición de cierta enzima respiratoria: las NADH-oxidorreductasas de quinona de tipo II.(12)

Usos

La colistina se administra como el profármaco colistina metanosulfonato (CMS), también conocido como colistimetato. El CMS es menos tóxico que el sulfato de colistina y carece de actividad antibacteriana por sí mismo y requiere hidrólisis a colistina (y otros derivados parciales del metanosulfonato) en fluidos biológicos. (2)

La colistina tiene un espectro de actividad bactericida estrecho pero importante, tiene actividad contra miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, incluidas especies de *Klebsiella*, *E. coli*, especies de *Citrobacter*, especies de *Shigella*, especies de *Enterobacter* y especies de *Salmonella*. La colistina también tiene una actividad bactericida significativa contra las bacterias gram negativas no fermentadoras de lactosa predominantes, incluidas *Stenotrophomonas maltophilia*, *A. baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. (4)

Por otro lado; diversas especies son naturalmente resistentes a la colistina: *Proteus*, algunas especies de *Providencia*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas mallei*, especies de *Chromobacterium*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, especies de *Edwardsiella*, *Campylobacter*, *Vibrio cholera* y *Brucella*, *Legionella*. Además, el antibiótico colistina no es activo frente a cocos gramnegativos (especies de *Neisseria*), bacterias anaerobias, *Aeromonas* (excepto *Aeromonas jandaei* que tienen resistencia intrínseca y *Aeromonas hydrophila* que tiene resistencia inducible). (4)

De acuerdo a las recomendaciones actuales del uso de colistina: “La FDA recomienda su uso en infecciones graves causadas por cepas susceptibles, cuando otros antimicrobianos menos tóxicos son ineficaces o están contraindicados.” “La EMA: tratamiento de Infecciones graves en pacientes con limitadas opciones de tratamiento”, principalmente en aquellas infecciones del tracto urinario inferior dada la eliminación renal del profármaco CMS que luego se convierte en colistina activa en el tracto urinario. El principal nicho de uso de colistina se encuentra en tratamiento de Enterobacterales con betalactamasas de espectro extendido, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos, Enterobacterales resistentes a carbapenémicos incluyendo aquellos cuyo mecanismo de resistencia sea la producción de metalobetalactamasas, OXA-48 y KPC. (13)

Existe evidencia del efecto postantibiótico en cepas de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*. (4)

Resistencia a Colistina

A partir de su uso extendido para este fin a partir de la década de 1990, se ha reportado la aparición mundial de patógenos resistentes a la colistina. Característicamente, el desarrollo de bacterias resistentes a la colistina también puede ocurrir sin estar acompañada de exposición a la colistina. (1)

La resistencia adquirida (cromosómica) a la colistina es debida a mutaciones en distintos puntos en básicamente dos vías de señalización que determinan la composición estructural del LipA de la pared celular y el grado de afinidad de la molécula de colistina a la superficie de la membrana celular; naturalmente, estas vías se regulan de acuerdo a respuestas adaptativas a estímulos ambientales como bajas concentraciones de Mg^{2+} y pH, y altas concentraciones de Fe^{3+} y Al^{3+} , entre otros. (14) (12)

Los dos productos finales que tienen baja capacidad de unión a la colistina son la fracción aminoarabinosa (amino-4-desoxi-L-arabinosa (L-Ara4N)) y la fracción fosfoetanolamina (pEtN). (12) Esta modulación aumenta la carga catiónica en la membrana LPS, que es el objetivo inicial de la colistina.(4)

Las bacterias con resistencia intrínseca, tienen naturalmente estos dos compuestos en la membrana y presentan resistencia completa desde su nacimiento.

A nivel genético y de regulación transcripcional, la alteración del L-Ara4N está mediada por el operón pmrHFIJKLM (también conocido como arnBCADTEF o pbgPE), mientras que la adición de pEtN al lípido A está catalizada por PmrC, cuyo gen se encuentra localizado en el operón pmrCAB; estas moléculas actúan como enzimas tipo cinasas localizadas en la membrana interna bacteriana dando lugar a las formas de Lípido A resistentes L-Ara4N y pEtN. (12)

En algunas especies bacterianas, en especial *K. pneumoniae*, la modificación lípido A también está regulada por otro operón llamado PhoP/PhoQ. Se ha descrito también la resistencia mediada por hiperexpresión de LPS capsulares de *K. pneumoniae* (12)

Tabla 1. Mecanismos cromosómicos y fenotípicos de resistencia a colistina

Mecanismo	Mecanismo de resistencia	Vía molecular	Comentarios
Cromosómicos con modificación del LPS (12)(8)	Alteración de los genes reguladores de la formación de L-Ara4N y pEtN (Lípido A)	Alteraciones en mgrB , que lleva a la sobreexpresión de genes regulados por PhoP y Pmr. (incluye delección, mutación, inactivación y transposición de secuencias de inserción múltiples)	El mecanismo más común y mejor caracterizado. Algunos casos con heterorresistencia previa más presión de selección en cepas expuestas a colistina (<i>K. pneumoniae</i>) genera CIM elevadas . Mutaciones puntuales heredadas de poblaciones previas.
	Mutación en los genes reguladores y de síntesis de LPS por RamA modifican la biosíntesis de la membrana del lípido A.	Locus del gen <i>ramA</i> y tres subgenes: <i>ramA</i> , <i>romA</i> y <i>ramR</i> . Los niveles más altos de RamA modifica la biosíntesis de la membrana del lípido A que regula las barreras de permeabilidad.	Mecanismo reportado en <i>Citrobacter</i> , <i>Salmonella</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>Enterobacter</i> .
	Mutaciones en los genes de biosíntesis del lípido A: <i>lpxA</i> , <i>lpxC</i> y <i>lpxD</i> .	Mutaciones en los primeros tres genes de producción de LPS y por lo tanto pérdida completa de la capa de LPS.	La pérdida de LPS genera resistencia a la colistina en <i>A. baumannii</i> .
Cromosómicos por disminución de la permeabilidad. (4)	Eflujo del fármaco o aumento del funcionamiento de la bomba.	Activación de bombas de eflujo y sus genes reguladores: <i>KpnEF</i> , <i>AcrAB</i> y <i>Sap</i> .	Activa resistencia a colistina, rifampicina, la ceftriaxona y la eritromicina. Las mutaciones pueden llevar también a aumento de la sensibilidad a colistina con reducción hasta 2 veces de la MIC.
Fenotípico Capsular (Mecanismo propuesto en algunas cepas de <i>K. pneumoniae</i>) (15).	Aumento de la producción de polisacáridos capsulares (PSC) (4). Resistencia por agotamiento en PSC abundantes.	Alteración en la regulación de la cápsula por las proteínas <i>Cpx</i> (Expresión conjugada de pilus) y <i>Rcs</i> (regulador de la síntesis de la cápsula), ubicados en la membrana LPS.	Relacionado con una menor susceptibilidad a la polimixina B. CIM de resistencia bajos . Se necesitan más estudios para dilucidar los mecanismos exactos en que se produce.

Mecanismo mediado por elementos móviles (plásmidos) de resistencia a colistina

Como se comentó previamente, la mayoría de los genes responsables de las modificaciones del lípido A se encuentran en el cromosoma bacteriano, sin embargo, en 2015, se identificó una superbacteria resistente a la colistina a través de la expresión de un elemento móvil portador del gen *mcr-1*. (11)

Los genes *mcr* codifican metaloenzimas que transfieren fosfoetanolamina a restos de lípido A presentes en el lipopolisacárido de la membrana externa bacteriana, al igual que en la síntesis vía cromosómica de pEtN, debido a la menor cantidad de enlaces de hidrógeno y las débiles interacciones electrostáticas, da como resultado un bajo grado de entrecruzamiento de las moléculas de lípido A lo que altera su sitio de unión de la colistina. (14)(11)

El patrón fenotípico de resistencia a colistina mediado por plásmidos es el mismo que el del gen cromosómico *pmrC* que codifica la proteína pEtN transferasa *mcr-1*, por lo tanto, una hipótesis fuerte plantea que los genes *mcr* derivan de bacterias ambientales intrínsecamente resistentes a colistina. (8)(4). Sin embargo, en estudios experimentales, se ha demostrado que poblaciones con heterorresistencia a la colistina, sobre todo en pacientes tratados con este fármaco a dosis subóptimas, pueden seleccionar mutantes de resistencia.(4)

