

**DETERMINAR LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA A COLISTINA
MEDIADA POR EL GEN MCR-1 EN CEPAS DE ESCHERICHIA COLI EN
PACIENTES ATENDIDOS EN EL HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES
TRÓPICO COCHABAMBA 2014 - 2017**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA JUAN MISAEL SARACHO
SECRETARIA DE EDUCACIÓN CONTINUA
DIRECCION DE POS GRADO
POS GRADO EN SALUD**



Tesis de maestría

Determinar la resistencia antimicrobiana a colistina mediada por el gen mcr-1 en cepas de Escherichia coli en pacientes atendidos en el hospital san Martin de Porres trópico Cochabamba 2014 - 2017

Por:

Lic. Primitiva Raquel Daysi Magne Ventura

Tesis presentada a consideración de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho, como requisito para la obtención del título de Maestría en Bioquímica Clínica y Microbiología Cochabamba–Estado Plurinacional de Bolivia

2019

El tribunal calificador de este trabajo no se solidariza con la forma, términos, modos y expresiones, vertidas en el mismo, siendo esta responsabilidad del autor (a)

APROBADO:

(Nombre tutora o tutor)

**SECRETARIO EDUCACIÓN
CONTINUA**

TRIBUNAL:

MSc.

MSc.

MSc.

Doy gracias a Dios y a mis padres y amigas (os) por el apoyo incondicional que me brindaron siempre.

INDICE GENERAL

<u>INTRODUCCIÓN.....</u>	1
<u>1. CAPÍTULO: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</u>	3
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	5
1.3. OBJETIVOS	5
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
1.4. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	5
1.5. VIABILIDAD.	7
<u>2. CAPÍTULO: MARCO TEÓRICO</u>	8
2.1. ANTECEDENTES.....	8
2.2. BACIOS GRAMNEGATIVOS ENTÉRICOS (ENTEROBACTERIACEAE).....	10
2.2.1. CLASIFICACIÓN.....	11
2.2.2. MORFOLOGÍA E IDENTIFICACIÓN	12
2.2.2.1. A. Microorganismos típicos.....	12
2.2.2.2. B. Cultivo	12
2.2.2.3. C. Características de desarrollo.....	12
2.2.3. ESCHERICHIA COLI	13
2.2.3.1. Patogenia y manifestaciones clínicas	14
2.2.3.2. Infección del sistema urinario.	14
2.2.3.3. Enfermedades diarreicas relacionadas con E. coli.....	15
2.2.3.3.1. E. coli enteropatógena (EPEC)	15
2.2.3.3.2. E. coli enterotoxígena (ETEC).....	16
2.2.3.3.3. E. coli productora de toxina Shiga (STEC)	17
2.2.3.3.4. E. coli enteroinvasiva (EIEC).....	18
2.2.3.3.5. E. coli enteroagregativa (EAEC).....	18
2.2.3.4. Septicemia.....	19
2.2.3.5. Meningitis.	19
2.3. EVOLUCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS	19
2.4. TIPOS DE RESISTENCIA	23
2.4.1. NATURAL O INTRÍNSECA.	23
2.4.2. ADQUIRIDA.....	23
2.4.2.1. Vías de adquisición de la resistencia:	23
2.5. MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIMICROBIANOS:.....	24

2.5.1. MECANISMOS GENÉTICOS.....	25
2.5.2. MECANISMOS BIOQUÍMICOS	26
2.5.2.1. Degradación o modificación del antibiótico	27
2.5.2.2. Reducción de la concentración de antibiótico bacteriano.....	28
2.5.2.3. Modificación del blanco del antibiótico	28
2.6. MECANISMOS DE RESISTENCIA EMERGENTES.....	30
2.6.1. RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS	30
2.6.2. RESISTENCIA A QUINOLONAS	31
2.6.3. RESISTENCIA A POLIMIXINAS	32
2.6.4. GENÉTICA MOLECULAR DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	33
2.6.4.1. Plásmidos.....	37
2.6.4.2. Elementos genéticos transponibles	39
2.6.4.3. Métodos de identificación del gen mcr-1	40
2.6.5. MÉTODOS GENOTÍPICOS DE IDENTIFICACIÓN DEL GEN MCR-1	41
2.6.5.1. Predifusion.	41
2.6.5.2. Método del disco combinado (CDT).....	41
2.6.5.3. Procedimiento Predifusion	42
2.6.5.4. Procedimiento del doble disco	42
2.6.5.5. Test Complementarios.....	43
2.7. IMPACTO MUNDIAL DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	43
2.8. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	45
2.9. ALCANCE DEL ESTUDIO	56
2.10. HIPÓTESIS.....	56

3. CAPÍTULO: DISEÑO METODOLÓGICO **57**

3.1. TIPO DE ESTUDIO	57
3.2. UNIVERSO.....	58
3.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN	58
3.3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.	58
3.3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.	58
3.4. UNIDAD DE ANÁLISIS.	58
3.5. POBLACIÓN DE ESTUDIO (DIANA).....	59
3.6. MUESTRA.....	59
3.7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	60
3.7.1. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES DEL OBJETIVO 1	60
3.7.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES DEL OBJETIVO 2	61
3.7.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES DEL OBJETIVO 3	63
3.8. RECOLECCIÓN DE DATOS, FUENTES, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS	64
3.9. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	64
3.10. ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN	69

4. CAPÍTULO: RESULTADOS ANÁLISIS Y DISCUSIÓN..... **70**

4.1. POBLACIÓN ESTUDIADA PARA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS SEGÚN EDAD, SEXO, AÑO DE REGISTRO Y TIPO DE MUESTRA.....	70
4.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA DE E. COLI SEGÚN ANTIBIÓTICOS MÁS FRECUENTES Y SU RELACIÓN CON LA EDAD Y SEXO DE LOS PACIENTES	75
4.3. FRECUENCIA DEL GEN MCR-1 EN CEPAS DE ESCHERICHIA COLI Y LAS CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES INFECTADOS	79
<u>5. CAPÍTULO: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</u>	83
5.1. CONCLUSIONES.....	83
5.2. RECOMENDACIONES	84
<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	85
<u>ANEXOS</u>	89

Índice de tablas

TABLA 1. POBLACIÓN ESTUDIADA PARA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS SEGÚN EDAD HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 - 2017	70
TABLA 2. POBLACIÓN ESTUDIADA PARA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS SEGÚN SEXO HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 - 2017	72
TABLA 3. POBLACIÓN ESTUDIADA PARA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS SEGÚN AÑO DE REGISTRO HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 - 2017	73
TABLA 4. POBLACIÓN ESTUDIADA PARA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS SEGÚN TIPO DE MUESTRA HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 - 2017	74
TABLA 5. RESISTENCIA DE E. COLI SEGÚN MECANISMO DE RESISTENCIA HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 – 2017.....	75
TABLA 6. RESISTENCIA DE E. COLI SEGÚN ANTIBIÓTICO HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 – 2017 (N=)	76
TABLA 7. E. COLI SEGÚN RESISTENCIA POR B LACTAMASAS Y SEXO HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 – 2017	77
TABLA 8. E. COLI SEGÚN RESISTENCIA POR B LACTAMASAS Y EDAD HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 – 2017	78
TABLA 9. E. FRECUENCIA DE RESISTENCIA A COLISTINA POR GEN MCR-1 HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 – 2017.....	79
TABLA 10. MECANISMOS DE RESISTENCIA QUE ACOMPAÑAN A LA RESISTENCIA DE LA E COLI A LA COLISTINA HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 – 2017 (N=192)	80
TABLA 11. FRECUENCIA DE RESISTENCIA A COLISTINA POR EL GEN MCR-1 HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 – 2017 (N=192).....	81

Índice de gráficos

GRÁFICO 1. POBLACIÓN ESTUDIADA PARA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS SEGÚN, EDAD HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 – 2017 (N=192)	71
GRÁFICO 2. POBLACIÓN ESTUDIADA PARA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS SEGÚN SEXO HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 - 2017	72
GRÁFICO 3. POBLACIÓN ESTUDIADA PARA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS SEGÚN AÑO DE REGISTRO HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 - 2017	73
GRÁFICO 4. POBLACIÓN ESTUDIADA PARA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS SEGÚN TIPO DE MUESTRA HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 – 2017 (N=192)	74
GRÁFICO 5. RESISTENCIA DE E. COLI SEGÚN MECANISMO DE RESISTENCIA HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 – 2017 (N=192)	75
GRÁFICO 6. RESISTENCIA DE E. COLI SEGÚN ANTIBIÓTICO HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 – 2017 (N=192)	77
GRÁFICO 7. FRECUENCIA DE RESISTENCIA DE E. COLI A COLISTINA POR GEN MCR-1 HOSPITAL SAN MARTIN DE PORRES TRÓPICO DE COCHABAMBA 2014 – 2017 (N=192)	79

Lista de Acrónimos

MLST	Multilocus sequence typing
MGE	Elementos Genéticos Móviles
MLST	Multilocus sequence typing
ST	Sequence type (Tipo de secuencia)
MCR-1	gen de resistencia a la colistina movilizada-1
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EPEC	E. coli enteropatógena
ETEC	E. coli enterotoxígena
STEC	E. coli productora de toxina Shiga
EIEC	E. coli enteroinvasiva
EAEC	E. coli enteroagregativa
RAM	Resistencia antimicrobiana
Nal	Acido nalidixico
Cip	ciprofloacino
Gn	gentamicina
AMK	amikacina
SXT	cotrimoxazol
AMP	ampicilina
AMC	amoxicilina mas acido clavulanico
CF	cafalotina
CTX	cefotaxima
CTZ	ceftazidima
ATM	aztreonam
BLEE:	Beta lactamasa de espectro extendido (resistencia a amino penicilinas y cefalosporinas de 1 a 4ta generación y Aztreonam)
BLEA:	Beta lactamasa de espectro ampliado (resistencia hasta amino penicilinas y cefalosporinas de primera generación)

RESUMEN

Objetivo: Investigar la resistencia a colistina mediada por el gen MCR-1 y antimicrobianos de uso frecuente en cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes muestras del año 2014 al 2017 en el Hospital San Martín de Porres del trópico de Cochabamba.

Material y Métodos: Estudio descriptivo correlacional, transversal, retrospectivo y no experimental en el que se aplicó una ficha de recolección de datos sobre muestras con *E. coli* en las que se buscó e identificó el gen MCR-1

Resultados: La media fue de 21,9 años de edad y los menores de 10 años de edad ocupan el 51 %; el 71 % de las muestras corresponden al sexo femenino. La mayor proporción de muestras provienen de orina con el 49 %, y de heces fecales con un 44,3 %. El 52 % de los casos exhiben algún tipo de resistencia, 34 % son resistentes mediante betalactamasas de espectro extendido, un 16 % para espectro ampliado y un 2 % con resistencia a otros antibióticos.

La frecuencia de resistencia a betalactamasas en el sexo Femenino es de 59 % y en el Masculino de 29 % el χ^2 fue 14,5 ($p = 0,0001$) y e OR = 3,57 (IC: 1,82 – 7,00); En los de 40 años y más esta resistencia es de 70 % y en los menores de 40 años de 44 % el χ^2 fue de 8,66 ($p = 0,003$) y el OR = 2,90 (IC: 1,40 – 6,00)

De 192 muestras procesadas en 3 de ellas se observó *Escherichia coli* resistente a colistina portadoras del gen MCR-1, lo que representa el 1,6 %. en dos se presenta además resistencia por Betalactamasas de espectro extendido. Los tres son del sexo masculino. Un caso se presentó el año 2016, y dos el año 2017. Una muestra fue de trasudado pos operatorio de muslo, otra secreción de pared y el último de heces fecales.

Conclusiones: La frecuencia de resistencia de la *E. coli* a los antimicrobianos es alta y se demostró la circulación del gen MCR -1

Palabras clave: Resistencia de *Escherichia coli* a colistina mediada por el gen MCR-1

Introducción

La creciente resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un problema candente, que de no combatirse a tiempo puede comprometer la salud de las generaciones. Los microorganismos resistentes han aumentado dramática y exponencialmente en las últimas décadas como consecuencia del uso y abuso de antibióticos. La resistencia antimicrobiana ya no es solamente un dilema médico, sino una amenaza global que requiere, para su control, una acción coordinada de muchos y diferentes actores e instituciones. (1)

Yi-YunLiu et.al. en diciembre del 2015 informaron la identificación del gen de resistencia a la colistina mediada por plásmido MCR-1 en China. Observaron que las Enterobacteriaceae positivas para mcr-1 estaban presentes en la carne de animales de venta al por menor y en pacientes con infección durante los años 2011-2014. (2)

En la década del 90, la colistina resurge como una opción de tratamiento de última línea para los patógenos gram negativos multiresistentes, incluyendo a carbapenémicos, tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomona aeruginosa*, responsables de infecciones asociadas a la atención de salud con alta morbilidad y mortalidad.

Hasta hace pocos años atrás, la resistencia a la colistina obedecía, principalmente, a mutaciones en los genes cromosómicos causantes de modificaciones en el lipopolisacárido de la pared bacteriana, el sitio de acción de este antibiótico. El descubrimiento del gen mcr-1 mediado por plásmidos, en el 2015 en China, constituye una emergencia en la actualidad al ser la primera evidencia de la transferencia horizontal de elementos genéticos móviles (plásmidos) que confiriera resistencia a la colistina. Esto resalta la importancia de mejorar la vigilancia mundial ya que las bacterias pueden compartir y diseminar fácilmente dicha resistencia.

Las polimixinas se emplean en animales de granja para prevenir infecciones y promover su crecimiento. Por ello es importante que la vigilancia de la

propagación del gen mcr-1 no se limite únicamente a la medicina humana, sino que también abarque al ámbito de la medicina veterinaria. El uso de polimixinas en la cría de animales ha favorecido la aparición del plásmido de resistencia a la colistina. En ese sentido, es urgente que el uso de este antibiótico sea limitado al tratamiento de animales afectados clínicamente.

El tratamiento dirigido de los pacientes con infecciones causadas por bacilos gran negativos multiresistentes es una tarea ardua, pues ha de recurrirse a un escaso número de antibióticos que, a menudo, son más tóxicos y posiblemente menos eficaces que β -lactámicos y fluoroquinolonas. En términos generales, se recomienda la utilización de al menos dos fármacos activos o con actividad sinérgica in vitro, tanto porque varios estudios observacionales han asociado esta estrategia con mejores desenlaces clínicos, como en un intento de evitar la emergencia ulterior de resistencia. (3)

En el trópico de Cochabamba el perfil de enfermedades infecciosas y la resistencia al tratamiento con antimicrobianos tienen como factores de riesgo el uso inadecuado de antibióticos tanto en personas como en animales, y es frecuente que se administren sin supervisión de un profesional, en este contexto también es importante tomar en cuenta la población extranjera que visita esta región, por lo que en este estudio se busca identificar la resistencia a colistina mediada por el gen MCR-1 y antimicrobianos de uso frecuente en cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes muestras del año 2014 al 2017 en el Hospital San Martín de Porres del trópico de Cochabamba.

1. CAPÍTULO: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema

Los primeros datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la vigilancia de la resistencia a los antibióticos indican que los niveles de resistencia a algunas infecciones bacterianas graves son elevados tanto en los países de ingresos altos como en los de ingresos bajos.

El nuevo Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos de la OMS, ha revelado la presencia generalizada de resistencia a los antibióticos en muestras de 500000 personas de 22 países en las que se sospechaban infecciones bacterianas.

Las bacterias resistentes más frecuentes fueron: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, seguidas de *Salmonella spp.* El Dr. Marc Sprenger, Director de la secretaría para la resistencia a los antimicrobianos de la OMS, señala que: el informe confirma la grave situación que representa la resistencia a los antibióticos en todo el mundo. Así mismo, explica que estamos comprobando que algunas de las infecciones más frecuentes y peligrosas son farmacorresistentes. Lo que resulta más preocupante es que estos patógenos no respetan las fronteras nacionales. Por esta razón, la OMS anima a todos los países a establecer buenos sistemas de vigilancia para detectar la farmacorresistencia, que pueden proporcionar datos al sistema mundial. (4)

La más reciente preocupación en términos de resistencia es la relacionada a la colistina en bacilos Gram negativos que ya se ha reportado en diferentes países de América Latina, Estados Unidos, Corea del Sur, Italia, Grecia, Arabia Saudita, entre otros países.

A nivel nacional aún no se realizaron estudios sobre este tipo de resistencia mediada por el gen MCR-1

El sitio geográfico donde se encuentra el Hospital San Martín de Porres es la zona tropical del departamento de Cochabamba sitio turístico, a 169 km de la misma, en la carretera nueva a Santa Cruz, en la localidad llamada Ibuelo.

Es un Hospital de atención materno infantil de segundo nivel acreditado, administrado por la congregación católica Dios es amor, trabaja como hospital de convenio con la subalcaldía de Shinahota, ofreciendo servicios a través de SUS (seguro universal de salud) a niños menores de cinco años, mujeres embarazadas y al adulto mayor.

El Hospital cuenta con 37 camas, atendiendo con las siguientes especialidades: Ginecología/obstetricia, Pediatría y medicina general, el promedio mensual de pacientes que acuden a consulta externa es de 1250 individuos

La zona tropical de Cochabamba tiene tres hospitales de segundo nivel y muchos de primer nivel y sin embargo solo el Hospital San Martín de Porres cuenta con laboratorio de microbiología, razón por la que todo diagnóstico microbiológico de la zona se refiere al laboratorio del Hospital San Martín de Porres, por lo que la demanda para cultivos y antibiogramas es alta realizándose un promedio por año de 950 pruebas, con demanda mayor en urocultivos, seguido de secreciones, coprocultivos, hemocultivos, etc.

La bacteria que con mayor frecuencia se aísla es la *Escherichia coli*, sobre todo en urocultivos, seguida de *Staphylococcus sp.* en lesiones en piel, y otros. Siendo la *Escherichia coli* una de las bacterias que porta el gen MCR-1, se desconoce que la bacteria portadora del gen este circulando en el trópico cochabambino, por lo tanto, se formula el siguiente problema.

Campo: Medicina

Área: Microbiología

Tema: Resistencia antimicrobiana a colistina mediada por el gen MCR-1 en cepas de *Escherichia coli* del Hospital San Martín de Porres trópico Cochabamba 2014 – 2017

1.2. Formulación del problema

¿Existe resistencia a colistina mediada por el gen MCR-1 y antimicrobianos de uso frecuente, en cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes muestras en el Hospital San Martín de Porres del trópico de Cochabamba en el periodo 2014 - 2017?

1.3. Objetivos

Objetivo general

Identificar la resistencia a colistina mediada por el gen MCR-1 y antimicrobianos de uso frecuente, en cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes muestras en el Hospital San Martín de Porres del trópico de Cochabamba en el periodo 2014 - 2017.

Objetivos específicos

- Determinar en la población estudiada la resistencia a colistina y antimicrobianos frecuentes según edad, sexo, año de registro y tipo de muestra.
- Identificar los mecanismos de resistencia de E. Coli a los antibióticos más frecuentes y su relación con la edad y sexo de los pacientes
- Conocer la frecuencia de resistencia a colistina mediada por el gen MCR-1 en cepas de *Escherichia coli* y las características epidemiológicas de los pacientes infectados

1.4. Justificación de la investigación

La importancia de conocer la presencia del gen MCR-1, en bacterias como la *Escherichia coli* agente patógeno, aislado frecuentemente de las infecciones urinarias, gastrointestinales y de otras patologías, radica en poder conocer si en nuestro medio se tiene la bacteria portadora del gen circulando, ya que su presencia confiere a la bacteria la resistencia a colistina, y que el mismo se

encuentra localizado en elementos genéticos móviles (plásmidos) extendiendo así la resistencia horizontal a otras bacterias.

Esto es preocupante, ya que en la práctica clínica se considera la colistina uno de los últimos y a veces único agente efectivo, para el tratamiento de bacterias con resistencia a múltiples antibióticos (beta lactámicos) como los portadores de carbapenemasas (KPc, NDM, OXA-48, etc.).

Lo que también acentúa esta investigación, es que este gen emergió no solo asociado a pacientes hospitalizados multitratados, si no en pacientes de la población en general en cuyas muestras se aislaron el gen MCR-1 principalmente en *Escherichia coli*. Se ha sugerido que la fuente probable de estas nuevas “superbacterias” sería el consumo intensivo de colistina/polimixinas en la crianza de animales para la producción de alimentos.

La presente investigación, ayudara a llenar el vacío de conocimiento frente a este gen MCR-1 en nuestra región y país, debido a que este tipo de investigación no ha sido publicada ni difundida en nuestro país.

A nivel mundial, desde que se lanzó la alerta del hallazgo de *mcr-1* a fines de noviembre del 2015 en China rápidamente encendió la alarma en todo el mundo y se inició la búsqueda de este gen en cepas de colección con resistencia a colistin. A la fecha, se ha confirmado *mcr-1* en cuatro continentes: América, Europa, África y Asia.

En nuestro continente en países que circundan al nuestro como Brasil, y Argentina, Perú reportaron hallazgos de este gen en cepas de colección retrospectiva, demostrando su presencia desde el año 2012

La investigación que se desarrolla en la tesis está basada en la identificación de gen MCR-1 por métodos fenotípicos sencillos como el de pre difusión y doble disco por la inhibición del EDTA, los mismos ayudaran para que su uso sea posible en los laboratorios de diagnóstico microbiológico como práctica diaria en busca de la resistencia mediada por el gen MCR-1

Ante esta realidad se expondrá los resultados a autoridades de salud, para tomar las medidas más aconsejables, como se está realizando en casi todos los continentes debido a la multirresistencia bacteriana frente a los antimicrobianos, siendo una alerta mundial de salud que afecta a todo ser humano.

Por lo mencionado anteriormente se considera importante identificar a las cepas de *E.coli* portadoras del gen MCR-1 debido al alto riesgo epidemiológico, para la población en general.

1.5. Viabilidad.

Esta investigación es viable debido al incentivo de investigar la situación actual en la que se encuentra el Hospital San Martín de Porres frente al problema de resistencia a uno de los antibióticos considerados de último recurso, a pesar de que no hubo ninguna ayuda financiera de institución alguna, los insumos y reactivos están disponibles en las importadoras comerciales de la ciudad de Cochabamba, los mismos fueron financiados por el propio investigador.

Presupuesto

- | | |
|--|---------|
| • Agar Mueller Hinton | 850 bs |
| • Tabletas de Pre difusión | 1000 bs |
| • Discos de colistin para antibiograma | 320 bs |
| • Sal deshidratada de EDTA Disodico | 50 bs |
| • Hisopos estériles | 160 bs |
| • Otros | 35 bs |

Así mismo se realizó la solicitud a la dirección de Hospital San Martín de Porres para la realización en el laboratorio de microbiología la identificación, del gen MCR-1 en *Escherichia coli* de la bacterioteca de cepas aislada durante el periodo del 2014 al 2017 en un tiempo aproximado de 6 meses, tiempo necesario para procesar las mismas.

2. CAPÍTULO: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

En el año 2015, el Gen *mcr-1*, que confiere resistencia a la colistina, fue descubierto en China y posteriormente identificado en otros países como Vietnam, Estados Unidos, Dinamarca, Alemania, Italia y España, que acarrea el riesgo de resistencia combinada colistina-carbapenemes.

En un estudio, realizado por Yang Wang (Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing, China), los autores introducen el tema afirmando que el gen *mcr-1* confiere resistencia transferible a la colistina. Las *Enterobacteriaceae mcr-1-positivas* (MCRPE) han atraído considerable la atención médica, mediática y política; sin embargo, hasta el momento los estudios no se han aproximado a su repercusión clínica. En el trabajo se describe la prevalencia de MCRPE en las infecciones y portadores humanos, la asociación clínica de la infección por *Escherichia coli mcr-1-positiva* (MCRPEC) y los factores de riesgo para los portadores de MCRPEC.

