



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DETECCIÓN DE MARCADORES FENOTÍPICOS DE  
RESISTENCIA EN BACTERIAS DEL GRUPO *ESKAPE*  
AISLADAS DE AGUAS RESIDUALES**

**TESIS POR ETAPAS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

PRESENTA:

**MARIO SANCHEZ VARGAS**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. MARIA ELENA VELAZQUEZ MEZA**

**ASESORA**

**DRA. CELIA MERCEDES ALPUCHE ARANDA**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**SEPTIEMBRE, 2022**

Cuernavaca, Morelos a 29 de agosto de 2022

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **MARIO SANCHEZ VARGAS**, con el título del trabajo: **DETECCIÓN DE MARCADORES FENOTÍPICOS DE RESISTENCIA EN BACTERIAS DEL GRUPO ESKAPE AISLADAS DE AGUAS RESIDUALES.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DRA. MARÍA LUISA CASTREJÓN GODÍNEZ

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: M. EN B. LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO

\_\_\_\_\_

VOCAL: DRA. MARIA ELENA VELAZQUEZ MEZA

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DRA. LILIA MONTOYA LORENZANA

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DRA. CELIA MERCEDES ALPUCHE ARANDA

\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**LILIA MONTOYA LORENZANA | Fecha:2022-08-29 17:43:12 | Firmante**

cFuko87Ja8n9w50lG6jc47jWeTBZyDzG+zcMDpK1Wy4CvFINpX1lno8O2xx1sF5liaHiqL3cbYnTjJy6452KTQk0ZPA1bkkZX5JxwmlxZOxSSy41eOio8bMSF2k/1iypJIV4331+BLxdGmNdpY+REvMt/nh8Rp9pLVWblD3ZJTIFGs4LqkQCSmUQAuoNYY9t2RbBYQvEfPsGkdcdi+HhWafddJ4uGYp1kpVswalP+m+BmqxTMA0S5MEuU0ItuxiFqYCjDoWQreqnoJzxEmqGA9CdfOSIQIKlodDYwROzOxFbnrX6LnotrbmqQk+BKzqTmefiDc90C8ntUcfRXfYA==

**MARIA ELENA VELAZQUEZ MEZA | Fecha:2022-08-29 19:58:38 | Firmante**

Y/r1x4XtcRaaTHmuy/mNJ5W677qdZx9LuzExbtQTVCoWrl8V8/UX4Grxj86/jYHzuJmqIvDqqeNgcs+tN8Nx8O8FTSYars8nrQYea/keLgfx2AWxAysm++MkVJrHy71ect8Yjhdq/4YDJiuHsrgw/Wj95dYxN+6Wq8wKi76R4t95qhMn9mznWbP1lJogbGv293LVvK7MMDdEY67URerztmq+i3QuJvbmman9A8MPsaH0igJXJ5CQECU/trUaW6tZmxa9dM/vysBmc4IA7McdJdtmGU0gthB9qSuk5bwa++a2Fgzhfd7u2pHup5XJfY9z2aL2R6M2f7NgBGPxg==

**MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ | Fecha:2022-08-30 09:42:07 | Firmante**

SqzU87YNhboqXl4kF8jiVIEDs+2o/rllCY3FRSRqtRM9EBPtZpiAih+dD4dUVcazg0jAqowAtPkoGzJfcMzQJESJ9hjYhzKztbMrBcV6zKmj5LkzSS2D1jvo/V3CXbhj6e9+uX+IPC13w6EIR4GUcYeZwm4OL0epox6rNIOZGnX6QgmnhfJRqzqc/d+6CRxZoWNGi6m83YtL22myz7BpSiFcodL3jSBIfLYe+MgdsHCtP+sLjG5JQ/tHifmUgrhdLmk5BWXoswzizaLyd5Kal46D07gCTzW4Gd3yznRn9TyNrgU1VDFHi1tamF4YLUY9KfI0HE5APHVGr+WCA==

**LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO | Fecha:2022-08-30 09:48:04 | Firmante**

HQXFJ3qz3H5D9SSvwBBHF32tERuA/oavILXBONDZHE1ySZARQm5AwLN/bw4Q8Mj8rHU1OAdCSCGw4eHAAZln9R3jFwU+XjUzVgdtYxoYjMmgXFwAgbmkPrUCZXkubbxLs y/2FuadzLJKJ1CdYHQh7Opk5oM3gT3LRyfUMNpz+/bZwTx6BANw7k+GadRASjJutlrxSQnt7OoygVVTPiOIMjtk42zndbJek/7/qESg0S+rA4UQIFmL45cjOGRVx7A8daoF6tpVj nYFXSaU0xVQCqlqUkMlnAxFbRmNvLYnNLI3vbteCif81+/Y2aYFcyllCERvm1QvdNO7cywq0A==

**CELIA MERCEDES ALPUCHE ARANDA | Fecha:2022-08-30 10:58:15 | Firmante**

GoPqbfnsQAuhiAoSrm3V2tGtpc/FZGNV30xkiAn6ddNT3lcXg3xom/gU/9rc8AKrmTzA4dM7KbrwOF91FHFAMLWaOcerE6zXgk2BxyAX3o0FeJP0wUbWLVzQk+Q8JZziclwD0E/SWOZ1ZUG1RKEenq2n5Nt00GXedyGrrOOH83e4f7E6TfyU0Y924yjADLOPvX/tv7THjeLwtuFvlnuOeE7CpRMjZK1xwRgvqeToUiZedk0MkDxYV6B7R8Q0//+LQlo42YGxm8N97qu D13GTf0z9eNC7nTHUhhq2LQDXnRcO1UmKh/1pIB6NGAfAnMRI1hpv22vU4PRquuPcfuVJA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**KSbRaOmZO**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/yBs85ewngVc5mEs7K86EdD15mNw9KK>



# CONTENIDO

<b>CONTENIDO</b> .....	I
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	III
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	IV
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	V
<b>RESUMEN</b> .....	VII
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	2
1.1. HISTORIA GENERAL DE LOS ANTIBIÓTICOS .....	2
1.2. CONCEPTO DE ANTIBIÓTICO .....	2
1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN .....	3
1.3.1. <i>Inhibidores de síntesis de la pared bacteriana</i> .....	3
1.3.2. <i>Inhibidores de síntesis de proteínas</i> .....	6
1.3.3. <i>Inhibidores de síntesis del DNA</i> .....	9
1.3.4. <i>Inhibidores de la síntesis de factores metabólicos</i> .....	10
1.3.5. <i>Inhibidores de estructuras de membrana citoplasmática</i> .....	11
<b>2. MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA</b> .....	12
2.1. HIDROLISIS ENZIMÁTICA .....	12
2.2. MODIFICACIÓN DEL SITIO BLANCO .....	13
2.3. ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD .....	14
2.4. BOMBAS DE EXPULSIÓN .....	15
<b>3. IMPORTANCIA DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA</b> .....	16
3.1. COSTOS ECONÓMICOS Y MORTALIDAD ASOCIADOS A LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA .....	17
3.2. PLAN DE ACCIÓN MUNDIAL ANTE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA .....	19
3.3. EPIDEMIOLOGÍA DE BACTERIAS DEL GRUPO <i>ESKAPE</i> EN EL MUNDO Y EN AMÉRICA LATINA .....	20
3.4. EPIDEMIOLOGÍA DE BACTERIAS DEL GRUPO <i>ESKAPE</i> EN MÉXICO .....	23
3.5. RESISTENCIA DE BACTERIAS DEL GRUPO <i>ESKAPE</i> EN EL MUNDO Y EN AMÉRICA LATINA .....	24
3.6. RESISTENCIA DE BACTERIAS DEL GRUPO <i>ESKAPE</i> EN MÉXICO .....	27
<b>4. PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES</b> .....	29
4.1. TIPO DE TRATAMIENTOS .....	30
4.1.1. <i>Pretratamiento</i> .....	31
4.1.2. <i>Tratamiento primario</i> .....	31
4.1.3. <i>Tratamiento secundario</i> .....	31
4.1.4. <i>Tratamiento terciario</i> .....	31