El grado de resistencia en presencia del gen *mcr* depende de diversos eventos moleculares: En primer lugar la expresión del gen *mcr* se ve afectada por la compatibilidad entre el plásmido portador del gen *mcr* y la cepa hospedante (compatibilidad genética). En segundo lugar, la actividad enzimática de *mcr* está modulada por el microambiente del sistema de membrana de las células bacterianas y puede diferir entre diferentes bacterias de acuerdo a sus necesidades metabólicas (compatibilidad proteínica). En tercer lugar se encuentra en el sitio blanco, ya que de acuerdo a especies y aun entre cepas de la misma especie, se pueden encontrar estructuras de lípido A ligeramente diferentes, lo que también puede resultar en niveles variables de modificación de lípido A (compatibilidad a nivel de membrana). (11)

A pesar de que los niveles de concentraciones inhibitorias máximas de polimixina conferidas por *mcr-1* no son muy altos (4–8 mg/L), se ha demostrado por modelos en vivo, que este nivel de CIM puede llegar a conferir resistencia y falla completa en el tratamiento con colistina, por lo tanto, las cepas con resistencia carbapenémicos y *mcr-1*, son verdaderamente pan-resistentes a los fármacos.(8)

Epidemiología de MCR

Actualmente, la resistencia a colistina se ha reportado en todo el mundo en más de 30 países y en diferentes tipos de muestras y entornos: granjas y animales salvajes, comida (carne y verduras), humanos (colonizados e infectados), ambientes acuáticos, aguas residuales de hospitales, aves silvestres y insectos, estos último que se ha postulado su intervención como vectores (mosca doméstica/mosca azul). (1) Desde el descubrimiento del primer gen *mcr-1*, se han descrito otras nueve variantes del gen *mcr* (*mcr-2* a *mcr-10*), principalmente en regiones de Asia, tanto en medios hospitalarios y

comunitarios. (14) Sin embargo; el gen *mcr-1* continúa siendo el más prevalente en México y el mundo de forma muy importante.

El primer aislamiento reportado de resistencia adquirida a la colistina fue en 2015 fue en una cepa de *E. coli* aislada de animales destinados al consumo humano en China; se identificó que esta resistencia es mediada por el gen *mcr-1* a través de plásmidos y ahora se ha propagado a más de 30 países en los cinco continentes, existiendo diseminación entre especies de Enterobacteriaceae, incluyendo, y por orden de frecuencia, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Cronobacter sakazakii*, *S. enterica*, *Raoultella ornithinolytica*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter braakii*, *Shigella sonnei*, *Kluyvera ascorbata* y *Moraxella spp.* (16)(11)

Se han identificado nuevas variantes de *mcr*, como *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9* y *mcr-10*, las cuales actualmente presentan una rápida propagación. (4) Entre los genes de la familia MCR, *mcr-1* y *mcr-9* son los más ampliamente diseminados, identificándose en aislamientos de 61 y 40 países en seis continentes, respectivamente. *Mcr-3* y *mcr-5* son los segundos más frecuentes, detectándose en 22 y 15 países, respectivamente. Otros genes de la familia MCR se distribuyen sobre pequeñas regiones (*mcr-4*, *mcr-2* y *mcr-8*) y otros muestran una distribución muy local (*mcr-7*). Hasta la fecha, solo ha habido un informe único del gen *mcr-6* del Reino Unido. (9) A excepción del *mcr-6*, que tiene una ubicación cromosomal, todos los demás genes *mcr* se han alojado en el plásmido conjugativo. (9)

El riesgo para presentar una infección por *E. coli* que contiene *mcr-1* se ha asociado con varios factores: género masculino, la presencia de inmunosupresión, antecedentes estancias hospitalarias y el uso de antibióticos, especialmente exposición previa a carbapenémicos y fluoroquinolonas. (16)

En América (la mayoría de la información es procedente de Brasil y EE. UU.) la gran mayoría de Enterobacteriales resistentes a la colistina son *K. pneumoniae*, y el 4,7% restante se distribuye entre *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* y *Citrobacter spp.*(17) La mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos y colistina, cuentan con enzima tipo KPC en el >80% de los casos, seguido por la presencia de metalo- β -lactamasa NDM-1 y carbapenemasas del grupo OXA-48 (17), debido a la presencia de resistencia a carbapenémicos, muchos de los pacientes incluidos en los estudios tenían exposición previa a colistina, lo que pudiera sugerir un mecanismo de selección de mutantes de resistencia. (2) En cuanto a las especies, el 93,4% de los aislados con *mcr* en las Américas en estudios publicados son Enterobacteriales *E. coli*, seguida de *K. pneumoniae* y *Salmonella enterica* (3,3% y 1,9%, respectivamente). El 1,4% restante pertenecía a *Escherichia fergusonii*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella oxytoca*. (2)

En México, la resistencia a colistina por *mcr-1* se detectó por primera vez en una muestra de heces de cerdo en una granja en 2018 en una cepa de *E. coli*. Un año más tarde, también se encontró que un aislado de *E. coli* de una muestra fecal de un niño hospitalizado portaba el gen *mcr-1*, siendo la primera muestra clínica mexicana. (18) Ese mismo año se identificó el gen *mcr-1* en 5 aislados más de *E. coli* en granjas de cerdos en México.

En 2021, se reportó un brote de *L. adedecarboxylata* portador de *mcr-9* en hemocultivos de pacientes pediátricos sepsis por NTP contaminada en cuatro centros de Guadajara Jalisco (19)

Pruebas de susceptibilidad a colistina

Tanto EUCAST como CLSI consideran la microdilución en caldo (BMD) como el método de referencia, mientras que CLSI también acepta dos métodos alternativos (disco de elución en caldo y prueba de colistina en agar). (20)

Después de una revisión de la farmacocinética/farmacodinámica (PK/PD); los puntos de corte de polimixina B y colistina finalmente se establecieron para *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp* en ≤ 2 mg/L (intermedio) y ≥ 4 mg/L (resistente), sin categoría susceptible; sugiriendo que estos agentes tienen una eficacia clínica limitada o desconocida incluso para aislamientos con valores de CIM < 2 mg/L con la siguiente recomendación: “Si están disponibles, se prefieren fuertemente los agentes alternativos [que no son polimixinas]. La colistina (metanosulfonato) debe administrarse con una dosis de carga y dosis máximas ajustadas a función renal. Cuando se administra sistémicamente, es poco probable que este medicamento sea efectivo en casos de neumonía”, establecidos en el documento M100. (21)

Métodos validados para la medición de MIC colistina CLSI 2022-06-12

Control de calidad: *P. aeruginosa* ATCC 27853 y un aislado de *E. coli* productor de *mcr-1* del CDC AR Bank (número de acceso del CDC AR Bank 349).

- **Para test de MIC microdilución en caldo** (MCD: Estándar de referencia CLSI *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp*)
- **Método de dilución en agar** (*P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*): Tiene la ventaja de poder probar hasta 10 aislados a la vez. Agar Mueller-Hinton de colistina (MHA, BD Diagnostics, Le Pont de Claix, Francia) a concentraciones 0, 1, 2 y 4 $\mu\text{g/ml}$. Una suspensión de 0.5 McF con dilución final 1×10^4 UFC/mancha. (22)
- **Método de disco por elución en caldo** (CBDE) (*P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*) caldo Mueller-Hinton con cationes ajustados (CA-MHB; Remel, Lenexa, KS) a los que se agregara discos de colistina a distintas concentraciones (0, 1, 2 y 4 $\mu\text{g/ml}$. Los tubos se incuban a

temperatura ambiente durante 30 min. Se agrega el inóculo en solución salina 0.9% y estandarizando la turbidez para que coincidiera con la de un estándar McFarland 0,5 a partir de preparado de colonias frescas de una placa de agar con sangre de oveja 18-24 hrs de incubación. Se añade una alícuota de 50 µl de la suspensión estandarizada a cada tubo, y los tubos se agitan suavemente para obtener un inóculo final de $7,5 \times 10^5$ UFC/ml. Después de una incubación de 16 a 20 h a 35 °C en aire ambiente. (23)

Debido a la poca disponibilidad del método de referencia en la mayoría de los centros, el número de aislamientos probado para la susceptibilidad a la colistina es limitado.