El estudio se llevó a cabo en dos hospitales de Zhejiang y Guangdong. Se realizó una evaluación transversal retrospectiva de la prevalencia de infección por MCRPE a partir de aislados de bacterias Gram negativas recogidas en los hospitales desde 2007 a 2015 (estudio de prevalencia). También se realizó un estudio retrospectivo de casos y controles de los factores de riesgo de infección y mortalidad después de la misma, usando todos los MCRPEC de aislados de infección y una muestra aleatoria de infecciones por *E. coli mcr-1-negativo* de una colección retrospectiva entre 2012 y 2015 (estudio de infección). También se realizó un estudio prospectivo de casos y controles para evaluar los factores de riesgo para portadores de MCRPEC en frotis rectales de enfermos hospitalizados con MCRPEC y *mcr-1* negativos, recogidos entre mayo y diciembre de 2015, en comparación con los aislados *mcr-1* negativos de obtenidos de hisopos rectales de enfermos hospitalizados

(estudio de colonización). Las cepas se analizaron para determinar la resistencia a los antibióticos, tipificación de plásmidos, y análisis de transferencia, y sus relaciones.

Los investigadores identificaron 21621 aislados no duplicados de *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter spp.* y *Pseudomonas aeruginosa* de 18698 enfermos hospitalizados y 2923 voluntarios sanos. De 17498 aislados asociados con la infección, mcr-1 se detectó en 76 (1%) de 5332 cepas de *E. coli*, 13 (<1%) de 348 *Klebsiella pneumoniae*, una (<1%) de 890 *Enterobacter cloacae* y una 1% de 162 *Enterobacter aerogenes*.

Para el estudio de la infección, se incluyeron 76 aislados de *E. coli* mcr-1 positivos y 508 aislados mcr-1-negativos. En general, la infección por MCRPEC se asoció con el sexo masculino (209 [41%] frente a 47 [63%], $p = 0.011$), inmunosupresión (30 [6%] frente a 11 [15%] $p = 0.011$) y el uso de antibióticos, particularmente los carbapenemes (45 [9%] frente a 18 [24%], $p = 0.002$) y fluoroquinolonas (95 [19%] frente a 23 [30%] $p = 0.017$), antes del ingreso al hospital.

Para el estudio de colonización, se seleccionaron 2923 frotis rectales de voluntarios sanos, de los cuales 19 fueron MCRPEC y 1200 frotis rectales de enfermos, de los cuales 35 fueron MCRPEC. El uso de antibióticos antes del ingreso hospitalario ($p < 0.0001$) y el hecho de vivir junto a una granja ($p = 0.03$, prueba univariable) se asociaron con los portadores de MCRPEC en 35 enfermos en comparación con 378 con colonización por *E. coli* mcr-1 negativo. Mcr-1 pudo ser transferido entre las bacterias a frecuencias altas (10^{-1} a 10^{-3}), y los tipos de plásmido y MCRPEC tipo MLSTs (multi-locus secuencia) fueron más variables en *Guangdong* que en *Zhejiang*.⁽⁵⁾

En un segundo estudio publicado, por *Jingjing Quan (Department of Infectious Diseases, Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, China)*, se recogieron aislados clínicos de *Escherichiacoli* y *Klebsiella pneumoniae* de enfermos con bacteriemia en 28 hospitales de China, luego se analizó la resistencia a la colistina por

microdilución en caldo y la presencia del gen *mcr-1* por amplificación de ADN (PCR).

Los aislados MCR-1 positivos se sometieron a genotipificación, pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos y análisis de datos clínicos. Se estableció la localización génica del MCR-1 con hibridación por Southern blot, y se analizaron los plásmidos que contenían MCR-1 con filtro de apareamiento, electroporación, y secuenciación del ADN.

El número total de aislados fue de 2066: 1495 de *E. coli* y 571 de *K. pneumoniae*. De los 1495 *E. coli* aislados, 20 (1%) fueron *mcr-1*-positivo, mientras que se detectó sólo MCR-1 (<1%) positivo entre los 571 *K. pneumoniae*. Todos los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* positivos para MCR-1 fueron resistentes a la colistina, con valores de CMI 4-32 ug/ml, excepto para un aislado de *E. coli* que tenía una CMI $\leq 0,06$ ug /ml. Todos los 21 *mcr-1* positivos fueron sensibles a la tigeciclina y 20 aislados (95%) fueron sensibles a los carbapenemes y a piperacilina y tazobactam combinados con inhibidores de las β -lactamasas. Un aislado de *E. coli*/MCR-1 también produjo la enzima NDM-5, que confiere resistencia a los antibióticos beta-lactámicos. Los aislados positivos para 21 MCR-1 fueron clonalmente diversos y portaban MCR-1 en dos tipos de plásmidos, un plásmido IncX4 de 33 kb y un plásmido Inc12 de 61 kb. La mortalidad a los 30 días de los enfermos con bacteriemias causadas por cepas positivas para MCR-1 fue cero.(6)

2.2. Bacilos gramnegativos entéricos (Enterobacteriaceae)

Las Enterobacteriaceae son un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales.

La familia comprende muchos géneros (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros más). Algunos microorganismos entéricos, por ejemplo, *Escherichia coli*, son parte de la microflora normal y en forma incidental producen enfermedad, en tanto que

otros, las salmonelas y las shigelas, por lo regular son patógenos para el ser humano. Las Enterobacteriaceae son anaerobios o aerobios facultativos, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. Las Enterobacteriaceae, los bacilos gramnegativos entéricos, las bacterias entéricas y bacterias coliformes son términos utilizados para este tipo de microorganismos. (7)

2.2.1. Clasificación

Las Enterobacteriaceae son el grupo más frecuente de bacilos gramnegativos que se cultivan en el laboratorio clínico y junto con los estafilococos y los estreptococos son las bacterias que más a menudo producen enfermedades. La taxonomía de las Enterobacteriaceae es compleja y rápidamente cambiante desde el advenimiento de técnicas que miden la distancia evolutiva, por ejemplo, la hibridación de ácido nucleico y la secuenciación de ácido nucleico. Según la base de datos informática de la taxonomía de la *National Library of Medicine* se han definido más de 50 géneros; sin embargo, las Enterobacteriaceae de importancia clínica comprenden 20 a 25 especies y otras se descubren con poca frecuencia.

La familia de las Enterobacteriaceae tiene las siguientes características. Son bacilos gramnegativos, ya sea móviles con flagelos, peritricos o no móviles; se multiplican en medios con peptona o extracto de carne sin que se añada cloruro de sodio u otros suplementos; se multiplican bien en agar de *MacConkey*; proliferan en medios aerobios y anaerobios (son anaerobios facultativos); fermentan en vez de oxidar glucosa, a menudo produciendo gas; catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen nitrato a nitrito; y tienen un contenido de DNA de Guanina + Citosina de 39 a 59%.. (7) En genética, el Porcentaje GC (contenido de guanina y citosina) es una característica del genoma de un organismo o de cualquier pedazo de ADN o ARN. El contenido

GC se utiliza en ocasiones para clasificar organismos en taxonomía. Por ejemplo, las *Actinobacteria* se caracterizan por ser “bacterias de GC alto”

2.2.2. Morfología e identificación

2.2.2.1. A. Microorganismos típicos

Las Enterobacteriaceae son bacilos gram negativos cortos. Se observa una morfología característica en la multiplicación en medios sólidos *in vitro*, pero las características morfológicas son muy variables en especímenes clínicos. Las cápsulas son de gran tamaño y regulares en *Klebsiella*, menos en *Enterobacter* e infrecuentes en las demás especies.

2.2.2.2. B. Cultivo

E. coli y la mayor parte de las otras bacterias entéricas forman colonias circulares, convexas y lisas con bordes distintivos. Las colonias de *Enterobacter* son similares pero un poco más mucoides. Las colonias de *Klebsiella* son grandes y muy mucoides y tienden a experimentar coalescencia con la incubación prolongada. Las salmonelas y las shigelas producen colonias similares a *E. coli* pero no fermentan lactosa. Algunas cepas de *E. coli* producen hemólisis en agar sangre.

2.2.2.3. C. Características de desarrollo

Se utilizan los patrones de fermentación de hidratos de carbono y la actividad de las descarboxilasas de aminoácidos y otras enzimas para la diferenciación bioquímica. Algunas pruebas, por ejemplo, la producción de indol a partir de triptófano, suelen utilizarse en sistemas de identificación rápida, en tanto que otras, por ejemplo, la reacción de Voges-Proskauer (producción de acetilmetilcarbinol a partir de dextrosas) se utilizan con menos frecuencia.

El cultivo en medios “diferenciales” que contienen colorantes especiales e hidratos de carbono (p. ej., eosina-azul de metileno [EMB, *eosin-methylene-blue*], de Mac-Conkey o medio de desoxicolato) distingue a las colonias que

fermentan lactosa (de color) de las que no fermentan lactosa (no pigmentadas) y permite la identificación presuntiva rápida de las bacterias entéricas. (7)

Se han ideado muchos medios complejos para tratar de identificar las bacterias entéricas. Uno de estos medios es el agar en hierro con azúcar triple (TSI, *triple sugar iron*), que a menudo se utiliza para ayudar a diferenciar las salmonelas y las shigelas de otros bacilos gramnegativos entéricos en los coprocultivos. El medio contiene glucosa al 0.1%, sacarosa al 1%, lactosa al 1%, sulfato ferroso (para la detección de la producción de H₂S), extractos de tejido (sustrato de crecimiento con proteínas) y un indicador de pH (rojo de fenol). Se vierte en un tubo de ensayo para producir una inclinación con un extremo profundo y es inoculado encajando la proliferación bacteriana en el extremo.

Si sólo se fermenta glucosa, la inclinación y el extremo al principio adoptan un color amarillo por la pequeña cantidad de ácido que se produce; a medida que los productos de la fermentación son oxidados después a CO₂ y H₂O y liberados de la inclinación y conforme continúa la descarboxilación oxidativa de las proteínas con la formación de aminas, la inclinación se vuelve alcalina (roja). Si se fermenta lactosa o sacarosa, se produce tanto ácido que la inclinación y el extremo se mantienen amarillos (ácidos).

Las salmonelas y las shigelas suelen producir una inclinación alcalina y un extremo ácido. Aunque *Proteus*, *Providencia* y *Morganella* producen una inclinación alcalina y un extremo ácido, se pueden identificar por su formación rápida de color rojo en el medio de urea agar base (Christensen). Los microorganismos que producen ácido en la inclinación y ácido y gas (burbujas) en el extremo son otras bacterias entéricas. (7)

2.2.3. Escherichia Coli

E. coli suele producir pruebas con positividad para indol, lisina descarboxilasa y fermentación de manitol y produce gas a partir de glucosa. Una cepa de la orina se puede identificar rápidamente como *E. coli* por su hemólisis en agar

sangre, su morfología de colonia característica con un lustre “iridiscente” en medios diferenciadores como agar EMB y una prueba de indol de mancha positiva. Más de 90% de las cepas de *E. coli* tiene positividad para glucuronidasa β si se utiliza el sustrato 4-metilumbeliferil- β -glucurónido (MUG). Las cepas de otros lugares anatómicos además de la orina, con propiedades características (pruebas de oxidasa por encima de la negatividad adicional) a menudo se pueden confirmar como *E. coli* con una prueba de MUG positiva. (7)

2.2.3.1. Patogenia y manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de las infecciones por *E. coli* y las otras bacterias entéricas dependen del lugar de la infección y no se pueden distinguir por los síntomas o los signos de procesos causados por otras bacterias.

2.2.3.2. Infección del sistema urinario.

E. coli es la causa más frecuente de infección de las vías urinarias y contribuye a casi 90% de las primeras infecciones urinarias en mujeres jóvenes. Los síntomas y signos consisten en polaquiuria, disuria, hematuria y piuria. El dolor en la fosa renal se relaciona con infección urinaria alta. Ninguno de estos síntomas o signos es específico de la infección por *E. coli*. La infección del sistema urinario puede ocasionar bacteriemia con signos clínicos de septicemia.

La mayor parte de las infecciones urinarias que afectan a la vejiga o al riñón en un hospedador por lo demás sano son causadas por un pequeño número de tipos de antígeno o que han elaborado específicamente factores de virulencia que facilitan la colonización y las infecciones clínicas subsiguientes. Tales microorganismos se designan como *E. coli* uropatógena. Por lo general estos microorganismos producen hemolisina, que es citotóxica y facilita la invasión de los tejidos. Las cepas que producen pielonefritis expresan el antígeno K y elaboran fimbrias P que se unen al antígeno del grupo sanguíneo P. (7)

2.2.3.3. Enfermedades diarreicas relacionadas con *E. coli*.

E. coli que produce diarrea es muy frecuente en todo el mundo. Estos microorganismos *E. coli* se clasifican según las características de sus propiedades de virulencia y cada grupo causa enfermedad por diferentes mecanismos. Las propiedades de adherencia a las células epiteliales del intestino delgado o grueso son codificadas por genes presentes en los plásmidos. Asimismo, las toxinas a menudo son mediadas por plásmido o fago.

2.2.3.3.1. *E. coli* enteropatógena (EPEC)

es una causa importante de diarrea en los lactantes, sobre todo en los países en vías de desarrollo.

EPEC se relacionaba con brotes epidémicos de diarrea en guarderías de países desarrollados. EPEC se adhiere a las células de la mucosa del intestino delgado. Los factores mediados por cromosomas favorecen la adherencia. Hay una pérdida de las microvellosidades (aplanamiento), formación de pedestales de actina filamentosa o estructuras similares a copas y, en ocasiones, entrada de EPEC en las células de la mucosa.

Se pueden ver lesiones características en las microfotografías electrónicas de las lesiones de biopsia del intestino delgado. El resultado de la infección por EPEC es diarrea líquida, que suele ceder en forma espontánea pero puede ser crónica. La diarrea por EPEC se relaciona con múltiples serotipos específicos de *E. coli*. Se identifican las cepas por el antígeno O y a veces por la tipificación del antígeno H. Se puede realizar un modelo de infección de dos etapas en que se utilizan células HEp-2. Las pruebas para identificar EPEC se realizan en laboratorios de referencia.

La duración de la diarrea por EPEC puede abreviarse y la diarrea crónica curarse con tratamiento con antibióticos. (7)

2.2.3.3.2. E. coli enterotoxígena (ETEC)

Es una causa frecuente de “diarrea del viajero” y es una causa muy importante de diarrea en los lactantes de países en vías de desarrollo. Los factores de colonización de ETEC específicos para los seres humanos favorecen la adherencia de ETEC a las células epiteliales del intestino delgado.

Algunas cepas de ETEC producen una **exotoxina termolábil** (LT) (PM 80000) que está sujeta a control genético de un plásmido. Su subunidad B se adhiere al gangliósido GM1 en el borde en cepillo de las células epiteliales del intestino delgado y facilita la entrada de la subunidad A (PM 26000) en la célula, donde la última activa a la adenilciclase. Esto incrementa notablemente la concentración local del monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), lo cual produce una secreción intensa y prolongada de agua y cloruros e inhibe la reabsorción de sodio.

La luz intestinal se distiende con líquido y sobreviene hipermotilidad y diarrea, que persiste por varios días. La exotoxina termolábil es antigénica y presenta reacción cruzada con la enterotoxina de *Vibrio cholerae*. LT estimula la producción de anticuerpos neutralizantes en el suero (y tal vez en la superficie intestinal) de personas previamente infectadas con *E. coli* enterotoxígena. (7) Las personas que radican en zonas donde estos microorganismos son muy frecuentes (p. ej., en algunos países en vías de desarrollo) tienen posibilidades de tener anticuerpos y de ser menos propensas a desarrollar diarrea al volverse a exponer a *E. coli* productora de LT.

Los análisis para la detección de LT son los siguientes: 1) acumulación de líquido en el intestino de animales de laboratorio; 2) cambios citológicos característicos en las células de ovario de cobayo chino en cultivo u otros linajes celulares; 3) estimulación de la producción de esteroides en las células de tumores suprarrenales cultivadas, y 4) fijación y análisis inmunológicos con antisueros normalizados a LT. Estos análisis se realizan sólo en laboratorios especializados.

Algunas cepas de ETEC producen la **enterotoxina termoestable** STa (PM 1 500 a 4 000), que está bajo el control genético de un grupo heterogéneo de plásmidos. STa activa a la guanilciclase en las células epiteliales entéricas y estimula la secreción de líquido. Muchas cepas positivas para STa también producen LT.

Las cepas con las dos toxinas causan diarrea más grave. Los plásmidos portadores de los genes para las enterotoxinas (LT, ST) también pueden portar genes para los **factores de colonización** que facilitan la adherencia de las cepas de *E. coli* en el epitelio intestinal. Los factores de colonización reconocidos ocurren con especial frecuencia en algunos serotipos. Determinados serotipos de ETEC se presentan en todo el mundo; otros tienen una distribución limitada reconocida. Es posible que casi cualquier *E. coli* pueda adquirir un plásmido que codifica las enterotoxinas. No hay ninguna relación definida de ETEC con cepas de EPEC que produzcan diarrea en los niños. Asimismo, no hay ninguna relación entre las cepas enterotoxígenas y las que pueden invadir células del epitelio intestinal. (7)

Es muy recomendable la atención en la selección y el consumo de alimentos potencialmente contaminados con ETEC para tratar de evitar la diarrea del viajero. La profilaxis antimicrobiana puede ser eficaz pero es posible que cause incremento de la resistencia de las bacterias a los antibióticos y no siempre debe recomendarse. Una vez que sobreviene diarrea, el tratamiento con antibióticos abrevia de manera eficaz su duración.

2.2.3.3.3. E. coli productora de toxina Shiga (STEC)

Se denomina así por las toxinas citotóxicas que produce. Hay por lo menos dos formas antigénicas de la toxina designadas como toxina similar a Shiga 1 y toxina similar a Shiga 2. STEC se ha relacionado con colitis hemorrágica, una forma grave de diarrea, y con el síndrome hemolítico urémico, una enfermedad que desencadena insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia. (7)

Las toxinas similares a Shiga tienen muchas propiedades que son parecidas a la toxina Shiga producida por algunas cepas de *Shigella dysenteriae* de tipo 1; sin embargo, las dos toxinas son diferentes desde el punto de vista antigénico y genético. De los serotipos de *E. coli* que producen toxina Shiga, O157:H7 es el más frecuente y es el que se puede identificar en muestras clínicas. STEC O157:H7 no utiliza sorbitol, a diferencia de casi todos los demás *E. coli* y tiene negatividad en sorbitol. Y tiene negatividad en agar de MacConkey con sorbitol (se utiliza sorbitol en vez de lactosa). Las cepas O157:H7 también son negativas en las pruebas MUG (véase antes). Muchos de los serotipos no-O157 pueden ser positivos para sorbitol cuando se multiplican en cultivo.

Se utilizan antisueros específicos para identificar las cepas O157:H7. Los análisis para la toxina Shiga que utilizan inmunoanálisis enzimáticos disponibles en el mercado se realizan en muchos laboratorios. Otros métodos sensibles incluyen pruebas de citotoxina en cultivo celular usando células Vero y la reacción en cadena de la polimerasa para la detección directa de los genes de toxina a partir de muestras fecales. Muchos casos de colitis hemorrágica y sus complicaciones relacionadas pueden evitarse mediante la cocción minuciosa de la carne molida.

2.2.3.3.4. E. coli enteroinvasiva (EIEC)

Produce una enfermedad muy similar a la shigelosis. La enfermedad ocurre más a menudo en los niños en países en vías de desarrollo y en personas que viajan a estos países. Al igual que *Shigella*, las cepas de EIEC no fermentan lactosa o la fermentan en una etapa tardía y son no móviles. EIEC produce enfermedad al invadir las células epiteliales de la mucosa intestinal. (7)

2.2.3.3.5. E. coli enteroagregativa (EAEC)

Produce una diarrea aguda y crónica (mayor de 14 días de duración) en personas de países en vías de desarrollo. Estos microorganismos son también la causa de enfermedades transmitidas en los alimentos en los países

industrializados. Se caracterizan por sus pautas específicas de adherencia a las células humanas. EAEC produce toxina similar a ST y una hemolisina.

2.2.3.4. Septicemia.

Cuando las defensas normales del hospedador son inadecuadas, *E. coli* puede llegar al torrente sanguíneo y producir septicemia. Los recién nacidos son muy susceptibles a septicemia con *E. coli* porque carecen de anticuerpos IgM. La septicemia puede presentarse como consecuencia de la infección del sistema urinario.

2.2.3.5. Meningitis.

E. coli y estreptococos del grupo B son las principales causas de meningitis en los lactantes. Casi 75% de las *E. coli* de casos de meningitis tienen el antígeno K1. Este antígeno reacciona en forma cruzada con el polisacárido capsular del grupo B de *N. meningitidis*. (7)

La mayor parte de las infecciones (salvo las meningitis y la gastroenteritis neonatales) son endógenas, de forma que el *E. coli* de la propia flora microbiana normal del paciente consigue ocasionar infección cuando sus defensas se alteran (por ejemplo a través de un traumatismo o supresión de la inmunidad. (8)

2.3. Evolución de los antimicrobianos

La era antibiótica, emprendida en 1940, revolucionó para siempre el campo de las enfermedades infecciosas dejando atrás la etapa pre-antibiótica, iniciada hace más de 2500 años en China. Desafortunadamente, la evolución en la producción de antimicrobianos se ha acompañado de un incremento marcado de la resistencia de bacterias, hongos, parásitos, incluso virus, a diferentes familias de estos. (9)

Por tal razón, la OMS ha designado la resistencia antimicrobiana (RAM) como una de los tres problemas más importantes que enfrenta la salud humana en este siglo al constituir una de las mayores amenazas para la salud mundial.

La situación se recrudece ante el mínimo incentivo de la industria farmacéutica de producir nuevos antimicrobianos en la última década. Lo cual está motivado por la poca rentabilidad de este grupo de fármacos en comparación con otros usados en terapia de enfermedades crónicas como la diabetes, la hipertensión arterial y las infecciones crónicas, donde se introducen fármacos muy caros. Esto no cambiará hasta que se asocien mejor la salud pública con los incentivos comerciales. .(9)

Una de las pautas recomendadas por la OMS ha sido mejorar las iniciativas para favorecer la investigación para el desarrollo de nuevos fármacos y la mejora de los existentes. Entre ellas, la publicación de la primera lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, en la que enmarcan 12 familias de bacterias consideradas como las más peligrosas para la salud humana y sobre las cuales recae la necesidad de promover la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos:

Prioridad 1: crítica. *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenémicos, Enterobacteriaceae resistentes a los carbapenémicos y productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Prioridad 2: elevada. Enterococcus faecium resistente a la vancomicina, Staphylococcus aureus, resistente a la meticilina con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina, Helicobacter pylori resistente a la claritromicina, Campylobacter spp. resistente a las fluoroquinolonas, Salmonella resistentes a las fluoroquinolonas y Neisseria gonorrhoeae resistente a la cefalosporina y resistente a las fluoroquinolonas.

Prioridad 3: media. Streptococcus pneumoniae, no sensible a la penicilina, Haemophilus influenza, resistente a la ampicilina y Shigella spp, resistente a las fluoroquinolonas. .(9)

Debido a la alarmante y rápida propagación a nivel mundial de estas bacterias multiresistentes y su repercusión en la prolongación de estancias hospitalarias, incremento de los costos médicos, aumento de la mortalidad, así como su

repercusión en la medicina veterinaria, seguridad alimentaria y el medio ambiente se requieren esfuerzos y acciones locales, nacionales y mundiales para su contención.

Por tal motivo, en mayo de 2015 la 68ª Asamblea Mundial de la Salud adoptó el Plan de Acción Mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos, que materializa el consenso mundial acerca del grave peligro que entraña este fenómeno para la salud humana.

El compromiso y la participación de los gobiernos es clave para el desarrollo y cumplimiento de este plan que incluye cinco acciones principales: concienciar y sensibilizar a la población acerca de la resistencia a los antimicrobianos; mejorar la vigilancia y la investigación; reducir la propagación de las infecciones mediante medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención de las infecciones; optimizar el uso de antibióticos en la atención de la salud humana y animal y aumentar la innovación y la inversión.

Sin dejar de reconocer los experimentos de Paul Ehrlich que condujeron al descubrimiento de las arfenaminas, primer triunfo importante de la quimioterapia en el siglo XX, la era moderna de la terapéutica antimicrobiana se inició en 1934 con la descripción por Gerhard Domagk de la efectividad de la primera sulfonamida en el tratamiento de las infecciones experimentales por estreptococos. Sin embargo, la llamada "Edad de Oro" de los antibióticos comienza en 1941 con la producción de la penicilina a gran escala y posteriormente el desarrollo de nuevos antibióticos como la estreptomina (1944), cloranfenicol (1947) y la aureomicina (1948) .(9)

En la década del 50 aparece la eritromicina y la vancomicina. En la del 60, gentamicina, ampicilina, cefalotina y amikacina. Así, sucesivamente, continúa la evolución de la producción de nuevos antibióticos, luego del año 2000, se registra la aparición de quinolonas de espectro ampliado.