<b>5. PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES Y RAM</b> .....	<b>32</b>
5.1. PREVALENCIA DE BACTERIAS DEL GRUPO <i>ESKAPE</i> EN AGUAS RESIDUALES.....	34
5.2. RESISTENCIA DE BACTERIAS DEL GRUPO <i>ESKAPE</i> EN AGUAS RESIDUALES.....	36
<b>6. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>38</b>
<b>7. HIPÓTESIS</b> .....	<b>38</b>
<b>8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>39</b>
<b>9. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>39</b>
<b>10. METODOLOGÍA</b> .....	<b>40</b>
10.1. ÁREA DE ESTUDIO .....	40
10.2. DISEÑO DE ESTUDIO.....	40
10.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO .....	41
10.3.2. <i>Características de los cromo-agares utilizados</i> .....	42
10.3.3. <i>Preparación de los cromo-agares</i> .....	43
10.3.4. <i>Siembra en cromo-agares</i> .....	44
10.3.5. <i>Conservación de las cepas</i> .....	44
10.4. IDENTIFICACIÓN DE GÉNERO Y ESPECIE .....	44
<b>11. RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
11.1. IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE BACTERIAS <i>ESKAPE</i> EN AGUAS RESIDUALES.....	46
11.2. IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE BACTERIAS <i>ESKAPE</i> EN AGUA TRATADA .....	48
11.3. RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN POR SISTEMA API®.....	51
<b>12. DISCUSIÓN</b> .....	<b>53</b>
<b>13. CONCLUSIONES</b> .....	<b>56</b>
<b>14. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>56</b>
<b>15. LIMITACIONES DEL TRABAJO</b> .....	<b>57</b>
<b>14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>58</b>
<b>15. ANEXOS</b> .....	<b>70</b>
ANEXO 1. BIOQUÍMICAS Y PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN CON EL SISTEMA API® 20ESTREP .....	70
ANEXO 2. BIOQUÍMICAS Y PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN CON EL SISTEMA API® 20STAPH MEDIUM .....	73
ANEXO 3. BIOQUÍMICAS Y PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN DE GÉNERO Y ESPECIE CON EL SISTEMA API® 20E.....	75
ANEXO 4. BIOQUÍMICAS Y PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN CON EL SISTEMA API® 20NE .....	78

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Descubrimiento de fármacos antibiótico y desarrollo de resistencia antimicrobiana. ....	16
Figura 2. Muertes atribuibles a las RAM cada año en comparación con otras causas de muerte.....	18
Figura 3. Muertes anuales atribuibles en cada continente causadas por la RAM para 2050.....	18
Figura 4. Etapas de tratamiento de las aguas residuales en la planta de tratamiento. ....	30
Figura 5. Selección y transferencia de genes de resistencia a los antibióticos en aguas residuales.....	34
Figura 6. Planta de tratamiento de aguas residuales en el Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca. ....	40
Figura 7. Crecimiento presuntivo de <i>Enterococcus</i> sp. proveniente de las muestras de agua residual. ....	46
Figura 8. Crecimiento presuntivo de <i>Staphylococcus</i> sp. proveniente de la muestra de agua residual. ....	47
Figura 9. Crecimiento presuntivo de <i>Klebsiella</i> sp. proveniente de la muestra de agua residual. ....	47
Figura 10. Crecimiento presuntivo de <i>Acinetobacter</i> sp. proveniente de la muestra de agua residual. ....	48
Figura 11. Siembra de agua tratada en HiCrome Enterococcus faecium Agar Base.. ....	49
Figura 12. Crecimiento presuntivo de <i>Staphylococcus</i> sp. proveniente de la muestra de agua tratada.....	49
Figura 13. Crecimiento presuntivo de <i>Klebsiella</i> sp. proveniente de la muestra de agua tratada.....	50
Figura 14. Crecimiento presuntivo de <i>Acinetobacter</i> sp. proveniente de la muestra de agua tratada.....	50

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo (i+d) de nuevos antibióticos.....	20
Cuadro 2. Medios de cultivo cromogénicos y cepas ATCC® recomendadas para cada cromo-agar. ....	42
Cuadro 3. Concentraciones de antibióticos utilizados para los diferentes géneros del grupo <i>ESKAPE</i> . ....	43
Cuadro 4. Géneros bacterianos presuntivos del grupo <i>ESKAPE</i> aislados de las muestras de agua residual y tratada.....	51
Cuadro 5. Resultados de identificación por el sistema API®.....	52

## AGRADECIMIENTOS

Como creyente de la iglesia católica, estoy ampliamente agradecido con Dios por la fuerza de voluntad, valentía y perseverancia que tuve en el camino de la investigación, agradecido por ser parte del desfile del triunfo, por lo anterior confié en que otro mundo es posible. Gracias vida por pertenecer a una gran familia y por la oportunidad de conocer a personas muy comprometidas en su quehacer científico.