Otros métodos de detección de resistencia a colistina

El método de difusión en disco no se recomienda porque, en comparación con el método estándar de microdilución en caldo, detecta una tasa muy alta de resultados falsamente sensibles. Esto puede ser causado por la distribución desigual de la colistina en las placas de agar, la adhesión de colistina al plástico de las placas de Petri o por la desnaturalización de la molécula de colistina durante su almacenamiento e incubación, debido a que su estabilidad depende de la temperatura. (14) Por otro lado, también se requiere precaución al interpretar estudios en donde se utilizó el Colistin Etests, ya que la tasa más alta de errores graves (“Very major errors” VMEs) en los estudios para resistencia a colistina notificada con una prueba E test fue de 41,5 %, por lo que actualmente no se recomienda como método de prueba. (24) (25)

La reproducibilidad de los métodos automatizados se ha estimado calculando la concordancia categórica de precisión (PCA) definida como la concordancia con los criterios interpretativos de EUCAST. Considerándose un método reproducible aquellos con $PCA \geq 95$ %. Los sistemas AST automatizados BD Phoenix y MicroScan proporcionaron resultados categóricos precisos y reproducibles para la prueba de colistina en *Enterobacterales*, cabe destacar que son estudios en un solo centro, principalmente en Europa y Estados Unidos de América. No ha sido estudiada aún esta concordancia en microorganismos no *Enterobacterales*. A diferencia de Phoenix y MicroScan; Vitek2 mostró índices inaceptables de resultados falsos susceptibles en diferentes estudios, con tasas de VMEs de hasta 36% (26)(24), especialmente con aislados de *E. coli* y *Enterobacter spp* que tenían CIM de 4 mg/L por BMD (falsa susceptibilidad). La alta tasa de falsos susceptibles por este método superó la recomendación CLSI de $\leq 1.5\%$. (27) El uso de este sistema sin confirmación conduciría a una subestimación de la resistencia a la colistina, por lo cual no se recomienda su uso único para establecer resistencia a colistina.

Los sistemas automatizados Vitek®2 (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia) y Phoenix® (Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, MD, EE.UU), no se recomiendan para determinar resistencia a la colistina. Esto debido a la poca precisión que tienen estos sistemas para establecer un punto de corte adecuado cuando la CIM está entre 2-4. (25)

Se ha descrito que la resistencia mediada por elementos móviles puede ser de bajo nivel, es decir encontrarse entre las dos diluciones dentro del punto de corte de susceptibilidad intermedia (2-4); el uso de colistina en cepas que tienen este nivel de CIM no ha sido estudiado en estudios clínicos y se desconoce su impacto en la vida real en el tratamiento de los pacientes. (24)

Detección basada en inmunoensayo de flujo lateral NG-Test MCR-1

Por otro lado, la detección basada en la identificación del gen *mcr-1*, permite la investigación de un gran número de muestras en un corto período de tiempo. El NG-Test MCR-1® es un Inmunoensayo de flujo lateral (LFA) de un solo uso para la detección rápida de la enzima *mcr-1* directamente de colonias bacterianas y fue descrito originalmente por Volland et al. (28)(29) Utiliza anticuerpos monoclonales de ratón anti-*mcr-1* marcados con estreptavidina para detectar *mcr-1* directamente de colonias bacterianas. La membrana de nitrocelulosa del ensayo tiene dos regiones: la región de prueba (T) (banda T), que contiene los anticuerpos anti-*mcr-1* de ratón y la región de control (C) (banda C), que contiene anticuerpos monoclonales de cabra anti-ratón y que funciona como control positivo interno. (29). El límite de detección de la prueba se determinó empleando enzima recombinantes purificadas de *mcr-1* y se estableció en 300 pg/mL.

En el estudio la validación de esta herramienta, NG-Test MCR-1® se evaluó en tres centros de referencia un total de 284 cepas, 101 verdaderas positivas para *mcr-1*:

- 44 cepas clínicas en el CNR Kremlin Bicetre en París, Francia
- 123 cepas clínicas en ANSES Lyon, Francia
- 117 cepas clínicas en el CNR Clermont Ferrand

LFIA encontró que todos los aislamientos productores de *mcr-1* eran positivos y no se observaron resultados falsos negativos, estableciéndose una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98 % en el estudio inicial para la detección de *mcr-1*. También se encontró que tres de los cuatro aislamientos productores de *mcr-2* eran positivos (n=4). Este estudio no detecta aislamientos productores de *mcr-3*, *mcr-4* o *mcr-5*. (29)

Esta prueba es rápida, sensible, específica, fácil de usar y rentable y, por lo tanto, puede implementarse en cualquier laboratorio de microbiología del mundo, por lo que es una herramienta importante para la detección y el

seguimiento rápidos de los productores de *mcr-1* en humanos y animales que permite la toma de decisiones de forma rápida impactando en los desenlaces clínicos de los pacientes críticamente enfermos.

La prueba NG-Test MCR-1®, no ha sido probada en estudios en México.

Justificación

La resistencia emergente a la colistina, ya sea por mutaciones cromosómicas o por mecanismos mediados por plásmidos (familia de genes MCR) (que en todos los casos conducen a modificaciones de los lipopolisacáridos de la membrana externa en bacterias gramnegativas); está actualmente presente en animales, productos de origen animal y muestras humanas, y representa una nueva amenaza para la salud pública mundial.

La resistencia a colistina por genes transferibles y con diseminación interespecie entre los bacilos gram negativos se encuentra en ascenso en los últimos años. A pesar de que actualmente se desconoce la proporción de cepas con este tipo de resistencia en México, es necesario implementar el uso de herramientas de detección rápida y sencilla que puedan contribuir en la toma de decisiones terapéuticas y mejorar a los desenlaces en los pacientes.

Por lo tanto, conocer el desempeño de prueba NG-Test MCR-1 ® en cepas clínicas servirá para extender su uso en el área clínica.

Pregunta de investigación

¿El NG-Test MCR-1 LFA ® puede detectar resistencia a colistina mediado por gen MCR-1 en bacilos gram negativos?

Hipótesis

El NG-Test MCR-1 LFA ® puede detectar resistencia a colistina mediada por gen MCR-1 en bacilos gram negativos.

Diseño del estudio

Experimental de ciencias básicas

Tamaño de muestra

A *conveniencia* de acuerdo al número de cepas disponibles de cumplan criterios de inclusión.

Objetivos

Objetivo primario

Determinar si NG-Test MCR-1 LFA ® puede detectar la presencia del gen MCR-1 en cepas de bacilos gram negativos con resistencia a la colistina.

Objetivos secundarios

- I. Describir la proporción de las cepas a nivel de género y especie bacteriana con resistencia a colistina.
- II. Describir la proporción de aislamiento por hospital de origen.
- III. Describir el perfil de resistencias para otros antibióticos: carbapenémicos, cefalosporinas de tercera generación (Ceftazidima y/o Ceftriaxona), aminoglucósidos, quinolonas, aztreonam, trimetoprim con sulfametoxazol.
- IV. Determinar el coeficiente de concordancia de NG-Test MCR-1 LFA ® y PCR punto final para *mcr-1* en bacilos gram negativos.
- V. Determinar la Sensibilidad, Especificidad, VPN, VPP de la prueba NG-Test MCR-1 LFA ®
- VI. Clasificar el mecanismo de resistencia entre las cepas con CIM de colistina mayor de 2, en mecanismo de resistencia mediado por *mcr-1* y no mediado por *mcr-1*.
- VII. Determinar la CIM de colistina para los aislamientos con y sin resistencia a colistina mediada por *mcr-1*
- VIII. Describir la prevalencia de *mcr-1* en bacilos gram negativos.

VARIABLES DEL ESTUDIO

Tabla 2. Definición de variables

Variable	Definición operativa	Tipo	Valor de la Medición
Microorganismo	Género y especie de la bacteria	Cualitativa Nominal	Género y especie
Prueba de macrodilución de colistina	Técnica para cribado de resistencia a la colistina mediante la turbidez visualmente detectada; a partir de una solución de colistina a concentración de 4 µg.mL ⁻¹ en una concentración bacteriana de 0.5 unidades mcFarland después de 18 h de incubación a 37 °C.	Cualitativa nominal	Resistente: Turbidez visualmente observable Sensible: Ausencia de turbidez visualmente observable
Prueba de microdilución de colistina para bacilos gram negativos	Estándar de oro para determinación de resistencia a colistina de acuerdo a método descrito en manual CLSI 2022. Preparación de placa de microdilución con concentraciones de colistina entre 0.062 hasta >64 en 8 pocillos.	Cuantitativa Nominal	Resistente: Turbidez visualmente observable Sensible: Ausencia de turbidez visualmente observable.
Hospital de origen	Hospital del que se recibió la muestra clínica.	Cualitativa Nominal	INR HCG INSP
Resistencia a carbapenémicos	Determinación de resistencia a carbapenémicos cuando la CIM sea categorizada como Resistente o Intermedio de acuerdo a método descrito en manual CLSI 2022 por método automatizado Vitek2 o difusión en disco.	Cualitativa Nominal	Resistente: Valores de CIM que se incluyan en las categorías Resistente o intermedia de acuerdo a puntos de corte CLSI Sensible: Valores de CIM que se incluyan en la categoría Sensible de acuerdo a puntos de corte CLSI
Germen difícil de tratar	Bacilo gram negativo con resistencia a todos los agentes de primera línea (naturalmente sensibles) β-lactámicos y fluoroquinolonas. Esta resistencia obliga al uso de agentes menos efectivos o más tóxicos, como aminoglucósidos, tigeciclina o polimixinas.	Cualitativa Nominal	Positivo: Presencia de resistencia a carbapenémicos y quinolonas. Negativo: Sensibilidad a cualquier carbapenémico y/o quinolonas.
Expresión de BLEE	Enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación	Cualitativa Nominal	Positivo: Capacidad de hidrolizar penicilinas, oximino-cefalosporinas (CTX, CRO, CZA, CEF) y monobactámicos (AZT) pero no cefamicinas (FOX) ni