Alexander Fleming, desde que recibió el Premio Nobel de Medicina en el año 1945, advirtió sobre el fenómeno de la resistencia cuando expresó "Llegará un momento en que la penicilina podrá ser comprada por cualquiera en los

negocios. Existe el peligro de que un hombre ignorante pueda fácilmente aplicarse una dosis insuficiente de antibiótico y, al exponer a los microbios a una cantidad no letal del medicamento, los haga resistentes".

Lamentablemente, el ser humano no concientizó esta alerta y muy pronto aparecieron los primeros aislamientos resistentes como parte de la evolución natural de las bacterias en su adaptación al medio ambiente. Este fenómeno se aceleró con el tiempo por el uso inadecuado de antibióticos en diferentes ecosistemas, favorecido por la falta de normas y fiscalización del uso de estos; así como, tratamientos deficientes, ventas sin receta médica o a través de Internet, comercialización de antimicrobianos falsificados o de mala calidad y la falta de control de residuos de antimicrobianos en plantas de producción.
. (9)

En la década del 50, se descubre la capacidad de los antibióticos de contribuir al crecimiento de los animales de interés económico (ganadería, avicultura) lo que constituyó el inicio histórico del uso como promotores del crecimiento. Se reporta que en EE. UU., el uso de antibióticos en los animales para su alimentación representa el 80 % de todos los antibióticos consumidos, donde el 74 % de estos se administra con el alimento, y no para tratar o prevenir la infección. Por otra parte, el 62 % de los antibióticos usados en animales está representado por fármacos de importancia terapéutica en el humano. En esta población la indicación de la antibioticoterapia, duración de estas y la elección del antibiótico, es incorrecto entre un 30 % a 50 % de los casos.

En los años 60, la aparición del *Staphylococcus* resistente a la meticilina y *Pseudomonas* resistentes a gentamicina confirman la gravedad de la resistencia antimicrobiana. Este fenómeno se fue haciendo más dramático con el incremento de la resistencia a la ampicilina en los 70; la aparición de *Enterococcus* resistente a la vancomicina en los 90 y la extensión de la resistencia a diferentes familias de antimicrobianos acorde con su velocidad de uso y cuantía en la práctica médica la que ya involucra, incluso, a antibióticos de última generación. Cabe resaltar la resistencia emergente

transferible a la linezolidina mediada por plásmidos en *Staphylococcus sciuri* y *Enterococcus faecium*.

Lo anteriormente expuesto es una razón suficiente para abogar por el uso racional de antimicrobianos en la actualidad lo que atenúa la velocidad de incremento o aparición de nuevas resistencias. La necesidad se hace más imperiosa desde la falta de desarrollo de nuevos fármacos por parte de la industria farmacéutica como se había planteado anteriormente. Aunque hay algunos antibióticos nuevos en fase de desarrollo, no serán la solución para combatir las formas más peligrosas de algunas bacterias resistentes por lo que se habla hoy en día de una "crisis antibiótica" la que se considera como el preludio de una era "posantibiótica".

Los antibióticos se pueden clasificar, en dependencia de los efectos sobre las bacterias, en bacteriostáticos si inhiben el crecimiento bacteriano (efecto reversible) o bactericidas los que producen muerte o lisis bacteriana (bacteriolítico).

Cuando la bacteria permanece refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de los antibióticos ya sea de forma natural o adquirida se dice que es resistente.

2.4. Tipos de resistencia

2.4.1. Natural o intrínseca.

Estable, transmisión vertical (células hijas).

Todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico.(9)

2.4.2. Adquirida

2.4.2.1. Vías de adquisición de la resistencia:

- **Mutaciones en el cromosoma** es espontáneas, estables y de transmisión vertical de generación en generación.

- **Intercambio de genes de resistencia por transferencia horizontal** a través de diferentes procesos: conjugación (vía plásmidos u otro material genético movible como integrones y transposones), traducción, transformación. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos.

2.5. Mecanismos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos:

Si bien los antibióticos destruyen o inhiben las cepas sensibles, a su vez permiten paradójicamente la selección de bacterias resistentes capaces de sobrevivir, multiplicarse y diseminarse. Las cepas resistentes se hacen predominantes por la presión selectiva de los antibióticos que hacen desaparecer las bacterias sensibles, no estando implicados solamente los antibióticos utilizados en medicina, sino también en veterinaria. Por tanto queda una población predominantemente resistente que después es capaz de transmitir dicha resistencia a poblaciones sensibles facilitando así la diseminación de este fenómeno. .(9)

Entre las principales características no auspiciosas observadas en la atención médica actual, se destacan la solicitud exagerada de métodos auxiliares de diagnóstico y la indicación inapropiada y no justificada de medicamentos. Estos problemas crecieron aceleradamente en las últimas décadas relacionados, entre otras causas, con los perjudiciales cambios producidos en el ejercicio de nuestra profesión. Varios factores externos influyeron en los cambios observados; entre ellos se destacan el apabullante desarrollo tecnológico y la mercantilización que invadió el accionar de la profesión médica.

En la era tecnológica los médicos estamos cada vez más dependientes de la técnica, generando en la gente la falsa ilusión de que la medicina solucionará todos sus problemas. El inadecuado uso de nuevas técnicas produjo un progresivo "alejamiento" entre el médico y su paciente sumado a un aumento

notable de los costos en el cuidado de la salud, es decir, nos ha llevado a una medicina más deshumanizada y progresivamente menos sustentable. (10)

La sensibilidad antimicrobiana de las bacterias que ocasionan infecciones incluye un proceso de desarrollo dinámico, se va modificando con el decurso del tiempo y el uso frecuente de antibióticos que en su gran mayoría se utilizan indiscriminadamente, ya sea por prescripción médica o por automedicación. La resistencia bacteriana de la *Escherichia coli* a los antibióticos se relaciona con el consumo de éstos, favorece la creación, adaptación y diseminación de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos cuya prevalencia creciente hace imprescindible orientar racionalmente el tratamiento empírico de la infección urinaria en el medio extrahospitalario, lo que constituye una práctica habitual y recomendada.

La resistencia de los patógenos a los agentes antimicrobianos, es un problema de extrema importancia para seleccionar el antibiótico idóneo de primera línea, mostrándose variaciones y requiere constante actualización, vigilancia microbiológica de la sensibilidad antibiótica (11)

2.5.1. Mecanismos genéticos

Para entender porque los antibióticos deben usarse con prudencia, es necesario que el medico entienda como se adaptan las bacterias a su ambiente. Es posible que se desarrolle una mutación de punto en su DNA cuando se replican, la cual ocurre en el ambiente natural pero no ofrece ventajas para la supervivencia a menos que las bacterias se coloquen bajo presiones selectivas. En el caso de una mutación que vuelve resistente a un antibiótico específico, la exposición al mismo le permite al clon crecer, mientras que el resto muere sin poder competir por nutrientes. Por tanto, la cepa resistente se vuelve la flora bacteriana dominante. Además de las mutaciones puntuales, las bacterias pueden usar tres mecanismos principales para transferir material genético:

1. Conjugación. Con frecuencia las bacterias contienen estructuras de DNA circulares y de doble hélice llamadas plásmidos, las cuales yacen fuera del genoma bacteriano con carga de genes de resistencia (“R”) que, a través de un mecanismo llamado “conjugación” , pueden transferirse de una bacteria a otra. El plásmido se codifica para la formación de una pilosidad en la superficie externa de la bacteria donadora, que se pega a una segunda y sirve como puente para la transferencia del DNA del donador a la bacteria receptora para volverla resistente.

2. Transducción. Los bacteriófagos son segmentos de DNA cubiertos de proteínas que se pegan a la pared bacteriana e inyectan DNA en un proceso llamado “transducción” . Estas partículas infecciosas pueden transferir genes de resistencia a varias bacterias.

3. Transformación. La bacteria donadora también puede liberar segmentos lineales de DNA cromosómico, que es absorbido más adelante por la bacteria receptora e incorporado al genoma del receptor. A este proceso se le denomina “transformación” , y al DNA desnudo capaz de incorporarse en el genoma de la bacteria receptora se le llama transposon. La transformación natural ocurre con mayor frecuencia en las especies *Streptococcus*, *Haemophilus* y *Neisseria*. Los transposones pueden transferir varios genes de resistencia antibiótica en un solo evento y se ha demostrado que son responsables de los altos niveles de resistencia a la vancomicina en los Enterococos. (12)

2.5.2. Mecanismos bioquímicos

Los mecanismos mediante los cuales las bacterias resisten los antibióticos se clasifican en tres grupos principales:

- Degradación o modificación del antibiótico
- Reducción de la concentración del antibiótico bacteriano
- Modificación del blanco del antibiótico.

2.5.2.1. Degradación o modificación del antibiótico

β -lactamasas. Muchas bacterias sintetizan una o más enzimas llamadas β -lactamasas, que desactivan los antibióticos rompiendo el enlace amida en el anillo β -lactámicos. La actividad de transferencia ocurre, sobre todo, mediante plásmidos y transposones. Existen varias clases de β -lactamasas, algunas tienen preferencia por romper los enlaces de las penicilinas; otras, por destruir cefalosporinas específicas o la carbenicilina. Las de espectro extendido (ESBL) destruyen fácilmente casi todas las cefalosporinas. Otra clase es resistente al clavulanato, un agente que se agrega a numerosos antibióticos para inhibir la actividad de esta. Algunas bacterias son capaces de producir β -lactamasas llamadas carbapenemasas, que desactivan al Imipenem y al meropenem. Los bacilos gramnegativos producen un espectro más amplio de β -lactamasas que los microorganismos grampositivos y, por tanto, las infecciones surgen con más frecuencia en pacientes tratados por periodos prolongados con antibióticos de amplio espectro. En algunos casos, la actividad de la β -Lactamasa es baja antes de que la bacteria se exponga a los antibióticos; sin embargo, después de la exposición, se induce su actividad. *Enterobacter* es un excelente ejemplo, en una prueba inicial, esta bacteria gramnegativa parece sensible a las cefalosporinas; después del tratamiento con estas, la actividad de la β -lactamasa aumenta, se desarrolla resistencia y la infección del paciente reincide. Por esta razón, no son recomendables las cefalosporinas de tercera generación para las infecciones graves con *Enterobacter*.

Otras modificaciones enzimáticas de los antibióticos

La Eritromicina se desactiva con facilidad mediante una esterasa que hidroliza el anillo de lactona del antibiótico, misma que ha sido identificada en *Escherichia coli*. Se han descubierto otras enzimas desactivantes de Eritromicina mediadas por plásmidos en las especies de *Streptococcus* y *S. aureus*. El cloranfenicol se desactiva por medio de la cloranfenicol

acetiltransferasa, aislada de bacterias grampositivas y gram negativas; los aminoglucosidos mediante las acetiltransferasas; tambien las bacterias por medio de la fosforilacion y la adenilacion. Estas enzimas de resistencia se encuentran en muchas cepas gram negativas y se detectan en mayor medida en *Enterococos*, *S. aureus* y *S. epidermis*. (12)

2.5.2.2. Reducción de la concentración de antibiótico bacteriano

Interferencia con la entrada de antibiótico

Para que un antibiótico funcione, debe tener la capacidad de penetrar la bacteria y llegar a su blanco bioquímico. Las bacterias gram negativas contienen una capa externa formada por lípidos que impide la penetración de reactivos hidrofílicos (como casi todos los antibióticos). El paso de antibióticos hidrofílicos se facilita con la presencia de porinas (pequeños canales en las paredes celulares de las bacterias gram negativas que permiten el paso de moléculas cargadas). Las mutaciones que llevan a la pérdida de porinas pueden reducir la penetración de antibióticos y llevar a la resistencia antibiótica.

Producción de las bombas de eflujo

Se han descubierto transposones que decodifican para una bomba dependiente de energía que pueden bombear activamente tetraciclina fuera de las bacterias. Se ha observado un eflujo activo de antibióticos en muchas bacterias entéricas gramnegativas, este mecanismo se usa para resistir el tratamiento antibiótico con tetraciclina, macrólidos y fluoroquinolona. *S. aureus*, *S. epidermis*, *S. pyogenes*, estreptococos grupo B y *S. pneumoniae* también pueden utilizar bombas de eflujo dependientes de energía, para resistir los antibióticos.

2.5.2.3. Modificación del blanco del antibiótico

Alteraciones de los precursores de la pared celular

Son la base para el VRE. La unión de vancomicina y teicoplanina requiere que la d-alanina-d-alanina este al final de los precursores de peptidoglucano de la

pared celular de las bacterias grampositivas. Las cepas resistentes de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* contienen el plásmido vanA, que codifica una proteína que sintetiza d-alanina-dlactato en lugar de d-alanina-d-alanina al final del precursor de peptidoglucano. La pérdida de la d-alanina terminal reduce marcadamente la unión de vancomicina y teicoplanina, lo que permite que la bacteria mutante sobreviva y crezca en presencia de estos antibióticos. (12)

Cambios en las enzimas blancas

Las penicilinas y las cefalosporinas se enlazan a proteínas específicas llamadas proteínas de unión de penicilina (PBP) en la pared celular bacteriana. *S. pneumoniae* resistente a la penicilina muestra cantidades reducidas de PBP o PBP que unen la penicilina con menor afinidad, o ambas. La unión menor de penicilina reduce la capacidad del antibiótico para matar las bacterias blanco. La base para la resistencia antibiótica en el MRSA es producto de PBP de baja afinidad codificados por el gen *mecA*. Las mutaciones en las enzimas blanco dihidropteroato sintetasa y dihidrofolato reductasa provocan resistencia a la sulfonamida y al trimetoprim, respectivamente. Las mutaciones simples de aminoácidos que alteran la función de la DNA girasa puede tener como resultado la resistencia a las fluoroquinolonas.

Alteraciones en el sitio de unión ribosómica

Las tetraciclinas, los macrólidos, las lincosamidas y los aminoglicosidos actúan uniéndose a los ribosomas bacterianos e interrumpiendo su función. Cierta número de genes de resistencia codifican enzimas que desmetilan los residuos de adenina en el RNA ribosómico bacteriano, inhibiendo la unión antibiótica al ribosoma. La resistencia ribosómica a la gentamicina, la tobramicina y la amikacina es menos común debido a que estos aminoglicosidos tienen muchos sitios de unión en el ribosoma bacteriano y requieren varias mutaciones bacterianas antes de que se bloquee su unión. (12)

2.6. Mecanismos de resistencia emergentes

La variedad alarmante de patógenos multiresistentes plantea un problema urgente para la salud mundial. Entre las mayores preocupaciones se citan:

2.6.1. Resistencia a β -lactámicos

Los β -lactámicos constituyen los antibióticos más ampliamente usados correspondiendo al 50% de todas las recetas médicas antibióticas en todo el mundo. Sin embargo, las bacterias han desarrollado disímiles mecanismos de resistencia para vencer hasta los más modernos fármacos de esta familia.

La producción de β -lactamasas ha constituido desde la década de los 80 uno de los mecanismos de resistencia más importantes en bacilos gramnegativos para eliminar la eficacia de los β -lactámicos.

Las BLEE, principalmente detectadas en Enterobacterias, hidrolizan y causan resistencia o sensibilidad disminuida a penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam), pero no a cefamicinas (cefoxitina) ni carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem). Las de mayor diseminación son la SHV, TEM y la CTX-M. Esta última es la de superior impacto epidemiológico tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad. .(9)

Después del surgimiento de las BLEE continuaron emergiendo nuevas enzimas capaces de hidrolizar un espectro más amplio de β -lactámicos entre ellas, las carbapenemasas. Son enzimas producidas por bacterias gramnegativas, mediadas por plásmidos asociadas muchas veces a clones hiper-epidémicos por lo que experimentan una gran diseminación mundial. Se relacionan con la asistencia sanitaria con tasas de mortalidad del 40 % al 80 %. Las carbapenemasas tipo KPC y NDM predominantemente en enterobacterias son las de mayor impacto epidemiológico. Otras enzimas clínicamente importantes incluyen las oxacilinasas Oxa 23, 24, 51, 58, 143, Oxa 48, imipenemasa-1 y la VIM (Verona integrón metalo- β -lactamasa).

La mayor repercusión clínica terapéutica de los patógenos productores de carbapenemasas está dada por su resistencia a todos los fármacos β -lactámicos, aunque las bacterias productoras de NDM-1 pueden conservar la susceptibilidad al aztreonam.

Por otra parte, estas bacterias pueden compartir otros mecanismos de resistencia mediados por plásmidos comprometiendo la eficacia clínica de varias familias de antibióticos. Esto deja muy pocas opciones terapéuticas como la colistina, la tigeciclina y los aminoglucósidos. En la actualidad se comercializan β -lactámicos con inhibidores de carbapenemasas como ceftazidima-avibactam y ceftolozan-tazobactam pero su utilidad está limitada en los países de bajos y medianos ingresos por su elevado costo. Por otro lado ya se reporta resistencia a la ceftazidima-avibactam entre las bacterias productoras de KPC. .(9)

2.6.2. Resistencia a quinolonas

Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos sintéticos, entre las que se encuentran el ácido nalidíxico y las quinolonas fluoradas, como norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina cuyo espectro de actividad se centra en las bacterias gramnegativas. La resistencia a las quinolonas está relacionada con su introducción con una amplia diseminación desde hace 30 años y actualmente es epidémica.

Hasta 1998 todos los mecanismos de resistencia a quinolonas eran cromosómicos, en este año, se documenta la resistencia mediada por el plásmido *qnrA*, en aislamientos clínicos en *K. pneumoniae*, en los Estados Unidos. Los genes *qnr* codifican para las proteínas Qnr, que enmascaran el sitio diana de acción de las fluoroquinolonas.

Hasta el momento se reconocen casi cien variantes de proteínas Qnr distribuidas en seis grupos denominados QnrA, QnrB, QnrC, QnrD, QnrS y QnrVc. La importancia clínica de este mecanismo se explica por su capacidad de complementar la resistencia cromosómica a quinolonas conferida por

mutaciones en las topoisomerasas, disminución en la expresión de porinas o la sobreexpresión de bombas de eflujo. Adicionalmente, facilitaría la selección de mutaciones cromosómicas a concentraciones de quinolonas, que de otro modo resultarían letales en ausencia de dicho gen.

Existen otros determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas como los genes que median las bombas de expulsión activa QepA y OqxAB y la variante de la aminoglucósido-acetiltransferasa AAC(6')-Ib-cr, capaz de acetilar a ciprofloxacina y norfloxacino además de amikacina, kanamicina y tobramicina. Aunque la resistencia a quinolonas mediada por genes plasmídicos es de bajo nivel, se ha observado (tanto *in vitro* como *in vivo*) que facilitan la selección de mecanismos adicionales de resistencia, que contribuirán a un mayor nivel de resistencia.

En los últimos años existe un aumento de la resistencia a las quinolonas en aislados productores de BLEE, que portan los genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB* o *qnrS*), *qepA* o *aac (6')-Ib-cr*, que confieren resistencia de bajo grado a estos antibióticos. Estos genes se localizan en plásmidos y se describen en distintas especies de enterobacterias. La OMS ha hecho un llamado, recientemente, para evitar el uso de las fluoroquinolonas a escala mundial para rescatar su eficacia clínica. .(9)

2.6.3. Resistencia a polimixinas

La más reciente preocupación en términos de resistencia es la relacionada a la colistina en bacilos gran negativos que ya se ha reportado en diferentes países de América Latina, Estados Unidos, Corea del Sur, Italia, Grecia, Arabia Saudita, entre otros países.

En la década del 90, la colistina resurge como una opción de tratamiento de última línea para los patógenos gramnegativos multiresistentes, incluyendo a carbapenémicos, tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* responsables de infecciones asociadas a la atención de salud con alta morbilidad y mortalidad. Hasta hace pocos años

atrás, la resistencia a la colistina obedecía, principalmente, a mutaciones en los genes cromosómicos causantes de modificaciones en el lipopolisacárido de la pared bacteriana, el sitio de acción de este antibiótico. El descubrimiento del gen MCR-1 mediado por plásmidos, en el 2015 en China, constituye una emergencia en la actualidad al ser la primera evidencia de la transferencia horizontal de genes que confiriera resistencia a la colistina. Esto resalta la importancia de mejorar la vigilancia mundial ya que las bacterias pueden compartir y diseminar fácilmente dicha resistencia.

Las polimixinas se emplean en animales de granja para prevenir infecciones y promover su crecimiento. Por ello es importante que la vigilancia de la propagación de MCR-1 no se limite únicamente a la medicina humana sino que también abarque al ámbito de la medicina veterinaria. El uso de polimixinas en la cría de animales ha favorecido la aparición del plásmido de resistencia a la colistina. En ese sentido, es urgente que el uso de este antibiótico sea limitado al tratamiento de animales afectados clínicamente.(9) El tratamiento dirigido de los pacientes con infecciones causadas por bacilos gran negativos multiresistentes es una tarea ardua, pues ha de recurrirse a un escaso número de antibióticos que, a menudo, son más tóxicos y posiblemente menos eficaces que β -lactámicos y fluoroquinolonas. En términos generales, se recomienda la utilización de al menos dos fármacos activos o con actividad sinérgica *in vitro*, tanto porque varios estudios observacionales han asociado esta estrategia con mejores desenlaces clínicos, como en un intento de evitar la emergencia ulterior de resistencia .(9)

2.6.4. Genética molecular de la resistencia antimicrobiana

Para que tenga lugar la evolución microbiana es esencial la variabilidad genética. El vigor de un microorganismo depende de su capacidad para adaptarse a las condiciones cambiantes del medio ambiente. Los antimicrobianos ejercen presiones selectivas potentes sobre las poblaciones

bacterianas, favoreciendo a los microorganismos que son capaces de resistir. La variabilidad genética acontece por diversos mecanismos.

Las mutaciones puntuales pueden producirse en un par de bases de nucleótidos y se denominan cambio microevolutivo. Estas mutaciones pueden alterar la especificidad del sustrato enzimático o el lugar diana de un antimicrobiano, interfiriendo con su actividad. Las mutaciones puntuales en lugares decisivos de los «viejos» genes de las β -lactamasas son responsables principalmente de la notable variedad de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Un segundo nivel de variabilidad genómica en las bacterias se conoce como cambio macroevolutivo y da lugar a reordenamientos de extensos segmentos de ADN como acontecimiento individual. Dichos reordenamientos pueden incluir inversiones, duplicaciones, inserciones, deleciones o transposiciones de secuencias extensas de ADN desde un lugar de un cromosoma o plásmido bacteriano a otro.

Estos reordenamientos a gran escala de segmentos enteros del genoma bacteriano con frecuencia son generados por elementos genéticos especializados llamados integrones y transposones o secuencias de inserción, que tienen la capacidad de insertar, reordenar y moverse independientemente del resto del genoma bacteriano. (13)

Un tercer nivel de variabilidad genética en las bacterias se crea por la adquisición de largos segmentos de ADN extraño presente en plásmidos, bacteriófagos, secuencias de ADN desnudo o elementos genéticos transmisibles especializados, que se denominan elementos de integración y conjugación de otras bacterias. Estos acontecimientos se denominan transferencia lateral u horizontal de genes y se sabe que son frecuentes, sobre todo en las bacterias con competencia natural que pueden captar el ADN exógeno del entorno.

La herencia de ADN extraño contribuye aún más a la variabilidad genética de un microorganismo y su capacidad para responder a las presiones de

selección impuestas por los antimicrobianos. Estos mecanismos dotan a las bacterias de una capacidad en apariencia ilimitada para desarrollar resistencia a cualquier antimicrobiano. Los ejemplos de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa mediada por plásmidos, *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina y daptomicina, *Yersinia pestis* multirresistente y la resistencia transferible a las quinolonas en las enterobacterias atestiguan la capacidad de los microorganismos para adaptarse a las presiones medioambientales, como la exposición a antibióticos. (13)

Una vez el gen de resistencia antimicrobiana evoluciona puede propagarse entre bacterias por transformación, transducción, conjugación o transposición. Los clones favorecidos de las bacterias pueden proliferar en la microbiota de pacientes tratados con antibióticos. Se tienen pruebas de que los genes de resistencia antimicrobiana ya existían antes de la introducción de los antimicrobianos en el tratamiento de las infecciones humanas y se han encontrado en bacterias obtenidas de muestras congeladas del Ártico, que no han sido tocadas por la mano humana durante más de 30.000 años.