Gracias a mi familia por el apoyo incondicional que me brindaron durante esta etapa de mi vida como estudiante, en especial a mi madre Francisca Vargas Toledo, mi madre no tendrá una preparación profesional, pero como madre sabe desarrollar su papel al inculcarme buenos valores éticos y guiarme por el buen camino de la vida, esto sin duda alguna me lleva a forjarme como un hombre de bien, con buenos principios y valores. Gracias a la persona que funge como mi padre al Sr. Gregorio Moreno Medina, por enriquecer la fortaleza y valentía de mi madre, por sus consejos, gracias por ser un pilar tan importante en mi familia. Gracias a mis cuatro hermanas, Verónica, Rocio, Casilda y Judith por su amor, cariño y afecto que me tienen, día a día estuvieron al tanto de mi avance durante la carrera universitaria. Y como no agradecer a mis dos hermanos por inspirarme a seguir adelante y hablo de Adrián y Everardo que con sus preguntas sobre la biología hacían recordar algunas clases de evolución, microbiología, genética e invertebrados. A mi abuelo Adolfo Vargas Fuentes a pesar de que ya no está en este mundo con nosotros, agradezco el interés que mostro en cada paso de mi vida. Agradecido con mi novia Gizell, por el apoyo incondicional que recibí de ella, gracias por estar a mi lado en los bonitos y malos tiempos de mi vida, gracias por los cafecitos y los desayunos.

En esta lista de agradecimientos no puede faltar mi directora de tesis, Dra. Maria Elena Velazquez Meza, gracias por formar parte de mi etapa final y más importante como estudiante, gracias por ser guía en esta travesía que al principio era muy desconocida para mí. Sin embargo, con su conocimiento, experiencia, dedicación, disciplina y amor a su trabajo las actividades en laboratorio y sesiones académicas fueron más a menos. No cabe la menor duda que esta etapa fue todo un reto, formar parte del equipo de

trabajo de la doctora. Gracias por la paciencia y empatía que tuvo durante toda esta etapa final.

A mis compañeros Alejandro, Jackeline a Daniela gracias por los momentos que compartimos en el laboratorio. A mis amigos Daniel Barrera y Daniel Román gracias por su amistad y apoyo incondicional que aún nos brindamos cuando lo necesitamos.

Gracias al joven y más popular del INSP Dr. Miguel Galarde López por su tiempo para asesorarme con la redacción de la metodología y resultados obtenidos en este estudio y claro en otros contenidos de esta tesis. Dr. Galarde, además de un buen compañero y amigo en este trabajo, eres un excelente ser humano. Gracias por escucharme y aconsejarme en momentos complicados de mi vida personal.

A la Mtra. Berta Alicia por compartir el tiempo y su conocimiento en el laboratorio. Gracias por las ideas y/o estrategias para mejorar en la redacción de la tesis, por los ánimos y porras que me daba después de una sesión de asesoría con la Dra. Maria Elena, recuerdo que en varias ocasiones me dijo “tú puedes Mario solo ponte a estudiar”.

Dra. Celia Mercedes Alpuche Aranda directora del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública, gracias por brindarme la oportunidad de realizar mi servicio social y tesis en su laboratorio de investigación.

A la Dra. Celia Mercedes Alpuche Aranda, Dra. Maria Luisa Castrejon Godínez, Dra. Lilia Montoya Lorenzana, al Mtro. Luis Enrique cruz Trujillo, gracias por formar el comité de sinodales, gracias por disponer de su tiempo para la revisión del presente escrito de tesis.

Agradezco al personal directivo del Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca por permitir realizar el muestreo en la Planta de tratamiento de aguas residuales. Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento del proyecto titulado “*Mapa de uso clínico de antibióticos y de reservorio de genes de resistencia bacteriana en el ambiente de tratamiento de aguas residuales*. **CI-2512018/1533**, del cual se originó mi tema de tesis.