			carbapenémicos (IMI, MER, ERT), siendo inhibidas por el ácido clavulánico (<2 diluciones de diferencia entre betalactámico con inhibidor o <5mm en el halo de inhibición mediante método de difusión) * Negativo: Que no cumpla todos los puntos de la definición previa.
Expresión de AmpC	Enzima con capacidad de hidrólisis de cefalosporinas de tercera generación. Su expresión se puede sugerir mediante una serie de reglas fenotípicas o caracterizar mediante identificación molecular.	Cualitativa Nominal	Positivo: Capacidad de hidrolizar penicilinas y oximino cefalosporinas (CTX, CRO, CZA, CEF) ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Resistentes a la hidrólisis cloxacilina y AZM, así como el ácido borónico y sus derivados (ácido fenil-borónico), Negativo: Que no cumplan con todos los puntos de la definición previa
Prueba de NG-Test MCR-1 LFA®	Es un inmunoensayo rápido de flujo lateral de un solo uso que utiliza anticuerpos monoclonales de ratón anti- <i>mcr-1</i> marcados con estreptavidina para detectar <i>mcr-1</i> directamente de colonias bacterianas.	Cualitativa Nominal (variable dependiente)	Negativo: No se encontró fenotipo de resistencia por <i>mcr-1</i> Positivo: Si se encontró fenotipo de resistencia por <i>mcr-1</i> Inválido: La prueba no puede ser interpretada
Prueba de resistencia mediada por PCR MCR-1	Técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias de ADN del gen <i>mcr-1</i> mediante reacción de cadena de polimerasa para ser copiado y amplificado billones de veces. El producto del PCR (punto final) es posteriormente visualizado en un gel de agarosa y da un resultado cualitativo sobre la evidencia o no del gen <i>mcr-1</i> en el aislado.	Cualitativa Nominal (variable independiente)	Positiva: Se encontró gen de resistencia <i>mcr-1</i> Negativa: No se encontró gen de resistencia <i>mcr-1</i>
Resistencias bacterianas adicionales a la colistina.	Perfil de resistencias a antibióticos: Carbapenémicos, CZA/CRO, LVX, SXT, AZM, mediante métodos con interpretación mediante los puntos de corte CLSI 2022	Cualitativa Nominal	Resistente Sensible Intermedio

*ATM: Aztreonam. CRO: Ceftriaxona. CZA: Ceftazidima. FOX: Cefoxitina. TZP: Piperacilina y tazobactam. SXT: Trimetoprim con sulfametoxazol. LVX: Levofloxacino. IPM: Imipenem. MEM: Meropenem. ETP: Ertapenem. INR: Instituto Nacional de Rehabilitación. INSP: Instituto Nacional de Salud Pública. CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

Material y métodos

- 1) Recolección de las cepas de bacilos gram negativos aislados a partir de muestras clínicas con resistencia a colistina de los ceparios de los siguientes centros: Instituto Nacional de Rehabilitación, Hospital General de Guadalajara, Instituto Nacional de Salud Pública.
- 2) Incorporación a la base de datos en plataforma de Excell. Office 2021.
- 3) Se realizó un protocolo de tres pasos secuenciales en las instalaciones del laboratorio de Microbiología del Instituto de Rehabilitación para incluir a las cepas de estudio (**Anexo 1 para metodología completa**):
 - i. **Paso 1:** Se verificó la susceptibilidad natural a colistina en las cepas incluidas mediante la identificación a nivel de género y especie por sistema automatizado Vitek®2.
 - ii. **Paso 2:** Se realizó prueba de CIM de colistina por macrodilución en caldo y se incluyeron en el paso 3 aquellas con un resultado turbidez visualmente observable en el tubo de CIM > 2.
 - iii. **Paso 3:** Se realizó prueba de CIM de colistina por microdilución en caldo y se incluyeron en el estudio final las cepas con un resultado de CIM \geq 2.
- 4) De las cepas incluidas en el estudio, se recabaron los patrones de resistencia antibiótica obtenidos con una metodología mixta por sistema automatizado Vitek2 y/o difusión disco en agar. Los resultados se interpretaron de acuerdo a las normas de CLSI versión 2022 y las cepas se clasificaron en una de las cuatro categorías: Sensible (S), Intermedio (I), Susceptible dependiente de dosis (SDD) si aplica, y Resistente (R) para cada antibiótico estudiado.
- 5) Se clasificará a las cepas de acuerdo a su patrón de resistencia como: cepa BLEE, AmpC, resistente a carbapenémicos o bacterias de difícil tratamiento, (categorías no excluyentes entre ellas) de acuerdo a normas de CLSI, y se clasificará de acuerdo a guías OMS de resistencia bacteriana.
- 6) Se realizó determinación del gen *mcr-1* por PCR punto final para gen *mcr-1* utilizando una cepa de **E. coli AR Bank 0349** (una cepa productora de *mcr-1*) como control positivo, en todas las cepas con resistencia adquirida comprobada por micro y macrodilución (**Anexo 1 para metodología completa**)
- 7) Prueba de NG-Test MCR-1 ®: Se considerará un resultado positivo en caso de tener dos líneas paralelas y negativo una línea (control positivo). La prueba se notificará como inválida en caso de que no se detecte línea de control positivo. (**Ilustración 6**)
 - a) Las cepas con resistencia a colistina mediada por *mcr-1* comprobada por PCR punto final, serán consideradas verdaderos positivos y se les realizará la prueba NG-Test MCR-1 ®.
 - b) El resto de las cepas con resistencia a colistina no mediada por *mcr-1* (prueba de PCR punto final negativa) serán consideradas

verdaderos negativos y de acuerdo al número de pruebas NG-Test MCR-1 ® disponibles posterior al paso i., se aleatorizarán para ser sometidas a esta prueba.

- 8) Análisis estadístico de acuerdo a resultados.
- 9) Desarrollo de discusión y conclusiones.

Análisis estadístico

La captura de datos que llevó a cabo en el programa Excel y el análisis estadístico se realizará en el programa SPSS versión 22.

Los resultados del análisis descriptivo se reportaron en porcentajes y frecuencias.

Se obtuvo el Coeficiente Kappa de los valores obtenidos de la PCR y el NG-Test MCR-1 LFA ®: Si el coeficiente alcanza al menos 0.61 se considerará positivo (concordancia significativa) para la relación entre estas dos pruebas.

El índice de Kappa nos permite evaluar la confiabilidad cuando tenemos dos evaluadores, o dos pruebas cuando tenemos variables nominales u ordinales, es el nivel de concordancia entre dos mediciones más allá del azar. Un valor de índice de Kappa >0.5 indica una confiabilidad moderada entre evaluadores, un índice por encima de 0.61-0.8 indica una confiabilidad buena, y un índice por encima de 0.8 se considera excelente.