Los antibióticos a menudo se sintetizan por las bacterias productoras de antibióticos cuando están a punto de entrar en una fase tardía de crecimiento estático y van a quedar durmientes o a esporular.

Las bacterias productoras de antibiótico son resistentes a los antibióticos que ellas mismas producen. Por tanto, los antibióticos que se liberan hacia el microambiente por parte de las bacterias durmientes son evitados como posibles tóxicos por los competidores, aunque sirven como fuente de carbono (alimento) de fácil acceso para la siguiente generación de la cepa bacteriana productora de antibiótico cuando se reinicia la fase de crecimiento.

Hoy día, los niveles ambientales de múltiples clases de antimicrobianos son tan frecuentes en muestras del suelo y agua que múltiples géneros bacterianos poseen cepas que subsisten por completo tan sólo con antibióticos como fuente exclusiva de carbono. Estas bacterias expresan niveles muy altos de resistencia a una amplia variedad de clases de antibióticos. Los medios

acuáticos son especialmente ricos en poblaciones bacterianas que poseen múltiples genes de resistencia antimicrobiana. (13)

Es probable que estas cepas bacterianas ambientales proporcionen a los patógenos potenciales para el ser humano nuevos genes de resistencia antimicrobiana. Las presiones de selección ejercidas sobre las poblaciones microbianas por los antibióticos favorecen la expansión de cepas que tienen la capacidad de resistir los efectos inhibidores de los antibióticos. Estas poblaciones resistentes proliferan y diseminan los genes de resistencia antimicrobiana verticalmente a las generaciones ulteriores y horizontalmente a las cepas sensibles de bacterias relacionadas, incluso de especies o géneros diferentes. Aunque algunos genes de resistencia antimicrobiana ejercen una carga metabólica sobre las bacterias, muchos microorganismos poseen estrategias evolucionadas que limitan este coste mediante la represión de la expresión de genes cuando no se necesitan o mediante una variación de fase. Estas adaptaciones permiten que, en ausencia de presión de selección antimicrobiana, como reserva, se mantenga una resistencia antimicrobiana favorable pero en ocasiones «de alto coste», aunque expresada con la reexposición a los antimicrobianos. (13)

La exposición continuada a ADN extraño es tan habitual dentro de las comunidades microbianas que muchas bacterias han desarrollado sistemas para defender su genoma del ADN exógeno, de los fagos y de la inserción de plásmidos. Esto se consigue al menos mediante dos mecanismos: 1) enzimas modificadoras de ADN específicas de cada especie o de cada cepa (p. ej., mediación de algunas secuencias seleccionadas del ADN del huésped en patrones específicos) y enzimas de restricción que vigilan el ADN celular del huésped y degradan el ADN extraño que no contiene las secuencias de modificación del ADN adecuadas, y 2) un tipo de sistema defensivo adaptativo frente al ADN extraño denominado CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agregadas distribuidas de forma regular).

Se detectan CRISPR casi en un 50% de todos los genomas bacterianos, y este elemento genético protege a los genomas del ataque por ADN extraño durante la transformación, la invasión por fagos o la inserción de plásmidos. El mecanismo de protección viene mediado por la inserción de secuencias pequeñas del ADN invasor movilizado entre las repeticiones palindrómicas dentro del CRISPR. (13)

Tras la re exposición a secuencias de ADN parecidas procedentes de fagos o bacterias invasoras, la secuencia presente en el seno del CRISPR se transcribe a un ARN pequeño (denominado crARN), que se asocia a las nucleasas asociadas al CRISPR y evita la integración del ADN extraño contra el que se dirigen.

El mantenimiento de la identidad del genoma del huésped, al tiempo que se permite una variabilidad limitada mediante los cambios micro y macroevolutivos, permite también a los patógenos conseguir un equilibrio entre la estabilidad y la plasticidad genómica en microambientes sometidos a cambios rápidos. Evidencias recientes obtenidas en los *Enterococos* indican que la delección de los elementos de CRISPR se relaciona de forma inversa con la aparición de resistencia a múltiples antibióticos. Las cepas con deficiencia de CRISPR han sido seleccionadas y están especialmente bien adaptadas en las infecciones vinculadas al ámbito sanitario. (13)

Estas cepas tienen unos genomas significativamente más grandes como consecuencia de la inserción de grandes secuencias de ADN, que incluyen genes que median en la resistencia a múltiples antibióticos.

2.6.4.1. Plásmidos

Antes de la introducción de los antibióticos, los elementos extracromosómicos ya estaban presentes en las bacterias. La introducción de los antibióticos en la medicina clínica en el siglo XX creó presiones de selección que favorecieron la propagación de los genes de resistencia a través de los elementos génicos

móviles. Los plásmidos están especialmente bien adaptados para servir como elementos de intercambio genético y propagación de los genes de resistencia. Son elementos genéticos que se replican de forma autónoma y están formados por moléculas circulares de ADN bicatenario, cerradas de modo covalente, y cuya longitud varía desde menos de 10 pares de kilobases hasta más de 400. Son extremadamente frecuentes en las bacterias. A pesar de que en una célula bacteriana individual pueden encontrarse múltiples copias de un plásmido específico o numerosos plásmidos diferentes (o ambos), en la misma célula no pueden coexistir plásmidos directamente relacionados. (13)

Esta observación ha dado lugar a un sistema de clasificación de los plásmidos basado en los grupos de incompatibilidad. Además de la resistencia antimicrobiana, los plásmidos pueden determinar una amplia variedad de funciones, incluida la virulencia y la capacidad metabólica. Todos los plásmidos poseen un sitio de replicación de la ADN polimerasa para unirse y replicar el ADN plásmido. (13)

También deben conservar una serie de genes que facilitan su mantenimiento estable en la bacteria huésped. La transferencia de ADN plásmido entre especies bacterianas es un proceso complejo, y los genes que han de transferirse hacen que los plásmidos conjugativos sean más largos que los no conjugativos.

Algunos plásmidos pequeños pueden ser capaces de transferirse a otras bacterias utilizando el mecanismo de conjugación proporcionado por los plásmidos conjugativos corresidentes o incluso los transposones conjugativos. Numerosas funciones codificadas por los plásmidos permiten que las cepas bacterianas persistan en el ambiente resistiendo a los agentes nocivos, como los metales pesados. El mercurio liberado de las obturaciones dentales puede aumentar el número de bacterias resistentes a los antimicrobianos en la cavidad oral. Los antisépticos como el hexaclorofeno y los derivados del amonio cuaternario se usan como bacteriostáticos tópicos, siendo que la

resistencia mediada por plásmidos a estas sustancias ha aumentado sustancialmente (13)

2.6.4.2. Elementos genéticos transponibles

Los transposones pueden translocarse como una unidad desde un área del cromosoma bacteriano a otra o entre el cromosoma y el plásmido o el ADN del bacteriófago. Los elementos genéticos transponibles poseen un sistema especializado de recombinación que es independiente del sistema de recombinación generalizado que clásicamente permite la recombinación de secuencias de ADN en gran parte homologas a través de acontecimientos de entrecruzamiento (el sistema recA de las bacterias).

El sistema de recombinación recA-independiente («transposasa») de los elementos transponibles suele acontecer de manera aleatoria entre secuencias no homologas de ADN y da lugar a modificaciones de extensas secuencias de ADN como acontecimiento único. Hay dos tipos de elementos genéticos transponibles, transposones y secuencias de inserción, que poseen características similares. (13)

Las pruebas a partir de ensayos de secuenciación de todo el genoma indican que los cromosomas bacterianos están llenos de elementos transponibles. Es probable que estas secuencias móviles desempeñen un papel importante fisiológico en la variación y evolución genética de los procariontes. Los transposones difieren de las secuencias de inserción porque codifican genes funcionales que median una característica fenotípica reconocible, como un marcador de resistencia antimicrobiana. Cualquiera de los elementos puede translocarse como una unidad independiente. Ambos elementos están flanqueados a cada extremo por secuencias cortas idénticas de ADN en orden inverso (terminales inversamente repetidos). Estos terminales de ADN inversamente repetidos son esenciales para el proceso de transposición.

Los transposones (Tn) y las secuencias de inserción (SI) son incapaces de autorreplicarse de forma autónoma y deben estar presentes en un replicón,

como el cromosoma, un bacteriófago o un plásmido para replicarse y mantenerse en una población bacteriana. (13)

2.6.4.3. Métodos de identificación del gen mcr-1

Los métodos de tipificación, tanto para las bacterias como para los plásmidos, se clasifican en dos grandes grupos: fenotípicos (basados en características fisiológicas o bioquímicas) y genotípicos (basados en el estudio del ADN). El extraordinario avance de la biología molecular en los últimos años ha permitido desarrollar nuevos métodos genotípicos de tipificación, como el PCR-MCR-1. En la presente investigación se utilizaron dos métodos fenotípicos para la detección del nuevo mecanismo de resistencia MCR-1, que actualmente están descritos en la literatura, test de la pre difusión descrito por (*Frølund-Thomsen*) y el test del disco combinado descrito por ESPOSITO et al., 2017(14)

Debido a la falta de nuevas opciones terapéuticas a llevado a los galenos a la utilización del colistin, la evaluación de sensibilidad a esta droga se ha vuelto crítica ya que probablemente sea integrante de la antibiótico terapia definitiva. Esto lleva a la necesidad de recurrir a métodos de diagnóstico accesibles, que rápidamente permitan dar respuesta en el laboratorio clínico, como lo indica el boletín N° 5 del Instituto Malbran que indica al método de predifusion como método aceptable comparado con el método de referencia que es la macro/microdilucion en caldo.(15)Siendo también el método del doble disco comparable con ese método de referencia.

Habida cuenta que CLSI no dispone de puntos de corte para la interpretación de las pruebas de sensibilidad por dilución para polimixinas en Enterobacterias, los ensayos se interpretaron con los sugeridos por EUCAST, Sensible: $\leq 2 \mu\text{g/ml}$; Resistente: $\geq 4 \mu\text{g/ml}$

2.6.5. Métodos genotípicos de identificación del gen MCR-1

2.6.5.1. Predifusion.

Principio. Esta técnica fue desarrollada por un microbiólogo danés, *Frølund-Thomsen*, hace varias décadas. La idea es dar a los antimicrobianos de alto peso molecular un período de tiempo más largo para difundir en el agar antes de que se produzca el crecimiento bacteriano. Se predifunde el antibiótico en la placa (sin bacterias), durante unas 20 horas (overnight).

De esta manera se consigue un gradiente de antibiótico en el agar, resultando en una buena separación entre cepas con CMI's distintas.

Se puede decir que con el método de difusión corriente la diferencia entre dos CMI's consecutivas corresponde a aprox. 1 mm de diferencia entre las zonas de inhibición (con colistina) y mientras que con el método de predifusión la diferencia de zonas entre dos CMI's consecutivas es de 4 – 5 mm. Con ello es claro que el método de predifusión es casi tan exacto como el método de medir CMI's.(16)

2.6.5.2. Método del disco combinado (CDT)

Principio. El ensayo del disco combinado fue propuesto por (ESPOSITO y colaboradores el año 2017), los autores adaptaron cuatro métodos específicos basados en la inhibición del mecanismo MCR-1 por EDTA, a partir de los métodos descritos para la detección de cepas productoras de enzimas metalo- β -lactamasa. Inicialmente, seleccionaron una concentración de EDTA que no mostraba actividad antibacteriana contra todos los aislamientos seleccionados, fueron añadiendo diferentes concentraciones y volúmenes de solución EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) Al disco blanco y 2 discos de colistina-10 μ g. De esa manera, realizaron combinaciones de volúmenes desde 5, 10 y 20 μ L de las siguientes concentraciones de EDTA, 50, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400 y 500 mM a un (pH 8,0). Finalmente seleccionaron el uso de 10 μ L de una solución EDTA a una concentración final

de 100 mM, como una opción de ensayos adicionales para aquellas bacterias que presentan resistencia a la colistina.

2.6.5.3. Procedimiento Predifusion

Se preparó placas conteniendo medio de ensayo de susceptibilidad, Agar Mueller-Hinton, en seguida se depositó un Neo-Sensitabs del antimicrobiano, 2 horas después de dejar en reposo a temperatura ambiente, se retiró la tableta (disco) proporcionando un golpe leve a la placa contra una superficie rígida, posteriormente se dejó a una temperatura ambiente durante 18 o 22 horas, después de ese tiempo las placas fueron inoculadas con suspensiones bacterianas previamente ajustadas según el patrón de turbidez de 0,5 en la escala de McFarland. siguiendo de las recomendaciones del (CLSI. 2017), se adicionó discos antimicrobianos (Neo-Sensitabs) y se dejó incubando durante 18 horas a una temperatura de 35°C, posteriormente se realizó la lectura midiendo las zonas de inhibición y se compararon con los puntos de corte de la zona. Entendiéndose zona susceptible ≥ 15 mm (correspondiente a una MIC de ≤ 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Intermedio: 14-10 mm, Resistente: sin zona (MIC ≥ 8 g / ml)

2.6.5.4. Procedimiento del doble disco

Las suspensiones bacterianas fueron sembradas en las placas de agar Mueller-Hinton, previamente ya preparadas anteriormente con ayuda de hisopos estériles. Inmediatamente con la ayuda de una pinza estéril se depositó dos discos conteniendo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antimicrobiana colistina y el disco blanco que no contiene antibiótico, posteriormente utilizando una micropipeta calibrada se impregno con 10 μL de una solución de EDTA 0.1 Molar, en 1 disco de colistina y en el disco blanco, se dejó incubando durante un periodo de 18-24 horas en estufa a una temperatura de 35 °C. Posteriormente se procedió a medir los diámetros de la zona de inhibición alrededor de los discos de colistina (con y sin EDTA) las cepas que presentaban ≥ 3 mm de diferencia en el tamaño de las zonas de inhibición alrededor del disco conteniendo colistina con EDTA en comparación con las

zonas de inhibición del disco de colistina sin EDTA fue interpretado como cepa portadora del gen MCR-1. Conforme recomendaciones de (ESPOSITO et al., 2017).

2.6.5.5. Test Complementarios

Ante la realidad de que no contamos con materiales y equipamientos necesarios se realizaron test complementarios en colaboración con el Laboratorio de Resistencia Bacteriana y alternativas terapéuticas de la Universidad de São paulo-Brasil. Todas las muestras que presentaron el nuevo mecanismo de resistencia a la colistina MCR-1, identificado a través de los dos test fenotípicos, fueron sometidos a los siguientes exámenes: determinación de concentración inhibitoria mínima por el método de Micro dilución en caldo CIM, detección del gen *mcr-1*, por el método convencional PCR y secuenciamiento del genoma completo, por secuenciamiento de nueva generación WGS.

2.7. Impacto mundial de la resistencia antimicrobiana

La RAM tiene un impacto mundial desde que los microorganismos y genes resistentes no respetan fronteras geográficas o ecológicas. La diseminación ocurre a través de alimentos, agua, animales y/o personas por los viajes y comercio internacional con un alto volumen de tráfico aéreo. Además, por la transmisión de genes de resistencia interespecies y la pobre higiene y saneamiento en comunidades y los hospitales.

Un ejemplo de ello lo constituye la diseminación rápida mundial del clon ST258 de *K. pneumoniae* carbapenemasa KPC detectado, inicialmente, en Estados Unidos en 1996; el clon ST131 de *E. coli* relacionado con resistencia a cefalosporinas y fluoroquinolonas y el clon USA 300 de *S. aureus* resistente a la metilicina.

Es evidente que la RAM ha puesto en riesgo los logros de la medicina moderna. Entre las infecciones más temibles en la actualidad son las

producidas por bacilos gran negativos multiresistentes para las cuales no quedan casi ninguna opción de tratamiento. El desarrollo de antibióticos contra estas bacterias es particularmente difícil debido a la baja permeabilidad de la pared celular de estas, la variedad de bombas de eflujo (que activan el transporte de antibióticos fuera de la célula) y como se citó previamente, una serie de enzimas capaces de inactivar a todos los β -lactámicos. .(9)

Por la dispersión de las BLEE y carbapenemasas (KPC y NDM) en servicios de salud de las Américas, la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) ha emitido 5 alertas epidemiológicas en los últimos años. La más reciente sobre la emergente resistencia transferible a colistina con hallazgos en países de la región como Brasil, Colombia, Argentina, Estados Unidos y Canadá.

Neisseria gonorrhoeae resistente a todos los antimicrobianos disponibles para el tratamiento de las infecciones de transmisión sexual, también fue objeto de alerta epidemiológica en el 2011 en la región. La cepa denominada H041 es resistente a penicilina, ciprofloxacina, tetraciclina y cefalosporinas de tercera generación siendo sensible a espectinomicina y con sensibilidad reducida a azitromicina.

La resistencia a los antifúngicos también evoluciona con el transcurso de los años aunque con menos impacto clínico y epidemiológico que en bacterias. Recientemente, la OPS/OMS emitió una alerta en la región de Latinoamérica relacionada con *Candida auris*, identificado como patógeno humano desde 2009 en Japón y ha sido causa de brotes afectando a Venezuela y Colombia. Se ha relacionado en pacientes con estancia prolongada en las unidades de cuidados intensivos neonatales y de adultos. Su aislamiento estuvo circunscrito a muestras de sangre, orina y lavado bronquioalveolar. La resistencia al fluconazol, voriconazol y anfotericina B fue evidente en este patógeno emergente. Esto ratifica la trascendencia en la actualidad de la resistencia a antifúngicos por hongos de importancia clínica.

La OMS solicita incrementar los esfuerzos para intensificar la vigilancia e implementar protocolos para la detección oportuna de mecanismos emergentes de resistencia, así como intensificar medidas de prevención y control de infecciones.(9)

2.8. Marco teórico referencial

Un estudio sobre la resistencia plasmídica a colistin por el gen *mcr-1* en Enterobacteriaceae en Paraguay informa que 150 cepas de Enterobacterias, remitidas de diversos centros, fueron estudiadas en el Servicio Antimicrobianos del Departamento Bacteriología y Micología del LCSP de donde fueron aisladas las cepas de Enterobacterias estudiadas, de las cuales 56 correspondieron a orina. Del total de las cepas estudiadas, el 95 % correspondieron a pacientes hospitalizados y el 53 % al género masculino.

Las Enterobacterias identificadas correspondieron a: *Klebsiella pneumoniae* (kpn), *Escherichia coli* (eco), *Enterobacter cloacae* (ecl), *Citrobacter freundii* (cfr), *Klebsiella oxytoca* (kox), *Pantoeae agglomerans* (eag), *Salmonella Schwarzengrund* (ssw)..

En cuanto a los halos de inhibición, 109 de las cepas presentaron halos de inhibición frente a colistina menor a 10 mm de diámetro y 41 entre 10 y 12 mm. De las 150 cepas con resistencia a colistina, en 7 de ellas se confirmó la portación del gen *mcr-1* (4,7 %).

En aquellas con resultados negativos para *mcr-1* se encontró resistencia a otros antibióticos: 112 cepas con resistencia a carbapenemes, de las cuales 96 (67 %) correspondieron a KPC y 16 (11 %) a NDM-1; en 20 (14 %) se detectó la presencia de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE) y en 2 (1 %) de represión de β -lactamasa de tipo AMP-C1%).

De las 7 cepas confirmadas para el gen *mcr-1*, 3 correspondieron a *Klebsiella pneumoniae* (kpn), 3 a *Escherichiacoli* (eco) y 1 a *Salmonella Schwarzengrund*. Los resultados de las pruebas de sensibilidad a colistina demostraron que las cepas portadoras del gen *mcr-1* presentaron halos de inhibición de entre 10 y

12 mm; y que las CIMs, independientemente de los métodos empleados (Epsilométrico, Elusión de discos de colistina de 10 ug y microdilución en caldo), no superaron 8 ug/ml.

En todas ellas, se encontró que la portación del gen *mcr-1* estaba asociada a otros mecanismos de resistencia: una de ellas a carbapenemasa tipo KPC además de portación de BLEE tipo CTX-M y PMQR (17)

En Chile un estudio publicado como la primera comunicación en Chile de la detección del gen *mcr-1* en un aislado clínico de *Escherichia coli* resistente a colistín, se analizaron todas las cepas de bacilos gram negativos resistentes a colistín provenientes de muestras clínicas recibidas en el Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, entre los años 2013 y 2017.

Se definió como resistencia una concentración inhibitoria mínima (CIM) ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ determinada mediante microdilución en caldo (SensititreTM, TREK Diagnostics). Se analizaron un total de 13 aislados correspondientes a cinco *Acinetobacter baumannii*, tres *E. coli*, cuatro *K. pneumoniae* y un aislado de *P. aeruginosa*; se incluyó además una cepa con resistencia intrínseca (*P. mirabilis* ATCC 7002) y otra sensible (*K. pneumoniae* ATCC 46113).

Los 13 aislados clínicos provenían de muestras de orina (8), herida (2), aspirado endotraqueal (2) y líquido peritoneal (1).

A las cepas incluidas en el estudio se les realizó una reacción de polimerasa en cadena (RPC) utilizando los partidores descritos por Liu y cols. 2016 (CLR5-F: 5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3' y CLR5-R 5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3') con un producto de RPC esperado de 309 pb.

Los productos amplificados fueron posteriormente secuenciados en el Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Laboratorios Clínicos de la Red de Salud, mediante electroforesis capilar en un analizador genético ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA). El resultado fue analizado mediante BLAST.

De las 13 cepas estudiadas se observó amplificación de una banda del tamaño esperado en sólo un aislado de *E. coli*. El producto amplificado fue posteriormente secuenciado y analizado con el programa BLAST correspondiendo al gen *mcr-1* de *E. coli* con un 100% de identidad. Esta cepa provenía de una muestra de orina de un paciente de origen ambulatorio recibida en el año 2016. Junto a una CIM elevada a colistín (CIM = 8 µg/ mL) esta cepa presentó resistencia a ciprofloxacina y cotrimoxazol, siendo sensible a betalactámicos, aminoglucósidos y nitrofurantoína. (18)

El reciente descubrimiento de un gen de resistencia a la colistina transmitida por plásmidos, *mcr-1*, en China anuncia la aparición de bacterias verdaderamente pan-resistentes a los medicamentos. El gen se ha encontrado principalmente en *Escherichia coli* pero también se ha identificado en otros miembros de *Enterobacteriaceae* en muestras humanas, animales, alimentarias y ambientales en todos los continentes. En respuesta a esta amenaza, a partir de mayo de 2016, todas las *E. coli productoras de β-lactamasa de espectro extendido (BLEE)* en los aislados clínicos enviados al laboratorio de microbiología clínica en el Centro Médico Militar Nacional Walter Reed, conocido como el Hospital Naval Bethesda, está considerado el mejor y más importante centro médico de Estados Unidos (WRNMMC) han sido evaluados por E-test para determinar la resistencia a la colistina.

En este centro se informa la presencia de *mcr-1* en una cepa de *E. coli* cultivada de un paciente con una infección del tracto urinario (ITU) en los Estados Unidos. La cepa era resistente a la colistina, pero seguía siendo susceptible a varios otros agentes, incluyendo amikacina, piperacilina-tazobactam, todos los carbapenémicos y nitrofurantoína.