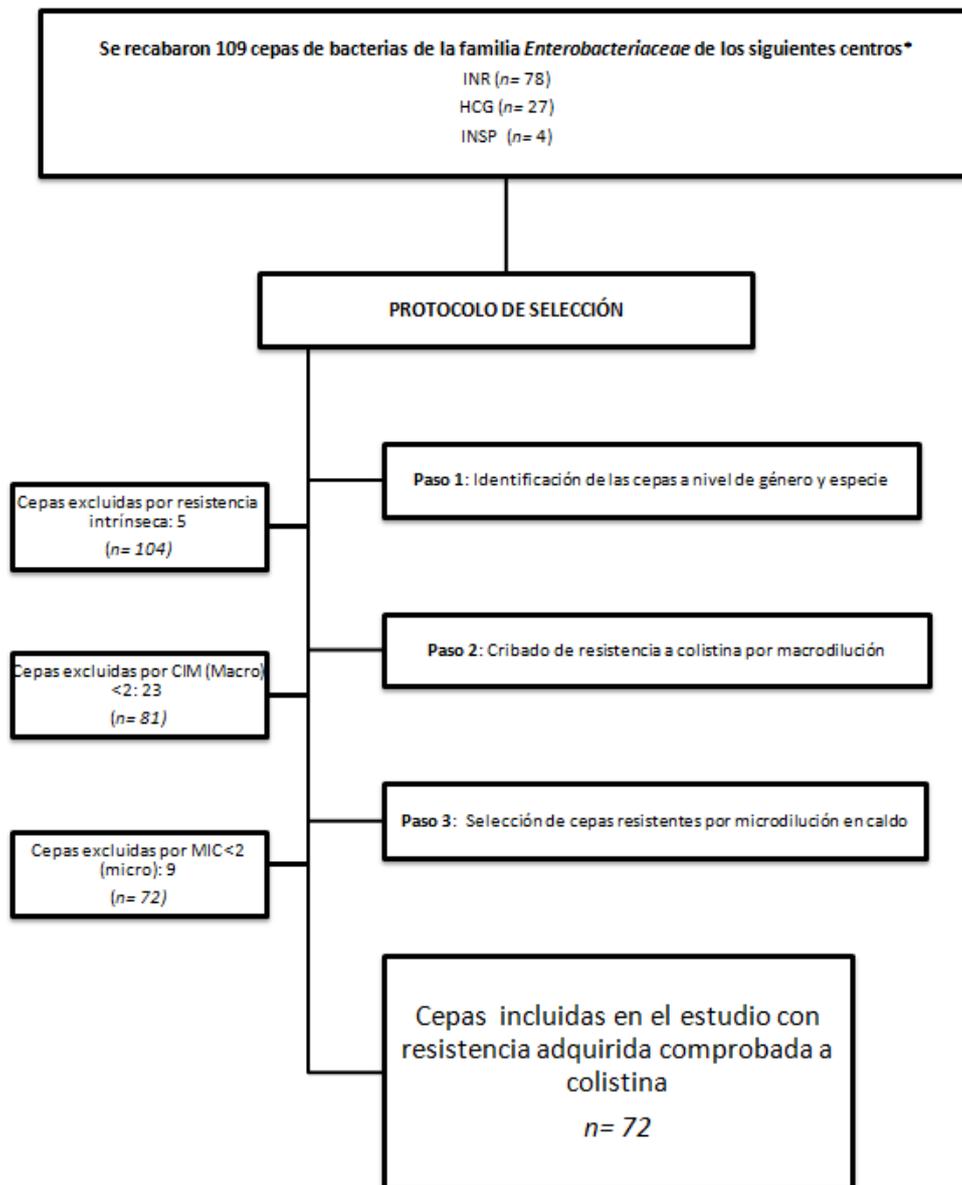
Cálculo de la Sensibilidad, Especificidad, VPN, VPP de la prueba NG-Test MCR-1 LFA ®

Consideraciones éticas

Por su característica experimental de ciencias básicas. Todos los experimentos se realizaron bajo las normas de seguridad de acuerdo al tipo de muestra y procedimientos; por lo que se considera que este estudio tiene un riesgo inferior al mínimo. Debido a que no realizará ninguna intervención con pacientes, no será necesario contar con consentimiento informado.

Resultados

Se recabaron un total de 109 cepas de tres centros de concentración: Instituto Nacional de Rehabilitación con 78 cepas, Instituto Nacional de Salud Pública con 4 cepas y Hospital Civil de Guadalajara con 27 cepas con resistencia a colistina con algún método automatizado. Se identificaron las cepas a nivel de género y especie, dentro de las cuales se descartaron 2 del género *Serratia marcescens* y 3 del género *Proteus* debido a presentar resistencia intrínseca. (Ilustración 1)



* INR: Instituto Nacional de Rehabilitación. HCG: Hospital Civil de Guadalajara. INSP: Instituto Nacional de Salud Pública.

Ilustración 1. Diagrama de selección de cepas de estudio

Se descartaron 23 cepas que presentaban sensibilidad a colistina por macrodilución en el primer paso del cribado, y se descartaron otras 9 cepas con cribado de colistina por macrodilución resistente pero con CMI por microdilución debajo de 2, los resultados de microdilución sensible, se repitieron para confirmar la sensibilidad y se excluyeron al confirmarse la misma.

Se obtuvieron 72 cepas que cumplían criterio de inclusión con detección de resistencia a colistina mediante macrodilución en caldo y que fueron confirmados mediante método de microdilución en caldo, con al menos una CIM para los dos métodos ≥ 2 .

El género más frecuentemente encontrado en el estudio fue *Enterobacter* especie *cloacae* y en segundo lugar especie *lugwigii*. Con menor frecuencia *Escherichia coli*, especies del género *Klebsiella* y *Pantoea*. (Ilustración 1)

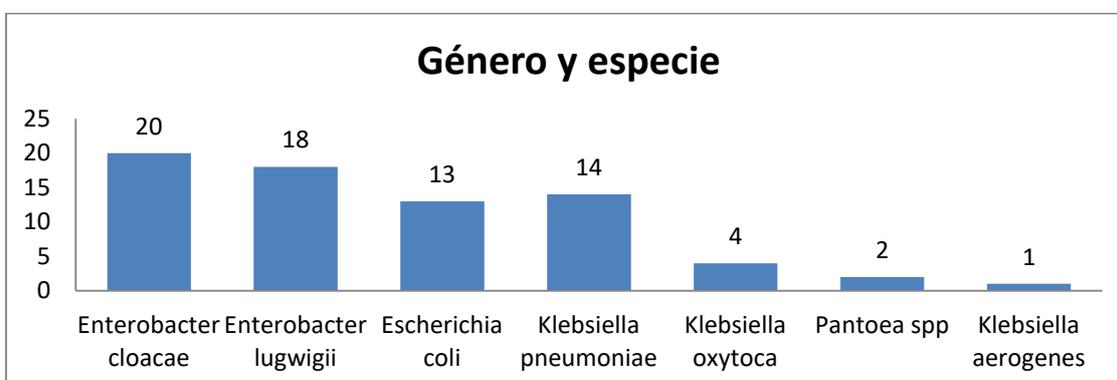
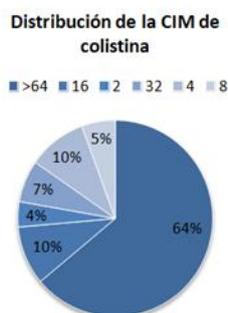


Ilustración 2. Distribución de la frecuencia de género y especie de bacterias con resistencia a colistina confirmada.

CIM de colistina por microdilución		
	Frecuencia	Porcentaje
>64	46	63,9
16	7	9,7
2	3	4,2
32	5	6,9
4	7	9,7
8	4	5,6
Total	72	100



La mayoría de las cepas (64%) se consideró con CIM altas de resistencia a colistina (>64), y la distribución de las CIM no se relacionó significativamente con otras variables como el género y especie o la presencia de otras

Resistencias. (Ilustración 2)

Ilustración 3. Distribución de CIM de colistina por macrodilución

Resistencia a antimicrobianos

La prevalencia de resistencias a betalactámicos mediante enzimas tipo BLEE fue del 6.9%, AmpC del 22.2%, carbapenémicos del 16.7% y solamente el 15.3% de los aislados con resistencia a colistina fueron bacterias considerados de difícil tratamiento. El 60% de los aislados mantuvo sensibilidad completa a los fármacos de primera línea (cefalosporinas, carbapenémicos y quinolonas).

El 34.7% (25/72) presentó resistencia a cefalosporinas de tercera generación CRO/CZA, el 16.7% (12/72) se detectó con resistencia a carbapenémicos IMI, ETM o MER, 33.3% (24/72) fueron resistentes a SMX, 62.5% (45/72) presentan resistencia a algún aminoglucósido AMK y/o GNM, 37.5% (27/72) presentó resistencia a alguna quinolona LVX o CIP, 65.3% (47/72) presentó resistencia a aztreonam y sensibilidad intermedia 2.8% (2/72)

El nivel de resistencia a colistina no se relacionó con patrones de resistencia adicionales específicos.

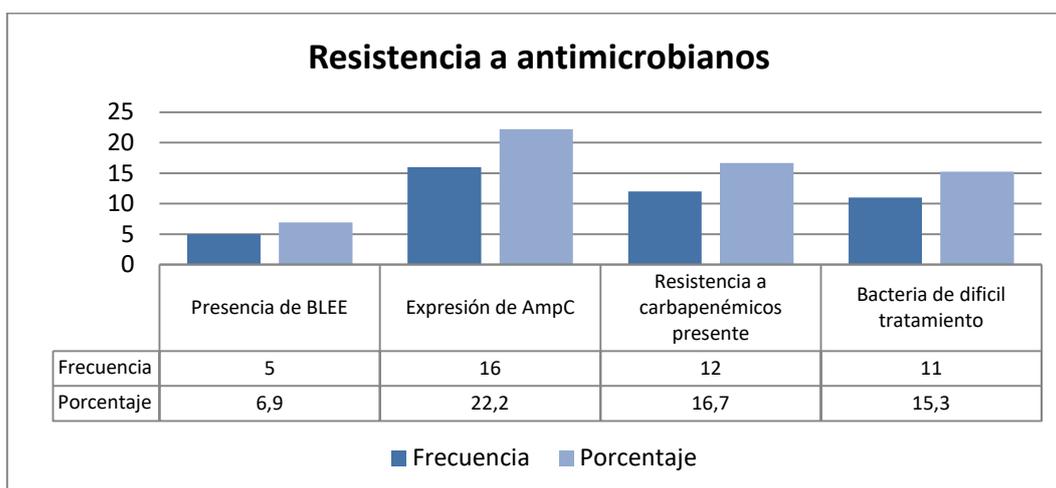


Tabla 3. Prevalencia de BLEE, AmpC, resistencia a carbapenémicos y bacterias de difícil tratamiento.