El cultivo se realizó a partir de la orina de una mujer de 49 años que se presentó en una clínica en Pensilvania el 26 de abril de 2016 con síntomas indicativos de una ITU. El aislado se envió a WRNMMC, donde las pruebas de susceptibilidad indicaron un fenotipo de ESBL. El aislado se incluyó en los primeros 6 aislamientos de *E. coli productores de ESBL* seleccionados para la

prueba de susceptibilidad a colistina, y fue el único aislado que tuvo una CIM de colistina de 4 µg / ml (todos los demás tenían CIM de ≤0,25 µ / ml). La colistina MIC se confirmó mediante caldo microdilución, y *mcr-1* se detectó mediante PCR en tiempo real. La secuenciación del genoma completo (WGS) de MRSN 388634 se realizó usando un sistema PacBio RS II y un secuenciador de sobremesa MiSeq. (19)

En Italia un estudio describe tres casos de infecciones del torrente sanguíneo por *Escherichia coli* resistentes a colistina y positivas al gen *mcr-1*, de agosto de 2016 a enero de 2017. La descripción de los casos fue la siguiente:

Perfil de susceptibilidad a los antibióticos

CASO	Fecha de aislamiento	CST	AMK	AMPERIO	CAZ	CTX	FEP	CIP	FOS	MEM	GEN	TZP	SXT	TGC
1	7 de agosto de 2016	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	12 de agosto de 2016	R	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
3	22 de enero de 2017	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R

Caso 1. En julio de 2016, una mujer de 70 años con un carcinoma ductal pancreático diagnosticado 5 años antes, ingresó en una unidad de enfermedad respiratoria por derrame pleural. Se sabía que tenía metástasis óseas y hepáticas, estaba esplenectomizada y había recibido 18 ciclos de quimioterapia en los últimos 5 años.

Cuatro días después del ingreso, tuvo fiebre (38.8 ° C), vómitos y dolor abdominal asociado con un aumento de los marcadores inflamatorios: procalcitonina 60 ng/mL (norma: 0.00–0.50 ng / mL), proteína C reactiva (CRP) 23.29 mg/dL (norma: 0,00-0,50 mg / dL) y glóbulos blancos muy elevados (WBC) 38,92 x 10³ uL (norma: 4–10 x 10³ uL). *E. coli* se aisló a partir de orina y hemocultivos, estos dos aislamientos mostraron los mismos perfiles de susceptibilidad antimicrobiana y ambos mostraron resistencia a la colistina. La paciente fue tratada empíricamente con meropenem por vía intravenosa y su condición clínica mejoró rápidamente. Fue dada de alta después de 20 días

de hospitalización. Nunca había recibido tratamiento previo con colistina y no informó ningún contacto cercano anterior con animales de granja. No había viajado al extranjero desde 2008.

Caso 2. En agosto de 2016, una mujer de alrededor de 60 años con diagnóstico de linfoma no Hodgkin fue ingresada en la unidad hematológica de nuestro hospital por distensión del uréter, pelvis renal y cálices debido al bloqueo del flujo de orina por ganglios linfáticos voluminosos. Ella había sido tratada con dos ciclos de quimioterapia en las 6 semanas anteriores con mala respuesta. Se sometió a una nefrostomía después del ingreso y un día después desarrolló fiebre (38.0°C) y escalofríos. Tenía una pancitopenia grave con menos de $0,800 \times 10^3 / \mu\text{L}$ (norma: $4\text{--}10 \times 10^3 \mu\text{L}$) WBC y aumento de CRP $3.50 \text{ mg} / \text{dL}$ ($0.00\text{--}0.50 \text{ mg} / \text{dL}$).

La paciente recibió tratamiento empírico intravenoso con piperacilina / tazobactam y vancomicina. *E. coli* fue aislada de orina y hemocultivos. Al igual que en el caso 1, los dos aislamientos obtenidos mostraron los mismos perfiles de susceptibilidad antimicrobiana, ambos indicando resistencia a la colistina. La PCR disminuyó al rango normal en 3 días y la fiebre desapareció en 24 horas. El paciente falleció 5 días después por una hemorragia cerebral masiva. Nunca había recibido tratamiento previo con colistina y no informó ningún contacto cercano previo con animales de granja. En los 12 años anteriores no había viajado al extranjero.

Caso 3.

En enero de 2017, una mujer de unos 80 años con fiebre ($> 38.5^{\circ}\text{C}$), diarrea y dolor abdominal fue ingresada en la unidad de enfermedades infecciosas del mismo hospital terciario. En 2012, se le realizó una mastectomía y quimioterapia para el cáncer de mama. Los hemocultivos se extrajeron al ingreso y recibió tratamiento empírico intravenoso con piperacilina/tazobactam. *E. coli* fue aislada de hemocultivos, la cepa era resistente a la colistina pero susceptible a otros antimicrobianos de uso común. Tenía $10.03 \times 10^3 / \mu\text{L}$ WBC (norma: $4\text{--}10 \times 10^3 \mu\text{L}$) y marcadores inflamatorios

altos: procalcitonina 50.50 ng / mL (norma: 0.00–0.5 ng / mL), CRP 28.41 mg / dL (norma: 0.00 –0.5 mg / dL).

Su condición clínica mejoró rápidamente y fue dada de alta del hospital después de 8 días. Nunca había sido tratada con colistina, no había reportado ningún contacto cercano anterior con animales de granja y nunca había viajado al extranjero. (20)

Una publicación en Argentina sobre el primer aislamiento con resistencia transferible a colistina mediada por el gen *mcr-1* en el Hospital de Pediatría Juan p. Garrahan, informa sobre un niño de 11 años con antecedentes de vejiga neurogénica se internó para el retiro programado de un esfínter urinario artificial.

El paciente presentaba antecedentes de mielomeningocele con Arnold Chiari operado al nacer, con válvula de derivación ventrículo peritoneal. El niño realizaba cateterismo intermitente y tenía antecedentes de infecciones del tracto urinario a repetición, con uso prolongado de antibióticos de amplio espectro en los últimos 12 meses.

El esfínter había sido colocado un año antes de la internación actual, pero se decidió retirarlo por sospecha de infección asociada al dispositivo con mala respuesta al tratamiento antibiótico empírico. Se realizó la cirugía sin complicaciones y el paciente permaneció internado para control en la unidad de cuidados intensivos. A las 24 horas después de la extracción del esfínter ureteral artificial se recibió el informe de microbiología del desarrollo de un bacilo gram negativo en un urocultivo de control realizado previo a la cirugía urológica.

El paciente había recibido profilaxis antibiótica prequirúrgica con ampicilina sulbactam, la que luego fue suspendida. En el sedimento urinario del urocultivo se observó leucocituria significativa (10 a 15 leucocitos por campo) y se registró el desarrollo de 100.000 unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli* identificada como tal por espectrometría de masa (Vitek MS). Se realizaron pruebas de sensibilidad a los antibióticos por el método

automatizado Vitek 2C. Además se probó la sensibilidad a colistina por Etest [Concentración inhibitoria mínima (CIM) = 4 µg/ml] y por difusión con discos (halo de inhibición = 11mm). Se interpretó al aislamiento como resistente a colistina por todas las metodologías empleadas. Dicha resistencia se caracterizó por técnicas de biología molecular. Para ello, se empleó como método la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuencia blanco estudiada fue el gen *mcr-1*.

El aislamiento presentó resistencia a cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación debido a la hiperproducción de una beta-lactamasa de tipo AmpC. Ante la alerta de la presencia de un microorganismo multirresistente surgida desde el laboratorio de microbiología, se indicaron las medidas de aislamiento estipuladas especialmente para evitar la diseminación de gérmenes multirresistentes: habitación individual, uso de camisolín, guantes y elementos individualizados para el paciente.

Además, se reforzaron las recomendaciones universales respecto al lavado de manos. A pesar de estar el paciente asintomático, por tratarse de un urocultivo realizado previo a la manipulación de la vía urinaria, se decidió repetir el urocultivo e indicar piperacilina- tazobactama. El urocultivo de control realizado antes de la indicación de piperacilina-tazobactama fue negativo, y dado que el paciente permaneció asintomático y con buena evolución, se suspendió el tratamiento antibiótico. El niño fue dado de alta luego de 5 días de la cirugía. Concurrió a control en urología a la semana de la intervención, manteniéndose asintomático. Los urocultivos realizados al mes y 2 meses pos quirúrgicos fueron negativos. (21)

Un estudio sobre co-ocurrencia de *mcr-1* y *bla* KPC-2 en un aislado clínico de *Escherichia coli* en Brasil, evalúa las características del primer aislado clínico de *Escherichia coli* que alberga los genes *mcr-1* y *bla* KPC-2 en América Latina. Este aislamiento se obtuvo a partir de un hisopo rectal de un paciente hospitalizado, en septiembre de 2014, en una sala de emergencias de un hospital general en la ciudad de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, el estado

más al sur de Brasil. Es el primer informe de un aislamiento clínico con ambos genes en América Latina. Teniendo en cuenta la baja prevalencia del gen *mcr-1* entre los aislamientos clínicos de CRE (Enterobacteriaceae resistente a Carbapenem) observados en nuestro estudio, parece que si bien la resistencia al carbapenem es alta, la resistencia a la colistina mediada por plásmidos es aún rara y esporádica entre los aislamientos clínicos de CRE. (22)

En un estudio sobre resistencia a la colistina mediada por plásmidos en *Escherichia coli* de la Península Arábiga se aislaron setenta y cinco cepas de Enterobacteriaceae resistentes a colistina aisladas de casos clínicos en Bahrein, Kuwait, Omán, Arabia Saudita y los Emiratos Árabes Unidos fueron probadas por PCR para el gen *mcr-1*. *Mcr-1* cepas positivas fueron genotipo, y su susceptibilidad a los antibióticos se estableció. Los plásmidos que contenían *mcr-1* se movilaron en *Escherichia coli* K-12 y se determinó su secuencia.

Se identificaron cuatro aislamientos de *E. coli* (dos procedentes de Bahrein, uno de Arabia Saudita y uno de los Emiratos Árabes Unidos) que portaban el gen *mcr-1* en plásmidos conjugativos. Perteneían a clones globales de *E. coli* resistentes a múltiples fármacos, es decir, ST648, ST224, ST68 y ST131, respectivamente. Una cepa llevaba el gen de la carbapenemasa *bla*NDM-1. Tres cepas llevaron *mcr-1* en plásmidos de tipo IncI2, uno de los cuales también alberga un gen *bla*CTX-M-64. En la cuarta cepa *mcr-1* se localizó en un plásmido IncHI2 de 240 kb que alberga otros 13 genes de resistencia.

Indicando estos resultados que varios antibióticos de uso común pueden potencialmente facilitar la diseminación de cepas portadoras de *mcr-1* o directamente, *mcr-1* que contiene plásmidos. (23)

Otro estudio sobre resistencia a la colistina en aislados de *Escherichia coli* de pacientes con infección del torrente sanguíneo en Corea, donde se propuso a partir del hecho de que se detectaron aislados de *Escherichia coli* resistentes a colistina mediados por plásmidos *mcr-1* en un paciente danés con una infección del torrente sanguíneo.

Esta posibilidad plantea un importante problema de salud pública para las amenazas emergentes dadas las limitadas opciones terapéuticas, la gravedad clínica y los malos resultados. El objetivo de este estudio fue evaluar la reciente epidemiología de la resistencia a la colistina en el torrente sanguíneo *E. coli*, incluyendo la resistencia a la colistina mediada por *mcr-1* en Corea.

Los aislados clínicos no duplicados de *E. coli* ($n = 1.193$), incluidos en este estudio, se aislaron previamente de la sangre de pacientes y se almacenaron en leche descremada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta las pruebas en un hospital de enseñanza terciaria en Seúl, Corea durante 2014 -2015. Para detectar aislamientos resistentes a la colistina, los organismos de ensayo se tamizaron en agar Mueller-Hinton (*Oxoid, Basingstoke, UK*) que contenía colistina (0, 1, 2 y 4 $\mu\text{g} / \text{mL}$) con la cepa *E. coli* ATCC25922. Se cultivó un aislado en una placa de agar con una concentración de 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de colistina y la concentración inhibitoria mínima (CMI) de colistina, determinada por la prueba E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) fue de 6 $\mu\text{g} / \text{ml}$, lo que indica que el aislamiento fue resistente a la colistina, de acuerdo con los criterios de resistencia EUCAST ($> 2\ \mu\text{g} / \text{mL}$) [4]. El *mcr-1* gen no se detectó tras repetir PCR en este aislamiento. La prevalencia general de la resistencia a la colistina en los aislados de *E. coli* de la sangre fue de 0,15% (1/644) en 2015 y 0% (0/549) en 2014.

En este estudio, se encontró que sólo un aislamiento era resistente a la colistina, pero la resistencia no fue conferida por el gen *mcr-1* (24)

Una investigación respecto a *Escherichia coli* resistente a la colistina en un viajero que regresó a Canadá desde China, que se trataba de un hombre de 61 años fue sometido a una resección transuretral de la próstata en Vancouver, Columbia Británica, en enero de 2016. El día 1 postoperatorio fue febril ($39,1\text{ }^{\circ}\text{C}$) y leucocitosis ($12,7 \times 10^9$ células / L). Los cultivos de sangre y orina se ordenaron el día 2 postoperatorio y se inició Ceftriaxona. En el día 3 postoperatorio, el cultivo de orina creció *Escherichia coli* (> 100 millones CFU / mL).

La *E. coli* cultivada en el paciente se sometió a pruebas adicionales y creció en cantidades iguales en coli de Colistina-Ácido Nalidixico (CNA) con sangre de oveja al 5% y agar de Columbia con sangre de oveja al 5% (OXOID, Ontario, Canadá). Este resultado fue llevado a la atención del microbiólogo médico del hospital. Una colistina Etest (bio Mérieux, Quebec, Canadá) mostró una CIM de 3 µg / mL; EUCAST define la resistencia a la colistina como > 2 µg / mL para Enterobacteriaceae.

Se desarrolló una PCR en tiempo real para detectar el gen de resistencia a la colistina móvil, El aislamiento también fue positivo para PCR para un gen bla CTX-M .

El paciente había viajado a China en noviembre de 2015 durante 2 semanas, donde requirió cateterización en un departamento de urgencias del hospital en la provincia de Zhejiang para la retención urinaria aguda. Experimentó una retención urinaria aguda y fiebre 6 días después de la extracción del catéter, requiriendo otra inserción del catéter y 3 días de drogas antimicrobianas intravenosas en la provincia de Guangdong. Denegó el contacto con animales de granja, mercados de aves de corral vivos o carne poco cocinada. Al regresar a Canadá, los síntomas del tracto urinario obstructivo persistieron, requiriendo 5 visitas al servicio de urgencias antes de la resección de la próstata.

Las revisiones retrospectivas han detectado mcr-1 en Enterobacteriaceae de Europa, Sudamérica, África y Japón.

A diferencia de la detección de laboratorio de fenotípico, en la que se dispone de medios de detección y paneles de susceptibilidad automatizados, no existe ningún medio de detección comercial para mcr-1. La prueba de MIC se recomienda solamente para Enterobacteriaceae resistente a todas las otras clases antimicrobianas, y la prueba molecular puede no ser accesible. Además, algunas Enterobacteriaceae son intrínsecamente resistentes a la colistina. Sólo E-test(<http://etest.net/>) podría realizarse en nuestro laboratorio, que es una limitación que puede subestimar la MIC real. Sin embargo, el

método de microdilución de caldo de referencia no está disponible para la mayoría de los laboratorios clínicos. Este aislado fue identificado por un tecnólogo que reconoció el crecimiento intenso de *E. coli*.

El cribado retrospectivo ha identificado cepas *mcr-1* en Canadá. Sin embargo, describimos un paciente prospectivamente identificado en Canadá con *E. coli* que alberga el gen *mcr-1*.

Los procedimientos limitados de detección de laboratorio tienen implicaciones para los laboratorios y la salud pública. Las pruebas de colistina de rutina para Enterobacteriaceae serían costosas y de bajo rendimiento ; Sin embargo, sin tales pruebas, la prevalencia real de *mcr-1* será subestimada (25)

En Lima Perú el año 2016 se publica un estudio sobre la caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios. Se evaluaron 53 aislamientos de *E. coli* por dos métodos fenotípicos: Jarlier y CLSI, el perfil de susceptibilidad se realizó mediante disco difusión y la caracterización genotípica mediante PCR para los genes *bla*CTX-M, *bla*TEM y *bla*SHV.

Los 53 aislamientos productores de BLEE representaron el 16,30% del total de aislados de *E. coli*, afectando principalmente a mujeres mayores de 65 años. El perfil de susceptibilidad evidenció alta resistencia a AMP, CEF, CRO(100%), LEV(87%), NOR(92%), CIP y NAL(94%), CXM y CTX(96%), SXT(70%), ATM(75%) y TOB (85%); asimismo elevada sensibilidad a NIT e IPM(100%), AMK(91%) y FOF(73,6%). El tipo de gen *bla* más frecuente fue *bla*CTX-M (55%), seguido por la coexistencia *bla*CTX-M+TEM (24%), *bla*TEM (13%) y *bla*SHV (6%). Se concluye que la frecuencia de *E. coli* productores de BLEE fue de 16,3%; siendo el gen tipo *bla*CTX-M el más frecuente, información valiosa para orientar la terapia antimicrobiana empírica. (26)

Un estudio caso y control realizado en el Hospital Cayetano Heredia sobre factores asociados a la presentación de infecciones urinarias por *Escherichia coli* productoras de Betalactamasas de espectro extendido, publicado en Lima

Peru el año 2017, en el que se incluyeron 150 casos y 150 controles, definiéndose como caso al paciente con urocultivo positivo para E. coli BLEE y como control al paciente con urocultivo positivo para E. coli no BLEE.

Se realizó un análisis bivariado y regresión logística binaria para aquellos factores que resultaron significativos en el análisis bivariado. Obteniéndose como resultados que los factores asociados a la presentación de infecciones urinarias por E. coli BLEE encontrados en el estudio fueron sexo masculino (OR 5,13 - IC 95% 2,37 – 11,07), edad mayor a 45 años (OR 2,65 - IC 95% 1,61 – 4,38) y hospitalización previa (OR 2,57 - IC 95% 1,39–4,75). Se concluye en este estudio que los pacientes varones, mayores de 45 años y con antecedente de hospitalización en el último año estuvieron más propensos a presentar infecciones urinarias por E. coli BLEE, lo cual se debe tomar en cuenta para el manejo empírico de esta clase de pacientes (27)

2.9. Alcance del estudio

El estudio es de nivel descriptivo, en el cual se realiza la caracterización de la resistencia de Escherichia Coli a la colistina medida por el gen MCR-1y antimicrobianos de uso frecuente como de los pacientes de los que se obtuvieron las muestras

Y es correlacional por que se determinará el grado de asociación entre la frecuencia de la resistencia de E. Coli con la edad y sexo de los pacientes.

Es importante mencionar que no se considera el alcance como “tipo” de investigación, ya que, más que ser una clasificación, constituye un continuo de “causalidad” en el estudio (28)

2.10. Hipótesis

H_1 = NO existe asociación entre la frecuencia de resistencia de E. Coli mediante Betalactamasas con la edad y sexo de los pacientes

H_1 = Existe asociación entre la frecuencia de resistencia de E. Coli mediante Betalactamasas con la edad y sexo de los pacientes

3. CAPÍTULO: DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Tipo de estudio

Uno de los aspectos fundamentales en toda investigación es la decisión sobre el tipo de estudio a realizar, para lo cual tomamos en cuenta que el mismo se define preliminarmente desde la etapa de identificación y formulación del problema; sin embargo, cada etapa del proceso de investigación provee de elementos que sirven para su selección definitiva (29)

- El enfoque del estudio es cuantitativo, ya que se incluyen hechos o variables que se pueden contar, como por ejemplo la edad y sexo de los pacientes la frecuencia de resistencia a los antimicrobianos, etc. No se tomaron en cuenta aspectos subjetivos como creencias u opiniones sobre las variables del tema de investigación.
- El nivel de investigación es descriptivo porque primeramente se analizan las variables en forma individualizada, sin buscar la asociación o relación entre ellas. Posteriormente se aplican medidas estadísticas con el fin de determinar si existe asociación significativa entre las variables en estudio como la resistencia con la edad y sexo de los pacientes.
- En función al tiempo de realización de estudio, es retrospectivo ya que se basa en datos registrados en un periodo anterior a la elaboración de este proyecto de investigación
- Respecto al número de medidas realizadas, el estudio aplicó las medidas correspondientes en un solo periodo de tiempo continuo por lo que el estudio es de tipo transeccional.
- En cuanto al rol de la investigadora es una investigación no experimental la misma que puede definirse como la investigación que se realiza sin manipular deliberadamente variables. es decir, se trata de un estudio donde no hacemos variar en forma intencional algunas variables para ver su efecto en otras.

3.2. Universo

Son todos los pacientes con registros para identificación de *Escherichia Coli* registrados en el Hospital San Martín de Porres trópico Cochabamba

3.3. Criterios de Selección

Con frecuencia, no se puede obtener información de toda la población, sino tan sólo de unidades que cumplen una serie de características que son los criterios de inclusión/exclusión. La muestra se obtiene de la población de estudio, por lo que debe recordarse que las conclusiones extraídas de la muestra son generalizables a esta población y no al universo (30) y para delimitar esta población de estudio es necesario definir los criterios de selección de unidades de análisis.

3.3.1. Criterios de inclusión.

- Toda aislamiento bacteriano de *Escherichia coli* de cualquier sitio para la muestra
- Toda muestra con presencia de *Escherichia coli* con estudio y registro para mecanismos de resistencia bacteriana
- *Escherichia coli* aisladas durante las gestiones 2014 al 2017

3.3.2. Criterios de exclusión.

- Toda muestra que no solicita cultivo y antibiograma
- Cultivos sin crecimiento bacteriano
- Bacterias aisladas que no sean *Escherichia coli*
- *Escherichia coli* aislados que no estén en el periodo de investigación 2014 al 2017.

3.4. Unidad de análisis.

En función a los criterios de selección la unidad de análisis son todas las muestras de pacientes con *Escherichia coli* aislada durante el periodo del 2014

al 2017 con registro del sitio de su aislamiento y mecanismo de resistencia acompañante.

3.5. Población de estudio (diana).

Tomando en cuenta que la población de estudio es aquella sobre la cual pretendemos que recaigan los resultados o conclusiones de la investigación (31), en nuestro caso de acuerdo a los criterios de inclusión y de exclusión y a la unidad de análisis el tamaño de la población de estudio son 192 casos. Es necesario mencionar que en esta investigación se trabaja con la “población accesible” es decir la que acude y se registra. Como menciona Fathalla MF (OPS), esta población no necesariamente representa a la población de toda la comunidad ya que no todas las personas acuden al consultorio al laboratorio o al hospital en el tiempo de estudio. (32). Por esta razón es que los resultados serán generalizables solo a la población registrada en la institución.

3.6. Muestra

Para la selección de pacientes se realizará un muestreo no probabilístico consecutivo.

Las muestras no probabilísticas, también llamadas muestras dirigidas, suponen un procedimiento de selección informal, en este caso se realizó un muestreo no probabilístico consecutivo de todos los pacientes con aislamiento de *Escherichia coli* en un tiempo de 4 años

Es no probabilístico porque no todos los pacientes registrados con aislamiento de *Escherichia coli*, tuvieron la misma probabilidad de estar en el momento y en el lugar donde se seleccionaron los sujetos.(33) y es consecutivo por que se incluyen a todos los pacientes del primero al último registrado y que cumpla con la definición de unidad de análisis en el periodo de estudio de manera consecutiva.

En este tipo de muestreo (no probabilístico y consecutivo) si se siguen los criterios técnicos y los criterios de inclusión y exclusión, existe una aproximación aceptable a las características de la población de estudio,

aunque es necesario remarcar que las pruebas estadísticas en muestras no probabilísticas tienen un valor limitado a la muestra en sí, mas no a la población (28)

Existe una tendencia a considerar sinónimas las expresiones muestra probabilística y muestra representativa. El uso de una técnica de muestreo probabilístico tiende a asegurar que se obtendrá una muestra representativa, en especial si la población y la muestra son de gran tamaño. Sin embargo, puede que no sea así, ya que el propio azar puede conducir a una muestra que no tenga la misma distribución de las variables de interés que la población de referencia, sobre todo si su tamaño es reducido. Por otro lado, pueden obtenerse muestras representativas utilizando técnicas no probabilísticas. (34)

3.7. Operacionalización de Variables

3.7.1. Operacionalización de variables del objetivo 1

Describir a la población estudiada para resistencia a colistina y antimicrobianos frecuentes según edad, sexo, año de registro y tipo de muestra.