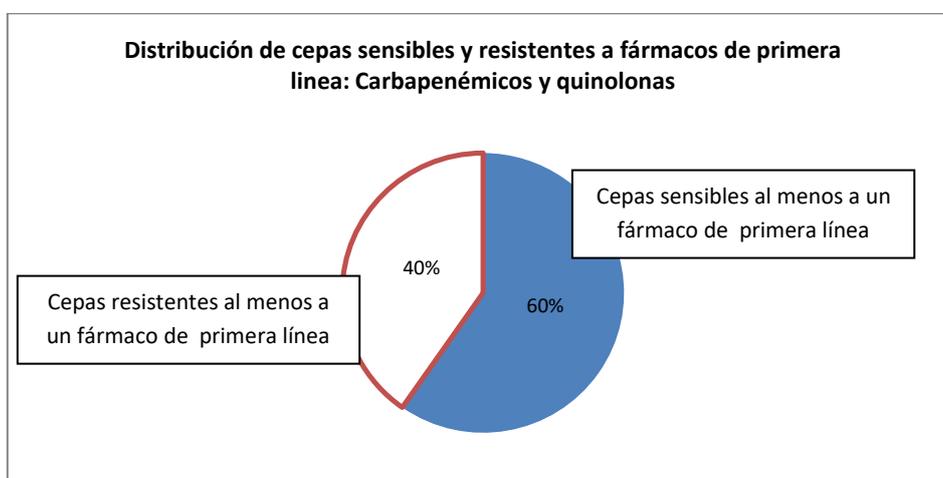


Ilustración 4. Prevalencia de bacterias de difícil tratamiento y resistencia a colistina

PCR

Se detectaron 6 cepas mediante método de PCR punto final positivas para el gen *mcr-1*, que corresponden al 8.3% del total de cepas con resistencia a colistina estudiadas, las cepas positivas por este método de referencia se consideraron verdades positivos.

En los casos que se tuvo duda sobre la presencia del gen se realizó la prueba de PCR por duplicado para descartar o confirmar la misma. (Ilustración 5)

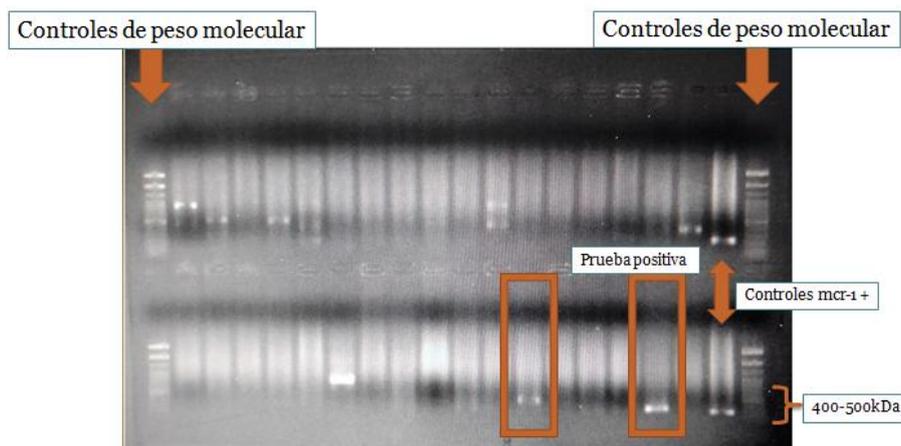


Ilustración 5. Lectura e interpretación de PCR punto final para *mcr-1*

PCR <i>mcr-1</i>	Frecuencia	Porcentaje
No detectado	66	91,7
Detectado	6	8,3
Total	72	100,0

Tabla 4. Tabla de frecuencias de PCR *mcr-1* (Método de referencia)

Debido a la ausencia de datos precisos, solo fue posible determinar la prevalencia de cepas *mcr-1* en Instituto Nacional de Rehabilitación. Con una cantidad de 5791 cepas en total del año Agosto 2011 al junio 2022 de enterobacterias susceptibles, se encontraron 64 con resistencia adquirida a colistina confirmada por microdilución; a 5 de ellas se les confirmó la presencia del elemento móvil genético *mcr-1*, como mecanismo de resistencia, que corresponden al 7.8% (5/64) de las cepas con resistencia a colistina y al 0.08% en la población de enterobacterias susceptibles.

Las especies portadoras del gen *mcr-1* fueron 2 *Enterobacter cloacae*, 1 *Enterobacter lugwiggi*, 1 *Escherichia coli*, 1 *Klebsiella oxytoca* y 1 *Pantoea spp.*

Dentro de la subpoblación con *mcr-1*, las CIM de colistina por microdilución fueron: 2 cepas con CIM >64, 2 de 32, 1 de 8, 1 de 2. Las resistencias

adicionales también se registraron: No se detectó en ninguna cepa resistente a carbapenémicos, una cepa mostró resistencia a cefalosporinas de tercera generación por presencia de BLEE, a amikacina y resistencia a quinolonas. 5/6 cepas fueron sensibles a SXM. 4/6 cepas fueron sensibles a todos los antibióticos estudiados distintos a colistina.

Prueba de NG-Test MCR-1 ®



Ilustración 6. Interpretación de prueba de flujo lateral

De las pruebas con PCR positiva para gen *mcr-1*; 5 pruebas resultaron positivas para la prueba de NG-Test MCR-1 ®.

Dentro del grupo de pruebas con PCR negativas, se eligieron 14 cepas de forma aleatoria y se les realizó también NG-Test MCR-1 ®, 2 pruebas resultaron positivas y 12 pruebas resultaron negativas.

No se identificaron pruebas indeterminadas o inválidas.

Índice de Concordancia de Kappa de Cohen

Se realizó una tabla cruzada con los resultados positivos y negativos entre las dos pruebas.

Se encontró para la prueba de NG-Test MCR-1 ® 1 falso negativo (1/6) y 2 falsos positivos (2/14), 5 verdaderos positivos (5/6) y 12 verdades negativos (12/14) (Tabla 5). Las medidas de exactitud diagnóstica para la evaluación de la prueba NG-Test MCR-1 ® se describen en la tabla 6.

Tabla cruzada entre NG-Test MCR-1 ® y PCR-mcr-1 (Estándar de Oro)					
			PCR-mcr-1		Total
			No detectado	Detectado	
NG-Test MCR-1 ®	Negativa	Frecuencia	12	1	13
		% dentro de NG-Test MCR-1 ®	92,3%	7,7%	100,0%
		% dentro de PCR-mcr-1	85,7%	16,7%	65,0%
	Positiva	Frecuencia	2	5	7
		% dentro de NG-Test MCR-1 ®	28,6%	71,4%	100,0%
		% dentro de PCR-mcr-1	14,3%	83,3%	35,0%
Total	Frecuencia absoluta	14	6	20	
	% dentro de NG-Test MCR-1 ®	70,0%	30,0%	100,0%	

Tabla 5. PCR método de referencia. NG-Test MCR-1 ® herramienta a evaluar.

Medidas de exactitud diagnóstica para la prueba NG-Test MCR-1 ®		
Medida	Valor	Porcentaje
Sensibilidad	5/6	83.3%
Especificidad	12/14	85.7%
VPP	5/ 7	71.4%
VPN	12/13	92.3%

Tabla 6. Medidas de exactitud diagnóstica para NG-Test MCR-1 ®. VPP: Valor predictivo positivo. VPN: Valor predictivo negativo.

El valor de p para índice de Kappa de Cohen de 0.659 resultó en 0.03.

Medidas simétricas				
	Valor	Error estándar	T	p
Medida de concordancia	0,659	0,179	2,967	0,003
Muestra aleatoria	20 de 72 (27.8%)			

Tabla 7. Índice de Kappa de Cohen.