Variable	Dimensión	Indicador	Valores finales	Instrumento recolección de datos
Resistencia a colistina y antimicrobianos	Edad	Número y proporción de pacientes según grupo etario	<ul style="list-style-type: none"> • < 10 • 10 a 19 • 20 a 29 • 30 a 39 • 40 a 49 • 50 a 59 • 60 a 69 • ≥ 70 	Ficha de recolección de datos
	Sexo	Número y proporción de pacientes según sexo	<ul style="list-style-type: none"> • Femenino • Masculino 	Ficha de recolección de datos
	Año de registro	Número y proporción de pacientes según año de registro	<ul style="list-style-type: none"> • 2014 • 2015 • 2016 • 2017 	Ficha de recolección de datos

Variable	Dimensión	Indicador	Valores finales	Instrumento recolección de datos
	tipo de muestra	Número y proporción de pacientes según tipo de muestra	<ul style="list-style-type: none"> • Orina • Heces fecales • Herida de piel • Líquido cavidad abdominal • Líquido peritoneal • Secreción apendicitis • Secreción de pared • Secreción de glúteo • Secreción pie diabético • Tejido necrótico perianal • Trasudado pos operatorio muslo • Sepsis 	Ficha de recolección de datos

3.7.2. Operacionalización de variables del objetivo 2

Identificar los mecanismos de resistencia de E. Coli a los antibióticos más frecuentes y su relación con la edad y sexo de los pacientes

Variable	Dimensión	Indicador	Valores finales	Instrumento recolección de datos
Mecanismos de resistencia de E. Coli por antibiotico	Mecanismo de resistencia	Número y proporción de pacientes según Mecanismo de resistencia	<ul style="list-style-type: none"> • BLEE • BLEA • SDFQ • Sin mecanismo de resistencia 	Ficha de recolección de datos
	Resistencia de E. Coli a Ampicilina	Número y proporción de pacientes según Resistencia de E. Coli a Ampicilina	<ul style="list-style-type: none"> • Resistente • No resistente 	Ficha de recolección de datos
	Resistencia de E. Coli a Cotrimoxazol	Número y proporción de pacientes según Resistencia de E. Coli a Cotrimoxazol	<ul style="list-style-type: none"> • Resistente • No resistente 	Ficha de recolección de datos

Variable	Dimensión	Indicador	Valores finales	Instrumento recolección de datos
	Resistencia de E. Coli a Ácido nalidixico	Número y proporción de pacientes según Resistencia de E. Coli a Ácido nalidixico	<ul style="list-style-type: none"> • Resistente • No resistente 	Ficha de recolección de datos
	Resistencia de E. Coli a Cefalotina	Número y proporción de pacientes según Resistencia de E. Coli a Cefalotina	<ul style="list-style-type: none"> • Resistente • No resistente 	Ficha de recolección de datos
	Resistencia de E. Coli a Ceftazidima	Número y proporción de pacientes según Resistencia de E. Coli a Ceftazidima	<ul style="list-style-type: none"> • Resistente • No resistente 	Ficha de recolección de datos
	Resistencia de E. Coli a Ciprofloxacina	Número y proporción de pacientes según Resistencia de E. Coli a Ciprofloxacina	<ul style="list-style-type: none"> • Resistente • No resistente 	Ficha de recolección de datos
	Resistencia de E. Coli a Cefotaxima	Número y proporción de pacientes según Resistencia de E. Coli a Cefotaxima	<ul style="list-style-type: none"> • Resistente • No resistente 	Ficha de recolección de datos
	Resistencia de E. Coli a Aztreonam	Número y proporción de pacientes según Resistencia de E. Coli a Aztreonam	<ul style="list-style-type: none"> • Resistente • No resistente 	Ficha de recolección de datos
	Resistencia de E. Coli a Amoxicilina + AC	Número y proporción de pacientes según Resistencia de E. Coli a Amoxicilina + AC	<ul style="list-style-type: none"> • Resistente • No resistente 	Ficha de recolección de datos
	Resistencia de E. Coli a Gentamicina	Número y proporción de pacientes según Resistencia de E. Coli a Gentamicina	<ul style="list-style-type: none"> • Resistente • No resistente 	Ficha de recolección de datos
	Resistencia de E. Coli a Amikacina	Número y proporción de pacientes según Resistencia de E. Coli a Amikacina	<ul style="list-style-type: none"> • Resistente • No resistente 	Ficha de recolección de datos

Variable	Dimensión	Indicador	Valores finales	Instrumento recolección de datos
Mecanismos de resistencia de E. Coli Por edad y sexo	Edad	Número y proporción de pacientes según Resistencia de E. Coli y edad	≥ 40 años • Con resistencia • Sin resistencia < 40 años • Con resistencia • Sin resistencia	Ficha de recolección de datos
	Sexo	Número y proporción de pacientes según Resistencia de E. Coli y sexo	Femenino • Con resistencia • Sin resistencia Masculino • Con resistencia Sin resistencia	Ficha de recolección de datos

3.7.3. Operacionalización de variables del objetivo 3

Conocer la frecuencia de resistencia a colistina mediada por el gen MCR-1 en cepas de *Escherichia coli* y las características epidemiológicas de los pacientes infectados

Variable	Dimensión	Indicador	Valores finales	Instrumento recolección de datos
Resistencia a colistina mediada por el gen MCR-1 en cepas de <i>Escherichia coli</i>	Frecuencia de resistencia a colistina	Número y proporción de pacientes según Frecuencia de resistencia a colistina	• Con resistencia • Sin resistencia	Ficha de recolección de datos
	Otros mecanismos de resistencia que acompañan a la resistencia a colistina	Número y proporción de pacientes según Otros mecanismos de resistencia que acompañan a la resistencia a colistina	• BLEE • BLEA • SDFQ	Ficha de recolección de datos

Variable	Dimensión	Indicador	Valores finales	Instrumento recolección de datos
	características epidemiológicas de los pacientes infectados	Número y proporción de pacientes según características epidemiológicas de los pacientes infectados	<ul style="list-style-type: none"> • Sexo • Edad • Año • Tipo de muestra 	Ficha de recolección de datos

3.8. Recolección de datos, fuentes, técnicas e instrumentos

Para la recolección de datos se utilizaron las siguientes fuentes de información, técnicas e instrumentos de recolección de datos.

Fuente de información	Técnica	Instrumento
Secundaria	Documental	Ficha de recolección de datos (Anexo 1)

3.9. Plan de análisis estadístico

Se solicitó permiso escrito para realizar la investigación y para tener acceso a la información requerida, obteniendo la autorización verbal y escrita se procedió a la obtención de datos de las fuentes mencionadas.

Se procedió posteriormente a la aplicación de los instrumentos de recolección de datos los cuales fueron tabulados en Excel y que posteriormente se importaron al paquete estadístico SPSS (versión 22) donde fueron procesados.

Se utilizó la estadística descriptiva, para la obtención de medidas de tendencia central que conllevan información respecto a valores en torno a los que tienden a agruparse las variables estudiadas y medidas de dispersión que hacen referencia a la variedad o dispersión que muestran los datos.

Igualmente, en el análisis se emplearon valores de probabilidad matemática, expresados como porcentaje que resulta de la multiplicación de las fracciones por cien. De esta forma se midió la probabilidad de ocurrencia de los hechos investigados mediante un número entre cero y uno multiplicado por 100. (Un hecho que no puede ocurrir tiene una probabilidad de cero, y un evento cuya ocurrencia es segura tiene probabilidad de cien)

También se utilizaron estimaciones puntuales que consisten en un solo valor numérico utilizado para estimar el parámetro correspondiente de la población como la tasa de prevalencia y estimaciones por intervalos que con un grado específico de confianza, se considera que incluyen al parámetro por estimar.

Para las proporciones se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Proporción de pacientes con resistencia antimicrobiana} = \frac{\text{Número de pacientes con resistencia antimicrobiana}}{\text{Número total de pacientes valorados}} \times 100$$

Una vez que se revisaron las principales medidas de frecuencia y distribución de los fenómenos, el siguiente paso fue la comparación de dichas medidas mediante el estadístico Chi² y el “p” valor. Esta comparación es la estrategia básica del análisis y el paso fundamental para transformar los datos en información relevante. El p valor obtenido generalmente correspondió a la distribución ji cuadrada que es la técnica estadística utilizada con mayor frecuencia para la comparación y el análisis de conteo de datos de frecuencias entre grupos, La situación más común en los servicios de salud es la comparación de dos proporciones (35). Mediante e estadístico de Chi²

$$X^2 = \sum_{i=1}^K \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Donde:

X² = Chi cuadrado

O_i = Es la frecuencia de los eventos observados en los datos muestrales

E_i = Es la frecuencia de los eventos esperados si no hubiera diferencia entre las proporciones que se comparan

K = Es el número de categorías o clase

Las medidas de asociación estadística se basan en las llamadas pruebas de significancia y el propósito de estas pruebas es determinar si la presencia de un factor de riesgo evaluado está efectivamente relacionada con la frecuencia de la enfermedad. En dichas condiciones se espera que la prevalencia de exposición a dicho factor sea razonablemente más alta entre los que han enfermado o sufrido un daño a la salud que en aquellos aparentemente sanos. Esta asociación se la mide generalmente con el valor de chi cuadrado cuyo valor calculado se compara con un valor tabulado (esperado) tomado de la distribución de probabilidades teóricas. Este valor teórico corresponde al que se esperarían encontrar si los resultados observados ocurrieran puramente por azar. A este valor teórico se le llama valor crítico: si el valor observado es mayor que el valor crítico se concluye que la diferencia observada no es debida al azar y se dice que es estadísticamente significativa. El valor crítico indica el nivel de significancia de la prueba, que expresa la probabilidad de que la diferencia observada haya ocurrido por azar (dado que, en realidad, no existan diferencias). Usualmente esta probabilidad se fija en 5% y se denota como $p < 0,05$. El complemento de esta probabilidad se llama nivel de confianza, en general, 95%. Para un nivel de confianza de 95%, el valor crítico del Chi Cuadrado (de acuerdo a una tabla de distribución teórica) es 3.84, que corresponde al llamado chi cuadrado con un grado de libertad, específico para tablas 2x2 (36).

Entonces el valor esperado depende del nivel de confianza y de los grados de libertad. Los grados de libertad para una tabla de contingencia dependerán del número de columnas y del número de filas ya que el cálculo se realiza mediante el siguiente algoritmo:

Grados de libertad = $(r-1)(k-1)$

Donde:

$r = N^{\circ}$ de Filas

$k = N^{\circ}$ de columnas

Por ejemplo, para una tabla de 2 columnas y de 2 filas los grados de libertad serían:

$$\text{Grados de libertad} = (2-1) (2-1) = 1$$

A continuación, conociéndose estos dos datos el nivel de confianza y los grados de libertad se identifica el valor teórico del Chi² en una tabla de probabilidad

Distribución de Chi-cuadrado

Grados de libertad	Probabilidad de un valor superior				
	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005
1	2,71	3,84	5,02	6,63	7,88
2	4,61	5,99	7,38	9,21	10,60
3	6,25	7,81	9,35	11,34	12,84
4	7,78	9,49	11,14	13,28	14,86
5	9,24	11,07	12,83	15,09	16,75

Como los grados de libertad corresponden a 1 y se decide trabajar a un 95 % de confiabilidad entonces el punto crítico o valor teórico (esperado) del Chi² es de 3,84

El “p” valor indica el nivel de significancia de la prueba, que expresa la probabilidad de que la diferencia observada haya ocurrido por azar. Usualmente esta probabilidad se fija en 5% y se denota como $p < 0,05$. El complemento de esta probabilidad se llama nivel de confianza, en general, 95%.

Tabla 2 x 2

En los estudios caso-control se parte de dos grupos de sujetos, uno con la enfermedad y otro sin ella, y se investiga si habían estado previamente expuestos al factor de riesgo. Así, en los estudios caso - control la tabla 2x2, tiene los siguientes componentes:

	Con resistencia	Sin resistencia	
Femenino	a	b	a + b
Masculino	c	d	c + d
	a + c	b + d	a + b + c + d

a = enfermos (casos) que estuvieron expuestos al factor de riesgo

b = no enfermos (controles) que estuvieron expuestos al factor de riesgo

c = enfermos (casos) que no estuvieron expuestos al factor de riesgo

d = no enfermos (controles) que no estuvieron expuestos al factor de riesgo

a + c = total de sujetos enfermos (casos)

b + d = total de sujetos no enfermos (controles)

a + b = total de sujetos que estuvieron expuestos al factor de riesgo

c + d = total de sujetos que no estuvieron expuestos al factor de riesgo

Razón de Posibilidades (Odds Ratio)

El término 'frecuencia relativa' implica que el valor numérico de cualquier probabilidad se sitúa entre 0 y 1.

Se trata del odds. El odds (o 'ventaja') se define como la probabilidad de que ocurra un evento dividida entre la probabilidad de que no ocurra, es decir, el odds viene a ser una razón de probabilidades complementarias. Esto es:

La razón de posibilidades de los estudios caso-control proporciona una medida que es conceptual y matemáticamente análoga al riesgo relativo de los estudios de cohortes. Desde un punto de vista más práctico, el OR, corresponde a la razón de productos cruzados en una tabla 2x2, como la presentada en esta Unidad y se calcula mediante la siguiente fórmula:

	Caso	Control	
Expuesto	a	b	a + b
No expuesto	c	d	c + d
	a + c	b + d	a + b + c + d

$$OR = \frac{a \times c}{b \times d}$$

Esta medida de fuerza de asociación tiene la misma interpretación que el riesgo relativo y en determinadas circunstancias (de baja frecuencia de la enfermedad) constituye una buena aproximación de éste. Así, un OR igual a 1 (OR=1) indica ausencia de asociación exposición-enfermedad; un OR mayor de 1 (OR>1) indica exposición de riesgo y un OR menor de 1 (OR<1) efecto protector. (36)

3.10. Aspectos éticos de la investigación

Los requisitos éticos de una investigación en salud se resumen en la Declaración de Helsinki(37) algunos de los cuales se incluyen en esta investigación:

- **Mérito científico.** El párrafo 21 de la DdH estipula que la investigación médica en seres humanos debe estar justificada por bases científicas, los pasos para la realización de esta tesis se basan en el método científico que se reflejan en la secuencia de sus capítulos.
- **Valor social.** Uno de los requisitos más polémicos de un proyecto de investigación médica es que contribuya al bienestar de la sociedad. Los resultados de la investigación contribuirán al conocimiento de las variables del problema y por lo tanto se contarán con mayores posibilidades de un abordaje más efectivo desde el sistema de salud particularmente en enfermedades infecciosas emergentes. Al finalizar la investigación, ésta se pondrá a disposición de la comunidad científica en particular.
- **Riesgos y beneficios.** El riesgo es el potencial de un resultado adverso (daño) por el nivel de estudio y por el tipo de diseño NO experimental no existen riesgos para los sujetos de estudio. La tesis es de nivel descriptivo correlacional, no se manipularon intencionalmente variables

de las unidades de investigación sino más bien el estudio se basó en datos registrados durante un periodo anterior. Además, debido a que se trata de un diseño retrospectivo, no existirán riesgos físicos y/o psicológicos, tampoco potencial invasión de la privacidad, riesgo de muerte y/o alteración de la calidad de vida ni daños a terceros.

- **Consentimiento informado.** Al ser el presente estudio retrospectivo, no se incluirá la participación directa de las pacientes, por tanto no requerirá la firma de un consentimiento informado, además para salvaguardar la confidencialidad no figurará en la ficha de recolección de datos los nombres de las pacientes, lo que permitirá la no identificación del mismo.

4. CAPÍTULO: RESULTADOS ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

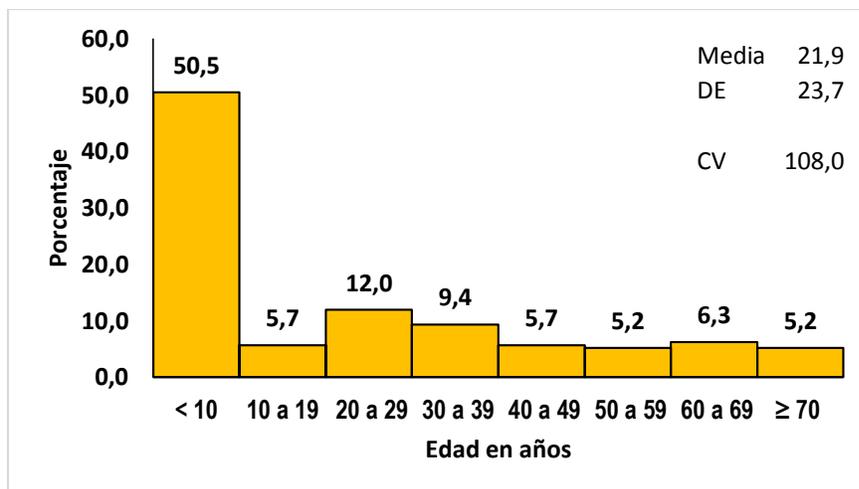
4.1. Población estudiada para resistencia a los antimicrobianos según edad, sexo, año de registro y tipo de muestra.

Tabla 1. Población estudiada para resistencia a antimicrobianos según edad hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 - 2017

Edad en años	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
< 10	97	50,5	50,5
10 a 19	11	5,7	56,3
20 a 29	23	12,0	68,2
30 a 39	18	9,4	77,6
40 a 49	11	5,7	83,3
50 a 59	10	5,2	88,5
60 a 69	12	6,3	94,8
≥ 70	10	5,2	100,0
Total	192	100,0	

Fuente: Elaboración propia

Gráfico 1. Población estudiada para resistencia a antimicrobianos según, edad hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 – 2017 (N=192)



Fuente: Elaboración propia

En promedio la población de estudio tiene 21,9 años de edad con una desviación estándar de 23,7 y un coeficiente de variabilidad de 108 % lo que representa que en esta población existen casos con valores extremos tanto inferiores como superiores., ya que la edad mínima fue de 0,17 y la máxima de 87 años.

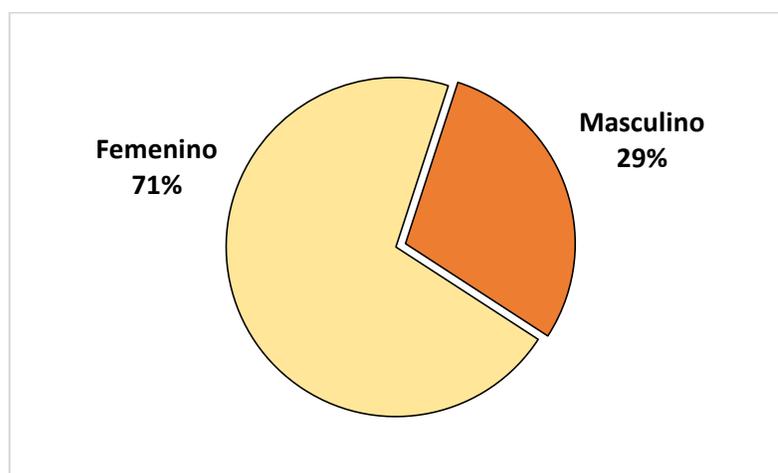
Se puede observar que de los 192 pacientes valorados para resistencia de *Escherichia Coli* a colistina un poco más de la mitad fueron menores de 10 años de edad con el 51 %, lo cual se debe a que las enfermedades infecciosas que tienen como etiología a este agente, afectan mayormente a la población infantil, por ejemplo, en gastroenteritis infecciosas o bien infecciones urinarias. Sin embargo, es importante también mencionar que toda la población es en mayor o menor grado susceptible a infecciones por E. Coli.

Tabla 2. Población estudiada para resistencia a antimicrobianos según sexo hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 - 2017

Sexo	Frecuencia	Porcentaje
Masculino	56	29,2
Femenino	136	70,8
Total	192	100,0

Fuente: Elaboración propia

Gráfico 2. Población estudiada para resistencia a antimicrobianos según sexo hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 - 2017



Fuente: Elaboración propia

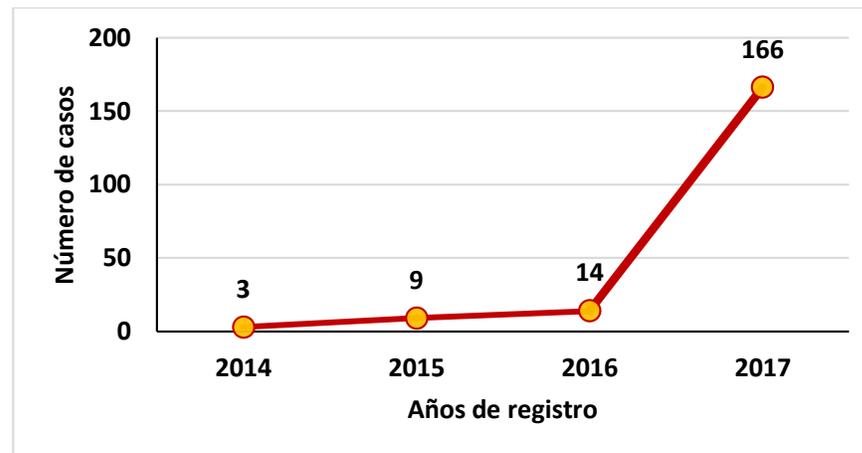
Los resultados por sexo ponen en evidencia que más de las dos terceras partes de la población estudiada se encuentran ocupadas por el sexo femenino con el 71 % de los 192 casos estudiados. Probablemente se debe a que la frecuencia de infecciones urinarias es considerablemente mayor en el sexo femenino como se encuentra también en otros estudios como por ejemplo un estudio en Uruguay sobre la etiología de la infección urinaria de adquisición comunitaria y perfil de susceptibilidad de *Escherichia coli* a los principales agentes antimicrobianos donde el 19,5 % fueron del sexo masculino y el 80,5 % del sexo femenino, (38)

Tabla 3. Población estudiada para resistencia a antimicrobianos según año de registro hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 - 2017

Año	Frecuencia	Porcentaje
2014	3	1,6
2015	9	4,7
2016	14	7,3
2017	166	86,5
Total	192	100,0

Fuente: Elaboración propia

Gráfico 3. Población estudiada para resistencia a antimicrobianos según año de registro hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 – 2017



Fuente: Elaboración propia

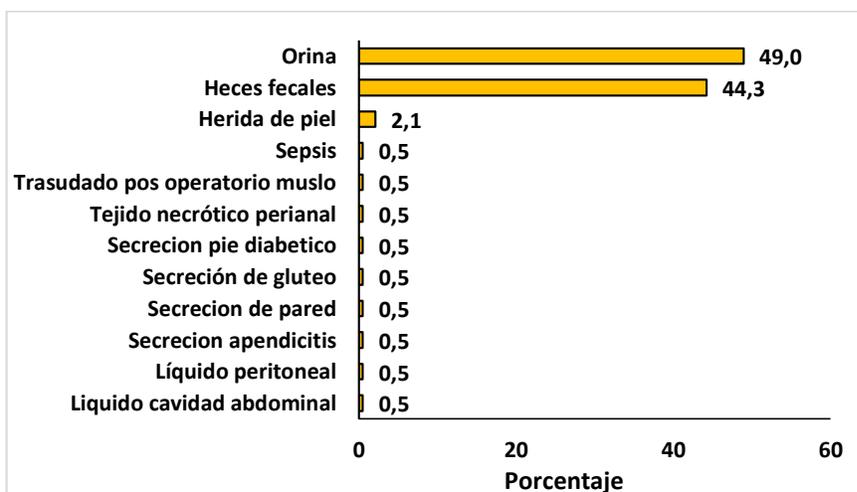
De los 192 casos 166 se procesaron en el año 2017, lo cual corresponde a un 86,5 %, en los otros años se realizaron un número de casos menor, debido a que el año 2017 se aislaron un número mayor de E. coli en muestras de heces fecales, que los años anteriores, lo que incremento el número de aislamientos.

Tabla 4. Población estudiada para resistencia a antimicrobianos según tipo de muestra hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 - 2017

Tipo de muestra	N°	%
Orina	94	49,0
Heces fecales	85	44,3
Herida de piel	4	2,1
Líquido cavidad abdominal	1	0,5
Líquido peritoneal	1	0,5
Secreción apendicitis	1	0,5
Secreción de pared	1	0,5
Secreción de glúteo	1	0,5
Secreción pie diabético	1	0,5
Tejido necrótico perianal	1	0,5
Trasudado pos operatorio muslo	1	0,5
Sepsis	1	0,5
Total	192	100,0

Fuente: Elaboración propia

Gráfico 4. Población estudiada para resistencia a antimicrobianos según tipo de muestra hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 –2017 (N=192)



Fuente: Elaboración propia

La mayor proporción de muestras provienen de orina con el 49 %, y de heces fecales con un 44,3 % debido a que todo aislamiento de E.coli con algún mecanismo de resistencia se guarda en la bacterioteca del laboratorio, en conjunto estos dos tipos de muestras ocupan el 93,3 %, sin embargo es

importante mencionar que se cuenta con muestras de diversos sitios, ya que es un agente que puede producir infecciones sistémicas.