“Con una probabilidad de error de 0.03%, podemos afirmar que existe una concordancia buena (Kappa = 0.659) entre los dos instrumentos de medición”

Discusión

La CIM para colistina en cepas estudiadas en lugares de alta incidencia, principalmente *Escherichia coli* de suelos y animales de consumo humano, cuando el gen *mcr-1* está presente, es frecuente se encuentre entre 2-16 mcg/mL (30). En nuestro estudio la CIM de colistina para cepas portadoras de *mcr-1* fue variable, desde una concentración de 2 mcg/mL (nivel que para fines operativos no se considera con resistencia probada), hasta >64 mcg/mL, sin embargo la cantidad de cepas positivas para *mcr-1* fue baja, sólo 8.3% y

probablemente esta sea a la causa de los hallazgos. Llama la atención que el principal microorganismo aislado tanto en portadores como en no portadores de *mcr-1* fue *Enterobacter cloacae* y *ludwigii*, representados con escasa incidencia en los estudios internacionales de prevalencia de resistencia a colistina, en donde en forma predominante encontramos *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp, seguidos de especies de *Salmonella*. (30) La distribución de las CIM de las cepas resistente independientemente del mecanismo de resistencia fue amplia y no se relacionó con ninguna otra variable, aunque la mayoría de las cepas tuvieron un CIM mayor de 64. (31)

Esta discrepancia pudiera deberse a la diferencia entre las frecuencias a nivel de género y especie y los mecanismos cromosómicos involucrados. Para género *Enterobacter*, se han descrito mecanismos de resistencia diversos principalmente mutación de RamA y mrgB, que característicamente pueden presentarse con CIM altas (>16) (32)

Los patrones de resistencia para la enterobacterias para quinolonas, cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos en este estudio fueron similares a los reportados en Hospitales de referencia de México de acuerdo al estudio INVIFAR en épocas previas a la pandemia de COVID19. (33) De acuerdo a investigaciones previas, la resistencia a colistina por elementos móviles y por mutaciones cromosómicas (31) se pueden encontrar presente incluso en cepas que nunca han tenido contacto con sistemas de salud o con uso de antibióticos. Lo cual orienta más a un origen transmitido a partir de cepas salvajes con resistencia intrínseca como *P. mirabilis* con esta mutación más que a la presión de selección por antibióticos. En este estudio, el 60% de las cepas resistentes a colistina tenían al menos un antibiótico de primera línea más útil y menos tóxico que colistina (cefalosporinas, carbapenémicos y/o quinolonas) para el cual se mantenía sensibles; por el contrario, el 15.3% de los aislados se consideraron bacterias de difícil tratamiento, sin opciones de primera línea para las cuales la colistina pudiera haberse considerado entre otras (tigeciclina, aminoglucósidos, etc) una opción de tratamiento.

Debido a falta de información para realizar un cálculo preciso, únicamente se pudo estimar datos de prevalencia para el centro INR; las cepas con resistencia a colistina por *mcr-1* se encontraron a partir del año 2015, incluso antes del reporte de la primera cepa con resistencia por *mcr-1* en un paciente pediátrico en el año 2018 en México. Se encontró una resistencia a colistina en el 1.1% de las enterobacterias y la presencia del gen de resistencia *mcr-1* se identificó en 5 de las 5791 cepas, con una prevalencia de 0.1% global, esto contrasta dramáticamente con la incidencia en China, en donde Liu YY, et al detectaron *mcr-1* en hasta el 20% de las cepas animales y el 1% de las cepas humanas. (8) La prevalencia de *mcr-1* al menos en este centro, se comporta de forma similar a lo reportado en países del este de Europa, en donde hasta el

momento la resistencia a colistina no es un problema de salud pública significativo. (34)

Los mecanismos de resistencia a la colistina son diversos; en sitios con alta incidencia de resistencia a colistina pero baja prevalencia de *mcr-1*, ha sido estudiados particularmente en el género de *Klebsiella* en India, mediante PCR de *mgrB* o secuenciación genética completa y se ha encontrado que la mayoría de las cepas con resistencia a colistina está determinado por modificaciones cromosómicas a nivel del LPS de pared con mutaciones puntuales o múltiples en sistemas complejos de expresión genética principalmente la vía del gen *mgrB*, y menos frecuentemente los genes *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB*, *pmrC* and *csrABC*. (31) Probablemente en México el comportamiento en patrones y mecanismos de resistencia sea similar a lo reportado en India más que a lo reportado en China, ya que en nuestro estudio el principal mecanismo de resistencia para colistina son mecanismos cromosómicos y no la presencia del elemento móvil *mcr-1* (resulta mayormente improbable que el mecanismo se deba a la expresión de otros genes móviles de la familia *mcr*).

Debido a las características de los lugares de origen de las cepas clínicas, no se descarta la posibilidad que en entornos de mayor uso de antibióticos, estancias más prolongadas, o alta carga de pacientes con patologías oncológicas, el patrón de resistencia sea distinto; de acuerdo a datos reportados de Egipto, en un centro de referencia de tercer nivel con alta incidencia de pacientes con tumores de órganos sólido y hematológicos, la incidencia en cepas MDR con resistencia a colistina se elevó hasta 8.8% y *mcr-1* de 5% (35) y se considera un problema real al no disponer de estrategias de tratamiento adecuadas para pacientes con enfermedades graves y deterioro del estado inmunológico.

Este es el primer estudio mexicano en el cual se evalúa en cepas nacionales la utilidad de la herramienta NG-Test MCR-1 ® en cepas resistentes de a colistina confrontándolo con el método de referencia.

A pesar de la baja prevalencia de *mcr-1* en nuestro estudio, la prueba de NG-Test MCR-1 ® seguida al pie de la letra, solamente detectó 5 de 6 casos confirmados por PCR, incluso cuando la prueba falsamente negativa tenía una CIM por microdilución >64mcg/mL, estimando una sensibilidad de 83.3% que contrasta con el estudio original de validación (29), en donde reportaron una sensibilidad del 100% pero con 101 cepas confirmadas. Por otro lado, se detectaron 2 pruebas positivas entre la muestra aleatoria de cepas verdaderamente negativas. De acuerdo al estudio original comentado, la prueba NG-Test MCR-1 ® puede detectar 3 de 4 pruebas positivas *mcr-2* con una n=4 y no se han reportado pruebas falsamente positivas por alguna otra causa hasta el momento. Si se comprueba que la falsa positividad de la NG-

Test MCR-1 ® fue debido a *mcr-2*, es probable que la incidencia de *mcr-2* en México sea más alta que la reportada hasta el momento.

El índice de concordancia entre el método de referencia y NG-Test MCR-1 ® fue de 0.65, lo cual lo sitúa en términos estadísticos dentro de una prueba con concordancia buena, sin embargo se aleja demasiado respecto al método de referencia que se reporta con una tasa de falsos negativos de <1.5% (36) para que sea de utilidad en nuestros centros; al menos con la epidemiología actual, no impresiona ser un estudio costo efectivo. Adicionalmente permanece en duda si la identificación del mecanismo exacto de resistencia a la colistina así como la CIM para colistina, tienen implicaciones clínicas prácticas, sobre todo en poblaciones bacterianas en donde se cuenta con otros fármacos menos tóxicos y con utilidad clínica demostrada disponibles.

Conclusiones

El elemento móvil *mcr-1* como causa de resistencia adquirida a colistina es de muy baja prevalencia. La PCR individual para *mcr-1* es el estándar de oro para identificación de este gen, esta técnica requiere personal entrenado, tiempo y equipo especializado. Sin embargo, la mayoría de las cepas resistentes a colistina tuvo un mecanismo de resistencia distinto a *mcr-1* en esta selección de cepas, probablemente por alguna mutación cromosómica que modifique el LPS de pared, sin embargo; la mayoría de estas mutaciones son complejas, y hasta el momento, no se pueden determinar de forma sencilla con una prueba inmunocromatográfica.

Debido a la baja prevalencia de este gen en aislados clínicos mexicanos, a la concordancia buena (pero no excelente) respecto al método de referencia, la falta de evidencia sobre la utilidad de conocer el mecanismo exacto de resistencia a colistina, así como a la presencia de otras opciones terapéuticas en la mayoría de las bacterias, sugerimos no utilizar de forma rutinaria o sistemática la prueba NG-Test MCR-1 ®.