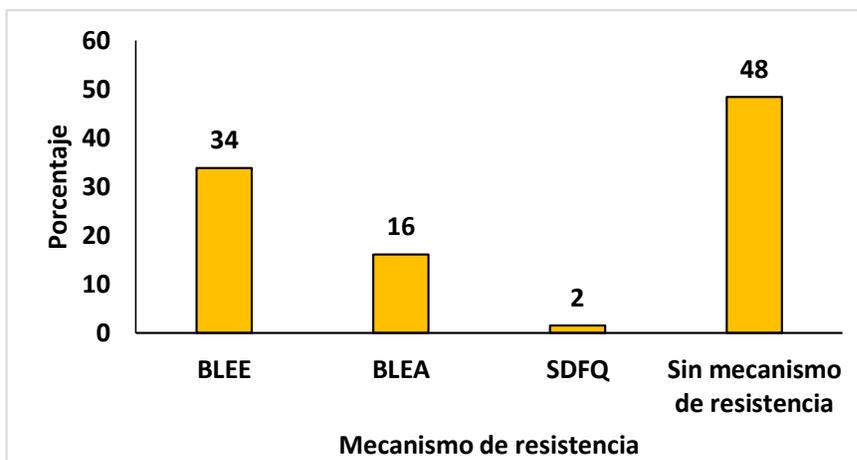
4.2. Mecanismos de resistencia de E. Coli según antibióticos más frecuentes y su relación con la edad y sexo de los pacientes

Tabla 5. Resistencia de E. Coli según mecanismo de resistencia hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 – 2017

Mecanismo de resistencia	Frecuencia	Porcentaje
BLEE	65	33,9
BLEA	31	16,1
SDFQ	3	1,6
Sin mecanismo de resistencia	93	48,4
Total	192	100,0

BLEE. Beta Lactamasa de espectro extendido
 BLEA. Beta Lactamasa de espectro ampliado
 SDFQ. Sensibilidad Disminuida a Fluoroquinolonas
 Fuente: Elaboración propia

Gráfico 5. Resistencia de E. Coli según mecanismo de resistencia hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 – 2017 (N=192)



Fuente: Elaboración propia

Del total de casos estudiados se puede observar que un 34 % son de E. Coli resistentes mediante beta lactamasas de espectro extendido, un 16 % para

espectro ampliado, solo un 2 % mostraron resistencia mediante sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas. Y Existe por lo tanto un 48 % de casos en los que no existe ninguno de estos mecanismos de resistencia. Se puede deducir también que la proporción de casos con alguno de estos mecanismos de resistencia es del 52 %

En Lima Perú el año 2016 se publica un estudio sobre la caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios. la frecuencia de *E. coli* productores de BLEE fue de 16,3%; siendo el gen tipo blaCTX-M el más frecuente, información valiosa para orientar la terapia antimicrobiana empírica, (26) esta frecuencia es mucho menor que la encontrada en la tesis.

Tabla 6. Resistencia de E. Coli según antibiótico hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 – 2017 (N=)

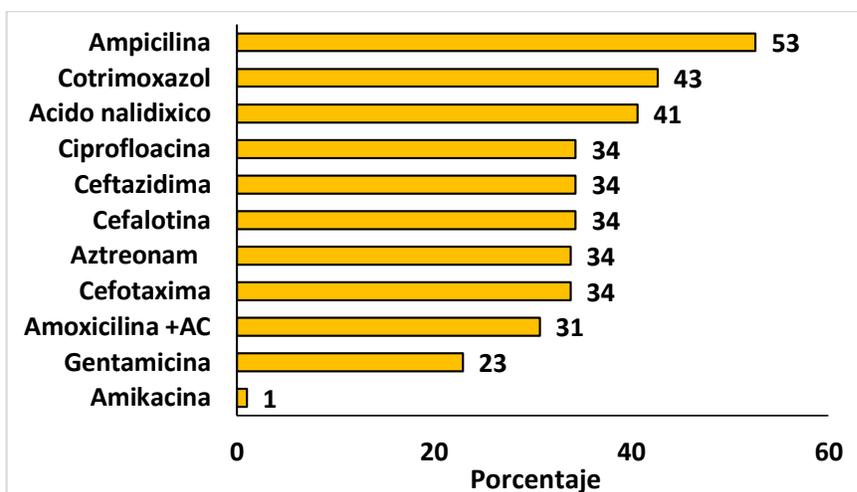
Antibiótico	Con algún mecanismo de resistencia	Sin mecanismo de resistencia
Ampicilina	52,6	47,4
Cotrimoxazol	42,7	57,3
Ácido nalidixico	40,6	59,4
Cefalotina	34,4	65,6
Ceftazidima	34,4	65,6
Ciprofloxacina	34,4	65,6
Cefotaxima	33,9	66,1
Aztreonam	33,9	66,1
Amoxicilina + AC	30,7	69,3
Gentamicina	22,9	77,1
Amikacina	1,0	99,0

Fuente: Elaboración propia

En la distribución de casos según resistencia a los diferentes antibióticos estudiados se observa que los antibióticos a los que *E. Coli* tiene mayor resistencia son la ampicilina, el Cotrimoxazol y el ácido nalidixico con 52,6 %, 42,7 % y 40,6 %. En el estudio de Perú sobre *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios. Igualmente

se reporta que la ampicilina es el antibiótico con mayor resistencia aunque en este estudio es del 100 %, (26)

Gráfico 6. Resistencia de E. Coli según antibiótico hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 – 2017 (N=192)



Fuente: Elaboración propia

Se observa que el antibiótico al que se tiene una mayor proporción de casos con resistencia es la ampicilina con 53 % le sigue en orden de frecuencia el Cotrimoxazol y al ácido nalidixico con el 41 % y el 41 % respectivamente.

Tabla 7. E. Coli según resistencia por β Lactamasas y sexo hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 – 2017

Sexo	β Lactamasa		Total	% de Resistencia
	(+)	(-)		
Femenino	80	56	136	59
Masculino	16	40	56	29
Total	96	96	192	50

Chi² = 14,5 (p = 0,0001) OR = 3,57 (IC: 1,82 – 7,00)

Fuente: Elaboración propia

En cuanto a la resistencia por beta lactamasas (de espectro extendido y ampliado) en relación al sexo biológico se observa que este tipo de resistencia es mayor, casi el doble, en mujeres que en varones, ya que de 136 mujeres

valoradas 80 presentaron resistencia por Betalactamasas lo que representa un 59 %, en tanto que de 56 hombres valorados solo 16 presentaron este tipo de resistencia haciendo solo un 29 %, estas diferencias han sido estadísticamente significativas y se puede evidenciar que las mujeres tienen 4 veces más de riesgo de desarrollar resistencia de E. Coli por Betalactamasas que los hombres ($p < 0,05$), lo que también incrementa el riesgo de que el sexo femenino tiene 4 veces más de adquirir la bacteria portadora del gen MCR-1

Tabla 8. E. Coli según resistencia por β Lactamasas y edad hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 – 2017

Edad	β Lactamasa		Total	% de Resistencia
	(+)	(-)		
≥ 40 años	30	13	43	70
< 40 años	66	83	149	44
Total	96	96	192	50

$\text{Chi}^2 = 8,66$ ($p = 0,003$) OR = 2,90 (IC: 1,40 – 6,00)

Fuente: Elaboración propia

Respecto a la resistencia en cuanto a la edad se puede evidenciar que este tipo de resistencia es mayor, también casi el doble, en pacientes mayores de 40 años, con un 70 %, en tanto que la resistencia por Betalactamasas en menores de 40 años es solo de un 44 %, estas diferencias también han sido estadísticamente significativas y el análisis de riesgo los pacientes mayores de 40 años tienen 3 veces más de riesgo de desarrollar resistencia de E. Coli por Betalactamasas que los menores de esta edad. ($p < 0,05$).

En un estudio publicado en Lima Perú el año 2017, se informa que los factores asociados a la presentación de infecciones urinarias por E. coli BLEE encontrados en el estudio fueron sexo masculino (OR 5,13 - IC 95% 2,37 – 11,07), edad mayor a 45 años (OR 2,65 - IC 95% 1,61 – 4,38) (27) es diferente en cuanto al sexo y similar en cuanto a la edad. Es decir, en nuestro estudio se ha encontrado una mayor frecuencia de resistencia en el sexo femenino que en el masculino con un OR de 3,57 lo cual implica que las mujeres tienen 3,57 veces más de riesgo que los varones de presentar infecciones por E. Coli

resistente. En cuanto a la edad se observa que nuestros resultados son similares ya que en nuestros resultados también los mayores de 40 años presentan un mayor riesgo.

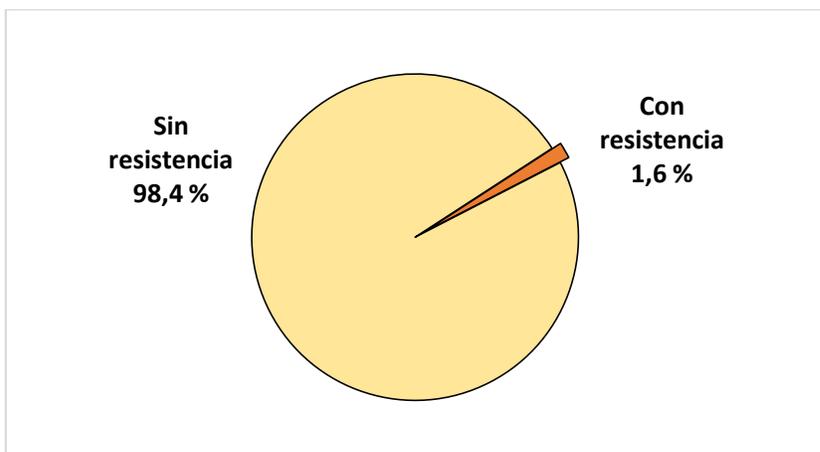
4.3. Frecuencia del gen MCR-1 en cepas de Escherichia coli y las características epidemiológicas de los pacientes infectados

Tabla 9. E. Frecuencia de resistencia a Colistina por Gen mcr-1 hospital San Martin de Porres Trópico de Cochabamba 2014 – 2017

Mecanismo de resistencia a colistina MCR-1	Frecuencia	Porcentaje
Con resistencia	3	1,6
Sin resistencia	189	98,4
Total	192	100,0

Fuente: Elaboración propia

Gráfico 7. Frecuencia de resistencia de E. Coli a Colistina por Gen mcr-1 hospital San Martin de Porres Trópico de Cochabamba 2014 – 2017 (N=192)



Fuente: Elaboración propia

De 192 muestras procesadas en 3 de ellas se identificó a Escherichia Coli resistente por presencia del Gen mcr-1, lo que representa el 1,6 %

Un estudio sobre la resistencia plasmídica a colistin por el gen *mcr-1* en Enterobacteriaceae en Paraguay informa que de 150 cepas con resistencia a colistina, en 7 de ellas se confirmó la portación del gen *mcr-1* (4,7 %). De las 7 cepas confirmadas para el gen *mcr-1*, 3 correspondieron a *Klebsiella pneumoniae* (kpn), 3 a *Escherichiacoli* (eco) y 1 a *Salmonella Schwarzengrund* (17) tomando en cuenta solo a la E. Coli los resultados en nuestro medio son menores a los de Paraguay

Tabla 10. Mecanismos de resistencia que acompañan a la resistencia de la E Coli a la colistina hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 – 2017 (N=192)

Caso	Edad	Mecanismo de resistencia		
		BLEE	BLEA	SDFQ
1	3,0	+	+	-
2	68,0	+	+	-
3	0,7	-	-	-

BLEE. Beta Lactamasa de espectro extendido
 BLEA. Beta Lactamasa de espectro ampliado
 SDFQ. Sensibilidad Disminuida a Fluoroquinolonas
 Fuente: Elaboración propia

De los tres casos positivos a E. Coli resistente a colistina en dos se presenta además resistencia por Betalactamasas de espectro extendido, y son los dos pacientes de mayor edad uno de 3 años y el otro de 68 años, en tanto que el paciente menor de 1 años no presenta ningún tipo de resistencia. Ninguno a presentado además de la resistencia a la colistina, sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas.

El análisis posterior realizando en el laboratorio de Resistencia Bacteriana y alternativas terapéuticas de la Universidad de São paulo-Brasil, las muestras que presentaron el nuevo mecanismo de resistencia a la colistina MCR-1, fueron sometidos a la determinación de concentración inhibitoria mínima por el método de Micro dilución en caldo por duplicado los mismos que nos dieron

resultados de 4 µg/ml demostrando que estas tres cepas portaban la resistencia a colistin así mismo la PCR y secuenciamiento del genoma completo, demostraron la presencia del gen MCR-1. Añexo 4

Tabla 11. Frecuencia de resistencia a Colistina por el Gen mcr-1 Hospital San Martín de Porres Trópico de Cochabamba 2014 – 2017 (N=192)

Nº de caso	Sexo	Edad	Año	Tipo de muestra
1	Masculino	3,0	2016	Trasudado pos operatorio de muslo
2	Masculino	68,0	2017	Secreción de pared
3	Masculino	0,7	2017	heces fecales

Fuente: Elaboración propia

Los tres casos positivos de *E. Coli* resistente plasmidica a la colistina son del sexo masculino. En cuanto a la variable tiempo, el primer caso de tres años de edad se presentó en el año 2016, y en el siguiente año se presentaron los siguientes dos casos de 68 años y uno menor de 1 año. Finalmente se evidenció que el tipo de muestra para los casos de mayor edad no fueron provenientes ni de orina ni de heces fecales ya que para el paciente de 68 años fue de trasudado pos operatoria secreción de pared, y para el de 3 años trasudado pos operatorio de muslo. En tanto que para el menor de 1 año se aisló de una muestra de heces fecales sin portar ningún mecanismo de resistencia a betalactamicos. En cambio, los pacientes de 68 y 3 años respondieron a carbapenemicos ya que portaban además la betalactamasa de espectro extendido, teniendo una evolución favorable en el tratamiento.

En Italia un estudio describe tres casos de infecciones del torrente sanguíneo por *Escherichia coli* resistentes a colistina con positivas al gen mcr -1, de agosto de 2016 a enero de 2017. En este estudio se afirma que los tres casos no presentan vínculos epidemiológicos claros por lo que se puede asumir que existe la probabilidad de varias cepas de *E Coli* resistente a colistin que no se

registran (20) porque no se está buscando este mecanismo de resistencia en los laboratorios clínicos.

5. CAPÍTULO: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Todos los grupos etarios son susceptibles a infecciones por E. Coli Sin embargo el riesgo es mayor en los menores de 10 años de edad y en las mujeres.
- La resistencia a los antibióticos de uso frecuente es alta y la mayor proporción según mecanismo de resistencia está ocupada por las Betalactamasas de espectro extendido.
- Existe relación estadísticamente significativa entre la resistencia de E. Coli por Betalactamasas con la edad y el sexo, siendo más frecuente en mujeres y en mayores de 40 años.
- Las mujeres tienen 4 veces más de riesgo de resistencia de E. Coli por Betalactamasa que los hombres ($p < 0,05$) y los pacientes de 40 y más años tienen 3 veces más de riesgo de desarrollarla que los menores de 40 años ($p < 0,05$)
- Se ha demostrado la presencia del gen *mcr – 1* en E. Coli y por lo tanto su circulación en nuestro país.
- Algunos nexos epidemiológicos no están claros para los tres casos de infección por E. Coli con resistencia a la Colistina, por lo que se puede asumir que es probable un subregistro importante en la población por la probabilidad de la presencia de diferentes cepas resistentes a la colistina.
- Destaca la importancia de la diseminación horizontal de la resistencia a la colistina por E. Coli mediante plásmidos con gen *mcr-1* que no llevan implícita resistencia a otros antibióticos, como los β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas.

5.2. Recomendaciones

- Es necesario conocer la prevalencia de este mecanismo plasmidial de resistencia en nuestro medio, para lo cual se recomienda estudiar este gen y las variantes de mcr en todos los aislados clínicos de bacilos gran negativos resistentes a colistín
- Proponer sistemas de vigilancia epidemiológica multidisciplinaria, asumiendo que la resistencia a los antimicrobianos en humanos está probablemente conectada a la de los animales y al medio ambiente con lo cual se puede incrementar la capacidad de respuesta epidemiológica
- Promover el continuo lavado de manos y uso adecuado de los EPP (elementos de protección personal)
- Promover la toma de hisopado anal en pacientes que se internan en los servicios de segundo y tercer nivel para proveer la diseminación en los servicios del gen MCR-1
- Promover la organización de servicios en salud para el cumplimiento de normas con el fin de disminuir la prescripción inadecuada de antimicrobianos
- Proponer tomando en cuenta la alta reproductibilidad de los resultados obtenidos con las dos metodologías en los ensayos aplicar las dos metodologías fenotípicas con la finalidad de identificar el nuevo mecanismo de resistencia a la colistina MCR-1, para que su uso sea posible en los laboratorios de microbiología como práctica diaria en busca del gen MCR-1.
- Realizar un seguimiento y vigilancia a los casos positivos para el gen MCR-1 con el fin de contar con información epidemiológica más completa

Bibliografía

1. Camou T, Zunino P, Hortal M, Camou T, Zunino P, Hortal M. Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Rev Médica Urug* [Internet]. diciembre de 2017 [citado 3 de octubre de 2018];33(4):104-27. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1688-03902017000400104&lng=es&nrm=iso&tlng=es
2. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, 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*. febrero de 2016;16(2):161-8.
3. Quiñones Pérez D. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque «Una salud». *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. diciembre de 2017 [citado 29 de septiembre de 2018];69(3):1-17. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602017000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
4. OMS | Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo [Internet]. WHO. [citado 29 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>
5. Wang Y, Tian G-B, 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* [Internet]. 1 de abril de 2017 [citado 29 de septiembre de 2018];17(4):390-9. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(16\)30527-8/abstract](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(16)30527-8/abstract)
6. Quan J, Li X, Chen Y, Jiang Y, Zhou Z, Zhang H, et al. Prevalence of mcr-1 in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* recovered from bloodstream infections in China: a multicentre longitudinal study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 1 de abril de 2017 [citado 29 de septiembre de 2018];17(4):400-10. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(16\)30528-X/abstract](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(16)30528-X/abstract)
7. Brooks GF, Morse SA, Carrol KC, Mietzner TA, Butel JS. *Microbiología médica*. 25.^a ed. Vol. 1. España: Mc Graw Hill; 2010. 213-226 p.
8. Murray Rosenthal P. *Microbiología Médica*. 7.^a ed. Vol. 1. Barcelona España: ELSEVIER; 2014. 261 p.
9. Quiñones Pérez D. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque «Una salud». *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. diciembre de 2017 [citado 30 de septiembre de 2018];69(3):1-17.

- Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602017000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
10. Cernadas C, M J. La indicación inadecuada e innecesaria de antibióticos: un problema creciente. Arch Argent Pediatr [Internet]. enero de 2015 [citado 18 de febrero de 2018];113(1):2-3. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0325-00752015000100001&lng=es&nrm=iso&tlng=en
 11. Escalona M, Luis J, Leyva Toppes M, Heredia C, Enrique J. Infección del tracto urinario y resistencia antimicrobiana en la comunidad. Rev Cuba Med Gen Integral [Internet]. marzo de 2015 [citado 18 de febrero de 2018];31(1):78-84. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0864-21252015000100011&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 12. Southwick FS. Enfermedades infecciosas. 2.^a ed. Vol. 1. Mexico: Mc Graw Hill; 2009. 3-56 p.
 13. Bennett J, Dolin R, Blaser MJ. Enfermedades infecciosas principios y practica. 8.^a ed. Vol. 1. España: ELSEVIER Sonders; 2016. 257-273 p.
 14. Esposito F, Fernandes MR, Lopes R, Muñoz M, Sabino CP, Cunha MP, et al. Detection of Colistin-Resistant MCR-1-Positive Escherichia coli by Use of Assays Based on Inhibition by EDTA and Zeta Potential. J Clin Microbiol [Internet]. 1 de diciembre de 2017 [citado 3 de diciembre de 2018];55(12):3454-65. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/55/12/3454>
 15. Boletín informativo N° 5 2017 DESAFIOS EN LOS METODOS DE VALUACION DE LA SENSIBILIDAD A LAS POLIMIXINAS. [Internet]. [citado 3 de diciembre de 2018]. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/category/boletin/>
 16. Método de predifusión con Tabletas Rosco-Neosensitabs. Servicio Antimicrobianos, Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.
 17. Melgarejo TN, Martínez M, Franco R, Falcón M. Resistencia plasmídica a colistin por el gen mcr-1 en Enterobacteriaceae en Paraguay | Touchet | Revista Salud Pública del Paraguay. Rev Salud Pública Parag [Internet]. 2018 [citado 4 de octubre de 2018];8(1). Disponible en: <http://www.ins.gov.py/revistas/index.php/rspp/article/view/507>
 18. Legarraga P, Wozniak A, Prado S, Estrella L, García P. Primera comunicación en Chile de la detección del gen mcr-1 en un aislado clínico de Escherichia coli resistente a colistín. Rev Chil Infectol [Internet]. 17 de septiembre de 2018 [citado 4 de octubre de 2018];35(4). Disponible en: <http://www.revinf.cl/index.php/revinf/article/view/183>
 19. McGann P, Snesrud E, Maybank R, Corey B, Ong AC, Clifford R, et al. Escherichia coli Harboring mcr-1 and blaCTX-M on a Novel IncF Plasmid: First Report of mcr-1 in the United States. Antimicrob Agents Chemother

- [Internet]. 1 de julio de 2016 [citado 19 de septiembre de 2018];60(7):4420-1. Disponible en: <https://aac.asm.org/content/60/7/4420>
20. Corbella M, Mariani B, Ferrari C, Comandatore F, Scaltriti E, Marone P, et al. Three cases of mcr-1-positive colistin-resistant *Escherichia coli* bloodstream infections in Italy, August 2016 to January 2017. *Eurosurveillance* [Internet]. 20 de abril de 2017 [citado 3 de octubre de 2018];22(16). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5404483/>
 21. Blanco MA, Pérez MG, Pellegrino P, Ochoa M, Hernández C, Venuta ME. Primer aislamiento con resistencia transferible a colistina mediada por el gen MCR-1 en el Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan. *Med Infant* [Internet]. 2016;12 [citado 5 de octubre de 2018];23(4):313-5. Disponible en: http://www.medicinainfantil.org.ar/images/stories/volumen/2016/xxiii_4_3_13.pdf
 22. Dalmolin TV, Castro L, Mayer FQ, Zavascki AP, Martins AF, Lima-Morales D de, et al. Co-occurrence of mcr-1 and blaKPC-2 in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1 de agosto de 2017 [citado 5 de octubre de 2018];72(8):2404-6. Disponible en: <https://academic.oup.com/jac/article/72/8/2404/3827872>
 23. Sonnevend Á, Ghazawi A, Alqahtani M, Shibl A, Jamal W, Hashmey R, et al. Plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* from the Arabian Peninsula. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. septiembre de 2016;50:85-90.
 24. Kim YA, Yong D, Jeong SH, Lee K. Colistin Resistance in *Escherichia coli* Isolates From Patients With Bloodstream Infection in Korea. *Ann Lab Med* [Internet]. marzo de 2017 [citado 5 de octubre de 2018];37(2):172-3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5203999/>
 25. Al MP et. *mcr-1*—Positive Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Traveler Returning to Canada from China - Volume 22, Number 9—September 2016 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC*. *Emerg Infect Dis J* [Internet]. [citado 5 de octubre de 2018]; Disponible en: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/9/16-0177_article
 26. Galván F, Agapito J, Bravo N, Lagos J, Tamariz J. Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Rev Medica Hered* [Internet]. enero de 2016 [citado 5 de octubre de 2018];27(1):22-9. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1018-130X2016000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 27. Calle Núñez A, Campos C, Antonio K, Estrella R, Alonso D, Zevallos C, et al. Factores asociados a la presentación de infecciones urinarias por *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Rev Medica Hered* [Internet]. julio de 2017 [citado 5 de octubre de 2018];28(3):142-9. Disponible en:

- http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1018-130X2017000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
28. Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio MDP. Metodología de la investigación. 6.^a ed. Vol. 1. México: Mc Graw Hill; 2014. 118-169 p.
 29. Pineda EB, Alvarado EL, Canales FH. Metodología de la investigación OMS [Internet]. 2.^a ed. Washington DC E.U.A.: PALTEX - OPS; 1994 [citado 18 de febrero de 2017]. 94 p. Disponible en: <http://187.191.86.244/rceis/registro/Metodologia%20de%20la%20Investigacion%20Manual%20para%20el%20Desarrollo%20de%20Personal%20de%20Salud.pdf>
 30. Pastor-Barriuso R. Bioestadística. Vol. 1. Madrid, España: CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA – Instituto de Salud Carlos III; 2012. 41-2 p.
 31. Jimenes Paneque R. Metodología de la investigación, elementos básicos para la investigación clínica. Vol. 1. Habana Cuba: Representación en Cuba de la Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud; 1998. 43-50 p.
 32. Fathalla MF, Fathalla MMF. Guía práctica de investigación en salud. 1.^a ed. Washington DC E.U.A.: Organización Panamericana de la Salud; 2008. 45-8 p. (Publicación Científica y Técnica; vol. 1).
 33. Elena Sinobas p, García Padilla F, García Piqueras L, Gómez González J, González de Aro MD, González Pisano AC, et al. Manual de investigación cuantitativa para enfermería. 1.^a ed. Vol. 1. España: Cízero Digital; 2011. 44-8 p.
 34. Argimon Pallás J, Jiménez Villa J. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 4.^a ed. Vol. 1. España; 2013.
 35. Daniel Wayne W. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 5.^a ed. Vol. 1. México: Limusa; 2002. 3-390 p.
 36. Castillo Salgado C, Mujica OJ, Loyoloa E, Canela J. Módulo de Principios de Epidemiología para el Control de Enfermedades (MOPECE). 2.^a ed. Washington D.C. E.U.A.; 59-77 p. (Organización Panamericana de la Salud CONTROL - Enfermedades; vol. 3 Medición de las condiciones de salud y enfermedad en la población).
 37. Williams JR. Manual de ética médica. 3.^a ed. Vol. 1. Francia: Asociación Médica Mundial; 2015. 95-110 p.
 38. Seija V, Frantchez V, Pintos M, Bataglino MN, Torales M, Díaz Á, et al. Etiología de la infección urinaria de adquisición comunitaria y perfil de susceptibilidad de Escherichia coli a los principales agentes antimicrobianos. Rev Médica Urug [Internet]. marzo de 2010 [citado 5 de octubre de 2018];26(1):14-24. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1688-03902010000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Anexo 1.

Ficha de recolección de datos y códigos para tabulación Ficha de recolección de datos

ITEMS	INSTRUCCIONES / CODIGOS
Nº	Número correlativo de registros
ID	Código asignado para cada paciente
SEXO	1. Masculino 2. Femenino
EDAD	Anotar la edad en años cumplidos
AÑO	Anotar el año de registro en laboratorio
TIPO DE MUESTRA	1. Heces fecales 2. Orina 3. Herida de piel 4. Líquido cavidad abdominal 5. Líquido peritoneal 6. Secreción apendicitis 7. Secreción de pared 8. Secreción de glúteo 9. Secreción pie diabético 10. Tejido necrótico perianal 11. Trasudado pos operatorio muslo 12. Sepsis
PASTILLA DE COLISTIN	Anotar en mm el halo de inhibición
COL mm	Anotar en mm el halo de inhibición de Colistina
COL+EDTA mm	Anotar en mm el halo de inhibición de colistina más EDTA
DIFERENCIA mm	Anotar en mm la diferencia entre el halo de inhibición de colistina más EDTA y el halo de inhibición de colistina sola
Mecanismo de resistencia a Colistina	1. Presencia resistencia MCR-1 2. Ausente
Ácido nalidixico	1. BLEA 2. BLEE 3. Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas 4. Sin mecanismo de resistencia
ciprofloacino	1. BLEA 2. BLEE 3. Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas 4. Sin mecanismo de resistencia

ITEMS	INSTRUCCIONES / CODIGOS
gentamicina	<ol style="list-style-type: none"> 1. BLEA 2. BLEE 3. Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas 4. Sin mecanismo de resistencia
cotrimoxazol	<ol style="list-style-type: none"> 1. BLEA 2. BLEE 3. Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas 4. Sin mecanismo de resistencia
ampicilina	<ol style="list-style-type: none"> 1. BLEA 2. BLEE 3. Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas 4. Sin mecanismo de resistencia
amoxicilina más ácido clavulánico	<ol style="list-style-type: none"> 1. BLEA 2. BLEE 3. Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas 4. Sin mecanismo de resistencia
cafolotina	<ol style="list-style-type: none"> 1. BLEA 2. BLEE 3. Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas 4. Sin mecanismo de resistencia
cefotaxima	<ol style="list-style-type: none"> 1. BLEA 2. BLEE 3. Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas 4. Sin mecanismo de resistencia
ceftazidima	<ol style="list-style-type: none"> 1. BLEA 2. BLEE 3. Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas 4. Sin mecanismo de resistencia
aztreonam	<ol style="list-style-type: none"> 1. BLEA 2. BLEE 3. Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas 4. Sin mecanismo de resistencia
amikacina	<ol style="list-style-type: none"> 1. BLEA 2. BLEE 3. Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas 4. Sin mecanismo de resistencia

Nº	ID	SEXO	EDAD	AÑO	TIPO DE MUESTRA	PASTILLA DE COLISTIN	COL mm	COL+EDTA mm	DIFERENCIA	MECANISMO DE RESISTENCIA A COLISTINA	Nal	Cip	Gn	SXT	AMP	AMC	CF	CTX	CTZ	ATM	AMK
21	IB-36	1	3,0	2016	11	0,0	10,0	14,0	4,0	1	2	4	4	2	2	2	2	2	2	2	4
22	IB-52	2	54,0	2016	2	22,0	13,0	14,0	1,0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
23	IB-60	2	46,0	2016	2	26,5	14,5	15,0	0,5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
24	IB-62	2	47,0	2016	2	25,0	14,0	14,5	0,5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
25	IB-63	2	5,0	2016	2	27,0	15,0	15,5	0,5	2	2	4	2	2	2	2	2	2	2	2	4
26	IB-64	2	63,0	2016	2	24,5	14,0	14,5	0,5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
27	R-40	2	35,0	2017	2	25,0	15,0	15,5	0,5	2	2	2	4	2	2	2	2	2	2	2	4
28	R-43	2	27,0	2017	2	23,0	13,5	14,0	0,5	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
29	R-43a	2	27,0	2017	2	22,0	14,0	15,0	1,0	2	2	4	2	2	2	2	2	2	2	2	4
30	R-44	2	6,0	2017	2	23,5	14,0	14,5	0,5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
31	R-45	2	0,8	2017	2	22,0	14,0	14,5	0,5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
32	R-27	1	76,0	2017	2	25,0	13,5	14,5	1,0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
33	R-35	2	3,0	2017	2	25,0	14,5	15,0	0,5	2	1	4	4	1	1	4	4	4	4	4	4
34	R-31	2	1,3	2017	2	24,0	14,0	15,5	1,5	2	1	4	4	1	1	4	4	4	4	4	4
35	R-37	2	9,0	2017	2	26,0	14,0	14,5	0,5	2	1	4	4	1	1	4	4	4	4	4	4
36	R-38	2	37,0	2017	2	25,0	14,0	14,4	0,4	2	1	1	4	1	1	4	4	4	4	4	4
37	R-39	2	0,8	2017	2	24,5	14,0	14,5	0,5	2	1	4	4	1	1	4	4	4	4	4	4
38	R-41	2	1,5	2017	2	24,5	14,1	15,1	1,0	2	2	4	2	2	2	2	2	2	2	2	4
39	R-42	2	12,0	2017	6	25,0	14,0	15,0	1,0	2	4	4	4	1	1	4	4	4	4	4	4
40	R-46	2	37,0	2017	2	25,0	14,5	15,5	1,0	2	4	4	4	1	1	4	4	4	4	4	4
41	R-12	1	1,0	2017	1	28,0	14,0	14,5	0,5	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
42	R-16	2	7,0	2017	2	28,5	14,0	15,0	1,0	2	2	4	4	4	2	2	2	2	2	2	4
43	R-17	2	5,0	2017	2	26,0	14,5	15,0	0,5	2	2	4	2	2	4	2	2	2	2	2	4

Nº	ID	SEXO	EDAD	AÑO	TIPO DE MUESTRA	PASTILLA DE COLISTIN	COL mm	COL+EDTA mm	DIFERENCIA	MECANISMO DE RESISTENCIA A COLISTINA	Nal	Cip	Gn	SXT	AMP	AMC	CF	CTX	CTZ	ATM	AMK
44	R-18	2	19,0	2017	2	28,0	14,0	14,5	0,5	2	4	4	4	4	1	4	4	4	4	4	4
45	R-20a	2	1,2	2017	2	26,0	14,5	15,5	1,0	2	1	4	4	1	1	4	4	4	4	4	4
46	R-20b	2	2,0	2017	8	27,0	14,0	14,5	0,5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
47	R-22	2	87,0	2017	2	26,0	14,0	15,0	1,0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
48	R-23	2	9,0	2017	2	28,0	14,0	15,0	1,0	2	4	4	4	4	1	4	4	4	4	4	4
49	R-24	1	0,8	2017	1	27,0	13,5	14,5	1,0	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
50	R-25	2	39,0	2017	2	26,0	14,0	14,5	0,5	2	4	4	4	4	1	1	4	4	4	4	4
51	R-26	2	1,0	2017	1	26,5	13,5	14,5	1,0	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
52	R-29	2	30,0	2017	2	26,0	13,5	14,0	0,5	2	1	1	4	4	1	4	4	4	4	4	4
53	R-30	2	20,0	2017	4	27,0	13,0	14,0	1,0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
54	R-31	2	38,0	2017	2	26,5	13,5	14,5	1,0	2	1	1	4	1	1	4	4	4	4	4	4
55	R-20f	2	1,2	2017	2	27,0	14,0	14,5	0,5	2	1	1	4	1	1	4	4	4	4	4	4
56	MLT	1	68,0	2017	7	8,5	12,0	15,0	3,0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
57	IB-51	2	0,8	2017	2	24,0	14,0	15,0	1,0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
58	R-1	1	16,0	2017	1	25,0	13,0	14,0	1,0	2	4	4	4	1	1	4	4	4	4	4	4
59	R-2	2	70,0	2017	1	25,5	13,0	14,0	1,0	2	1	4	4	1	1	4	4	4	4	4	4
60	R-3	1	0,7	2017	1	0,0	10,0	13,0	3,0	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
61	R-4	1	0,4	2017	1	23,5	13,5	14,0	0,5	2	4	4	4	4	1	4	4	4	4	4	4
62	R-5	1	17,0	2017	1	25,0	13,5	14,0	0,5	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
63	R-6	2	30,0	2017	1	24,0	11,5	13,0	2,5	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
64	R-7	1	0,9	2017	1	25,0	13,5	14,0	0,5	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
65	R-8	1	1,0	2017	1	22,0	14,0	14,5	0,5	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
66	R-9	2	3,0	2017	1	22,5	14,5	15,0	0,5	2	1	4	4	1	1	4	4	4	4	4	4

Nº	ID	SEXO	EDAD	AÑO	TIPO DE MUESTRA	PASTILLA DE COLISTIN	COL mm	COL+EDTA mm	DIFERENCIA	MECANISMO DE RESISTENCIA A COLISTINA	NaI	Cip	Gn	SXT	AMP	AMC	CF	CTX	CTZ	ATM	AMK	
182	1776 MLT	1	9,0	2017	2	26,0	13,0	14,0	1,0	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
183	1775 MLT	2	2,0	2017	3	25,0	12,5	13,0	0,5	2	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
184	1777 MLT	2	5,0	2017	2	24,0	12,0	13,0	1,0	2	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
185	1778 MLT	2	35,0	2017	2	26,0	12,0	12,5	0,5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
186	1868 MLT	2	61,0	2017	2	28,0	13,0	13,5	0,5	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
187	1878 MLT	1	73,0	2017	2	26,0	11,5	12,0	0,5	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
188	1964 MLT	1	70,0	2017	2	25,0	12,0	13,0	1,0	2	4	4	4	1	1	4	4	4	4	4	4	4
189	2018 MLT	2	21,0	2017	2	24,0	13,0	14,0	1,0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
190	IB-1	1	30,0	2017	3	25,0	12,5	13,0	0,5	2	2	2	4	2	2	4	2	2	2	2	2	4
191	IB-3	2	4,8	2017	2	23,0	12,0	13,0	1,0	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
192	IB-13	2	70,0	2017	2	25,0	12,0	14,0	2,0	2	1	1	1	1	1	4	4	4	4	4	4	4

Anexo 3.

Datos desagregados

Ácido nalidixico	Frecuencia	Porcentaje
BLEA	15	7,8
BLEE	60	31,3
Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas	3	1,6
Sin mecanismo de resistencia	114	59,4
Total	192	100,0

Ciprofloxcina	Frecuencia	Porcentaje
BLEA	7	3,6
BLEE	56	29,2
Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas	3	1,6
Sin mecanismo de resistencia	126	65,6
Total	192	100,0

Gentamicina	Frecuencia	Porcentaje
BLEA	4	2,1
BLEE	40	20,8
Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas	0	0,0
Sin mecanismo de resistencia	148	77,1
Total	192	100,0

Cotrimoxazol	Frecuencia	Porcentaje
BLEA	30	15,6
BLEE	52	27,1
Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas	0	0,0
Sin mecanismo de resistencia	110	57,3
Total	192	100,0

Ampicilina	Frecuencia	Porcentaje
BLEA	36	18,8
BLEE	65	33,9
Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas	0	0,0
Sin mecanismo de resistencia	91	47,4
Total	192	100,0

Amoxicilina más ácido clavulánico	Frecuencia	Porcentaje
BLEA	7	3,6
BLEE	52	27,1
Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas	0	0,0
Sin mecanismo de resistencia	133	69,3
Total	192	100,0

Cefalotina	Frecuencia	Porcentaje
BLEA	1	,5
BLEE	65	33,9
Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas	0	0,0
Sin mecanismo de resistencia	126	65,6
Total	192	100,0

Cefotaxima	Frecuencia	Porcentaje
BLEA	0	,0
BLEE	65	33,9
Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas	0	0,0
Sin mecanismo de resistencia	127	66,1
Total	192	100,0

Ceftazidima	Frecuencia	Porcentaje
BLEA	1	,5
BLEE	65	33,9
Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas	0	0,0
Sin mecanismo de resistencia	126	65,6
Total	192	100,0

Aztreonam	Frecuencia	Porcentaje
BLEA	0	,0
BLEE	65	33,9
Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas	0	0,0
Sin mecanismo de resistencia	127	66,1
Total	192	100,0

Amikacina	Frecuencia	Porcentaje
BLEA	0	,0
BLEE	2	1,0
Sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas	0	0,0

Sin mecanismo de resistencia	190	99,0
Total	192	100,0

Anexo 4.

RESULTADOS DE CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA

ID	Espécie	Tipo de muestra	Resistencia fenotípica	Resistencia Genotípica*PCR	Sanger*
MLT	<i>Escherichia coli</i>	Secreción de pared	ESBL	<i>bla</i> _{CTX-M}	+
				<i>bla</i> _{CTX-M-1}	+
				<i>mcr-1</i>	+
IB36	<i>Escherichia coli</i>	Trasudado Post operatório	ESBL	<i>bla</i> _{CTX-M}	+
				<i>bla</i> _{CTX-M-1}	+
				<i>bla</i> _{CTX-M-8}	+
				<i>mcr-1</i>	-
R-3	<i>Escherichia coli</i>	Heces fecales	-	<i>mcr-1</i>	-

LAS TRES CEPAS MCR-1

*Colistina (COL)

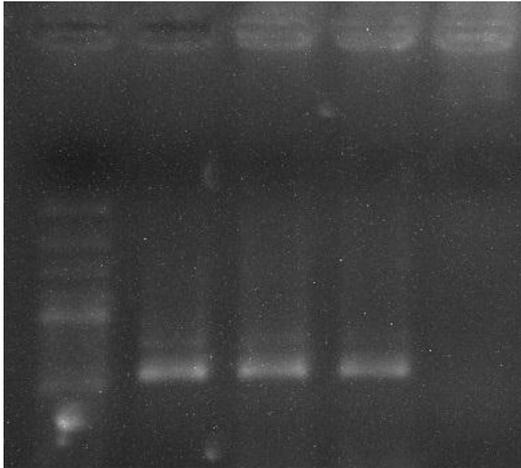
RESULTADOS DE CIM (µg/ml) POR MICRODILUCION EN CALDO, REALIZADO POR DUPLICADO.

Cepa	Espécie	COL 1 ^{ra}	COL 2 ^{da}
MLT	<i>Escherichia coli</i>	4	4
IB36	<i>Escherichia coli</i>	2	4
R-3	<i>Escherichia coli</i>	4	4
OPS 299	<i>Escherichia coli</i>	8	8 control positivo
ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>	0,25	0,5 control negativo

RESULTADOS GENOTIPIICOS

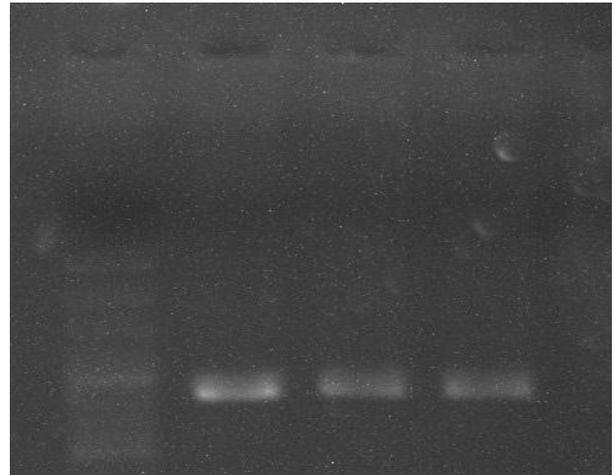
CTX-M

PM C+ IB36 MLT C-
C-



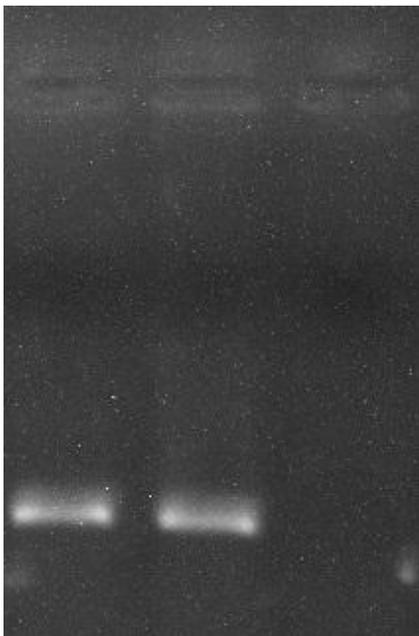
CTX-M1

PM C+ IB36 MLT



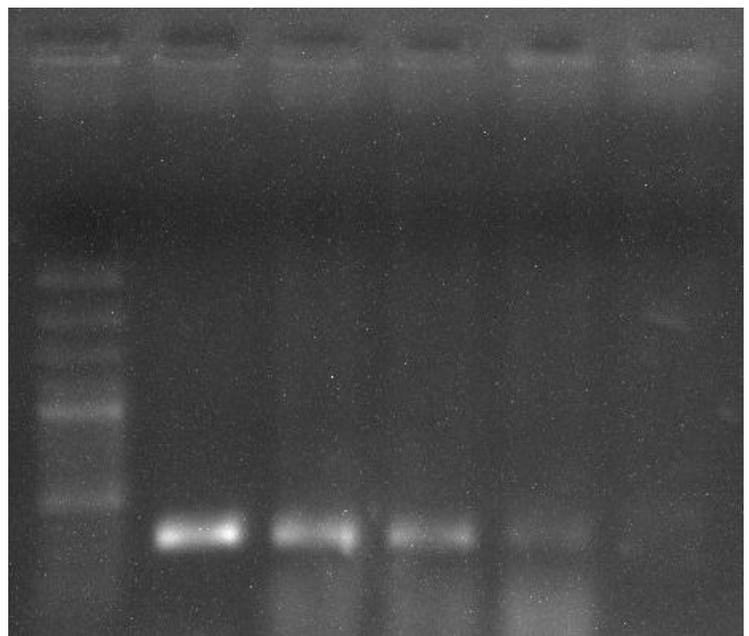
CTX-M-8

C+ IB36 C-



MCR-1

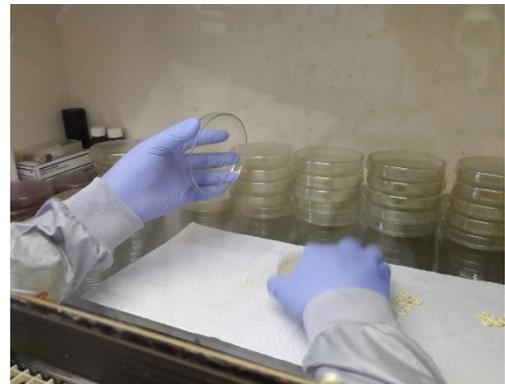
PM C+ IB36 MLT R-3 C-



Anexo 5.

REGISTRO GRÁFICO DE LABORATORIO

METODO DE PREDIFUSION

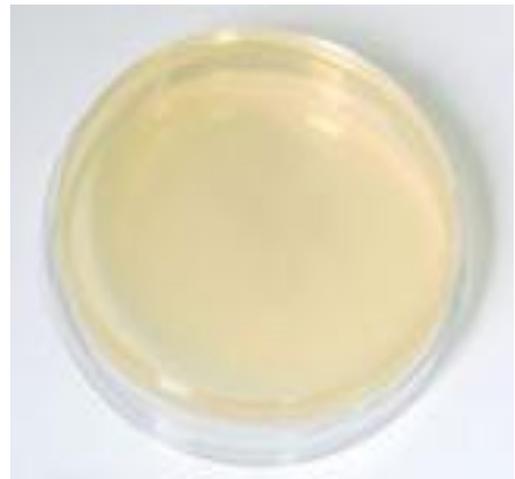


LECTURA

PREDIFUSION NEGATIVO

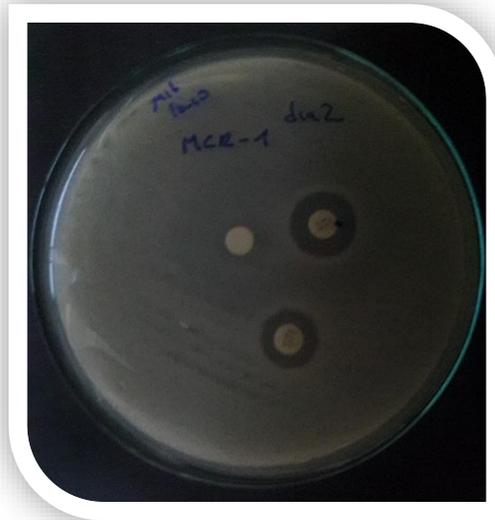


PREDIFUSION POSITIVO



METODO DEL DOBLE DISCO

MCR-1 POSITIVO



	Colistin-S <i>E. coli</i> ATCC 25922	Colistin-R MCR-1 <i>E. coli</i>
Colistin sin EDTA		
Colistin con EDTA		
Disco blanco con EDTA		

Anexo 6.

FORMULA PARA PREPARAR LA SOLUCION DE EDTA AL 0.1 M

En principio se deberá de contar con el reactivo sal de *Etilendiamino tetraacetico Disodium Salt (dihydrate)*.

De acuerdo a la fórmula de Molaridad que es:

$$\text{Molaridad: } \frac{\text{peso en gramos}}{\text{Peso molecular} \times \text{volumen}}$$

Se realiza los cálculos y se pesa 0.37224 g de EDTA en polvo, diluir con 10 ml de agua destilada, homogenizar y se tiene una solución de EDTA al 0.1M.