Referencias

1. El-Sayed Ahmed MAEG, Zhong LL, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian GB. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):868–85.
2. Rodríguez-Santiago J, Cornejo-Juárez P, Silva-Sánchez J, Garza-Ramos U. Polymyxin resistance in Enterobacterales: overview and epidemiology in the Americas. *Int J Antimicrob Agents.* 2021;58(5).
3. Lyu C, Zhang Y, Liu X, Wu J, Zhang J. Clinical efficacy and safety of polymyxins based versus non-polymyxins based therapies in the infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):1–14.
4. Gogry FA, Siddiqui MT, Sultan I, Haq QMR. Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Front Med.* 2021;8(August):1–19.
5. Ahmed S, Hansen C, Dahlkilde AL, Herrero-Fresno A, Pedersen KS, Nielsen JP, et al. The effect of colistin treatment on the selection of colistin-resistant *Escherichia coli* in weaner pigs. *Antibiotics.* 2021;10(4):1–9.
6. علم الوطني، مخبر المل تقي في عالىات.، المؤسدة في الات صال. في دو آخرون. 2003;87–8.
7. Alan EC, José BNV, La A De, Sergio MJM, Perla LE, Ana B, et al. An Emergent Entity : Indolent Mucormycosis of the Paranasal Sinuses . A Multicenter Study. 2019;(2193):92–100.
8. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016;16(2):161–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
9. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(11):3087–95.
10. Group WHOA, Surveillance I, Resistance A. WHO | WHO list of Critically Important Antimicrobials (CIA) [Internet]. Available from: http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/cia/en/#.UiMEZ7zmSDA.mendeley
11. Li J, Beuerman R, Verma CS. Dissecting the molecular mechanism of colistin resistance in *mcr-1* bacteria. *J Chem Inf Model.* 2020;60(10):4975–84.
12. Berglund B. Acquired Resistance to Colistin via Chromosomal And Plasmid-Mediated Mechanisms in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Microbes Dis.* 2019;1(1):10–9.

13. Paul M, Carrara E, Retamar P, Tängdén T, Bitterman R, Bonomo RA, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). *Clin Microbiol Infect*. 2022;28(4):521–47.
14. Smelikova E, Tkadlec J, Krutova M. How to: screening for mcr-mediated resistance to colistin. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2022;28(1):43–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.09.009>
15. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompарт CM, Albertí S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun*. 2004;72(12):7107–14.
16. Wang Y, Tian GB, Zhang R, Shen Y, Tyrrell JM, Huang X, et al. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of mcr-1-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(4):390–9.
17. Martins WMBS, Nicoletti AG, Santos SR, Sampaio JLM, Gales AC. Frequency of BKC-1-producing Klebsiella species isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(8):5044–6.
18. Garza-Ramos U, Tamayo-Legorreta E, Arellano-Quintanilla DM, Rodríguez-Medina N, Silva-Sánchez J, Catalan-Najera J, et al. Draft genome sequence of a multidrug- and colistin-resistant mcr-1-producing Escherichia coli isolate from a swine farm in Mexico. *Genome Announc*. 2018;6(10):9–10.
19. Garza-González E, Bocanegra-Ibarias P, Rodríguez-Noriega E, González-Díaz E, Silva-Sánchez J, Garza-Ramos U, et al. Molecular investigation of an outbreak associated with total parenteral nutrition contaminated with NDM-producing Leclercia adecarboxylata. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):1–8.
20. Ekelund O, Klockhammer Hetland MA, Høyland Löhr I, Schön T, Somajo S. Rapid high-resolution detection of colistin resistance in Gram-negative bacteria using flow cytometry: A comparison with broth microdilution, a commercial screening test and WGS. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76(12):3183–91.
21. Lewis J, Weinstein M, Melvin B, Campeau S, Cullen S, Galas M, et al. CLSI M100 ED32_2022.pdf. 2022.
22. Turlej-Rogacka A, Xavier BB, Janssens L, Lammens C, Zarkotou O, Pournaras S, et al. Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(2):345–53.
23. Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, et al. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Bacilli. *J Clin Microbiol*. 2019;57(2):1–7.

24. Chew KL, La M Van, Lin RTP, Teo JWP. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *J Clin Microbiol*. 2017;55(9):2609–16.
25. WHO. The detection and reporting of colistin resistance. World Heal Organ. 2018;WHO/WSI/AM:1–17.
26. Anantharajah A, Glupczynski Y, Hoebeke M, Bogaerts P, Declercq P, Denis O, et al. Multicenter study of automated systems for colistin susceptibility testing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021;40(3):575–9.
27. CLSI. M52 Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility.
28. Fenwick AJ, Bergman Y, Lewis S, Yee R, Uhlemann AC, Cole N, et al. Evaluation of the NG-test mcr-1 lateral flow assay and EDTA-colistin broth disk elution methods to detect plasmid-mediated colistin resistance among Gram-negative bacterial isolates. *J Clin Microbiol*. 2020;58(4):1–9.
29. Volland H, Dortet L, Bernabeu S, Boutal H, Haenni M, Madec JY, et al. Development and multicentric validation of a lateral flow immunoassay for rapid detection of mcr-1-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2019;57(5):1–8.
30. Amin MB, Sraboni AS, Hossain MI, Roy S, Mozmader TAU, Unicomb L, et al. Occurrence and genetic characteristics of mcr-1-positive colistin-resistant *E. coli* from poultry environments in Bangladesh. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2020;22:546–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.03.028>
31. Ghafur A, Shankar C, GnanaSoundari P, Venkatesan M, Mani D, Thirunarayanan MA, et al. Detection of chromosomal and plasmid-mediated mechanisms of colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Indian food samples. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2019;16:48–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.09.005>
32. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin*. 2015;31(4):707–21.
33. López-Jácome LE, Fernández-Rodríguez D, Franco-Cendejas R, Camacho-Ortiz A, Morfin-Otero MDR, Rodríguez-Noriega E, et al. Increment Antimicrobial Resistance during the COVID-19 Pandemic: Results from the Invifar Network. *Microb Drug Resist*. 2022;28(3):338–45.
34. Bastidas-Caldes C, de Waard JH, Salgado MS, Villacís MJ, Coral-Almeida M, Yamamoto Y, et al. Worldwide Prevalence of mcr-mediated Colistin-Resistance *Escherichia coli* in Isolates of Clinical Samples, Healthy Humans, and Livestock—A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens*. 2022;11(6):659.
35. Zafer MM, El-Mahallawy HA, Abdulhak A, Amin MA, Al-Agamy MH,

Radwan HH. Emergence of colistin resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from cancer patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2019;18(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0339-4>

36. Li J, Shi X, Yin W, Wang Y, Shen Z, Ding S, et al. A multiplex SYBR green real-time PCR assay for the detection of three colistin resistance genes from cultured bacteria, feces, and environment samples. *Front Microbiol*. 2017;8(OCT):1–5.

Anexo 1.

El método manual empleando solución salina para extraer de DNA de cultivos bacterianos.

1. Verificar la pureza de la cepa previo al procedimiento, que la caja de cultivo bacteriano esté adecuadamente identificada y sembrada en medio agar sangre de cordero al 5%.
2. Rotular un vial de 500 a microlitros con el número de muestras signado. Colocará 100 microlitros de solución salina 0.9% en el vial.
3. Tomar una o dos colonias del cultivo y disolverlas en la solución salina 0.9%. Homogeneizar la muestra por un minuto en el vórtex.
4. Colocar el vial en un termo bloque a una temperatura del 95 °C durante 15 minutos. En cuanto pasen los quince minutos, homogeneizar el vórtex durante un minuto.
5. Inmediatamente, colocar el vial dentro del ultra congelador -70 °C durante cinco minutos
6. Pasado el tiempo de ultra congelación mantener el vial a temperatura ambiente hasta descongelar. Centrifugar el vial a 8000 r.p.m. durante cinco minutos.
7. Refrigerar el sobrenadante que contiene DNA bacteriano listo emplearse en diversas técnicas moleculares. Empleado esta técnica de extracción, el tiempo de viabilidad del material genético es de una hora.

Anexo 1.

Procesamiento de muestras para detección de genes mcr-1 en cultivos bacterianos

1. Realizarla siguiente mezcla de reacción por cada muestra:
 - Buffer 1.25 μ l
 - NDT'Ets 0.3 μ l
 - Primer forward mcr-1 0.3 μ l
 - Primer reversal mcr-1 0.3 μ l
 - AmpliTaq 0.07 μ l
 - H₂O 7.28 μ l
2. Para obtener un total de 9 μ l. Las corridas deberá acompañarse con tres reacciones más: 1 control resistente, 1 sensible y 1 negativo.
3. Colocar la mezcla de reacción en un vial de 200 μ l, adicionar 5 μ l de DNA bacteriano.
4. Colocar los viales dentro del termociclador Verity (Applied Biosystem) y seguir el protocolo:
 - A.** Desnaturalización 94 °C por tres minutos
 - B.** 30 ciclos continuos:
 1. Desnaturalización 94° 30"
 2. Alineamiento 55 °C 30 segundos
 3. Elongación de 68 °C 45 segundos
 4. Elongación 68 °C diez minutos
 - C.** Preservación a 4 °C hasta sacarlos del equipo
5. Preparar un gel de agarosa a una concentración de 1.5% SYBR Green. Emplear guantes de nitrilo para mayor protección.
6. Al haber terminado el segundo protocolo carga 10 μ l de cada muestra dentro de un pozo del gel, usar colorante (stop mix) en cada pozo para monitorizar el corrimiento. Emplean marcador de 100 pares de bases. Correr 120 mVol durante 40 minutos.