## RESUMEN

La resistencia antimicrobiana es un suceso mundial emergente que constituye en la actualidad uno de los problemas más importantes en salud pública. Un grupo de bacterias clasificadas con el acrónimo *ESKAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* sp.), se encuentran asociadas a la multirresistencia, así como al incremento de las infecciones asociadas a la atención de la salud e infecciones asociadas a la comunidad. A pesar de que este grupo de bacterias ha sido ampliamente estudiado en ambiente hospitalario y comunitario, se conoce poco acerca del papel que tienen en el ambiente, en las aguas residuales; estas son consideradas como reservorios de bacterias y genes de resistencia a los antimicrobianos a partir de las cuales se diseminan al ambiente. El objetivo de este trabajo fue detectar fenotípicamente los marcadores de resistencia que expresan las bacterias del grupo *ESKAPE* aisladas de aguas residuales hospitalarias. Se colectaron muestras de agua residual y agua tratada de la planta de tratamiento del Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca. Las muestras de agua residual fueron sembradas en cromos-agares con antibiótico, considerando los puntos de corte de cada antibiótico de acuerdo con el *Clinical Laboratory Standard Institute* (2019). Los aislamientos obtenidos fueron resembrados a partir de una sola colonia para obtener cultivos puros a partir de los cuales se llevó a cabo la identificación de especie por medio del sistema API®. En este trabajo se observó una disminución de la carga bacteriana en aguas residuales tratadas en comparación con aguas residuales no tratadas. Se confirmó la identificación en la muestra de agua residual del género *Staphylococcus* sp., y en la muestra de agua residual tratada se identificaron *Staphylococcus* sp. y *Klebsiella oxytoca*.

## INTRODUCCIÓN

Dentro de los descubrimientos que se han realizado en la historia del ser humano se encuentran los antibióticos, a partir del descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 se inicia la era del uso de los antibióticos. Los antibióticos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano o destruir una célula bacteriana, a través de diferentes mecanismos de acción. Sin embargo, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia que impiden al antibiótico ejercer su mecanismo de acción dependiendo del grupo de antibiótico que se trate. Los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos son: hidrólisis enzimática, alteración del sitio blanco, alteración de la permeabilidad y las bombas de expulsión. Actualmente 700,000 muertes al año son atribuidas a la resistencia antimicrobiana (RAM) a nivel mundial, con este ritmo se estima que para el año 2050 habrá 10 millones de muertes al año con un impacto en la economía mundial de hasta 100 trillones de dólares por año. Una proporción de antibióticos administrados a humanos son utilizados en el ambiente hospitalario y otra parte en el ambiente comunitario, con residuos que eventualmente terminan en las aguas residuales. Las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) han sido descritas como puntos críticos para la propagación de la RAM, debido a que funcionan como reservorios de bacterias resistentes a los antibióticos (BRA), genes de resistencia a los antibióticos (GRA), así como elementos genéticos móviles (EGM) mediante la transferencia horizontal de genes (THG) entre géneros bacterianos.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Historia general de los antibióticos

El primer producto antibacteriano de origen natural fue descubierto por E. de Freudenreich al estudiar la piocianasa, pigmento azul que al ser liberado por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* en cultivo impedía el crecimiento de otras bacterias patógenas. Por su inestabilidad y toxicidad la piocianasa no podía ser utilizada en el campo de la antibioterapia (Belloso, 2009). Al químico Paul Ehrlich se le atribuye el máximo logro terapéutico de los antibióticos, dando un puntapié inicial con el salvarsán, un compuesto derivado de arsénico que mostró utilidad en el tratamiento de la sífilis, aunque su toxicidad lo colocaba lejos de ser candidato ideal para aplicarlo como terapia (Gensini *et al.*, 2007). En 1920 Alexander Fleming informó el descubrimiento de una sustancia presente en las lágrimas humanas que determinaba que algunas bacterias se destruyeran y la llamó "lisozima" (Belloso, 2009). Hacia 1928 Fleming logró descubrir una sustancia capaz de difundirse a través del agar y de lisar las bacterias. A esta sustancia la llamó "penicilina" con este descubrimiento se inicia la era del uso de los antibióticos (Fleming, 1929).

### 1.2. Concepto de antibiótico

Se define como antibiótico a una molécula natural (producida por hongos o bacterias), sintética o semisintética (producidos a partir de moléculas simples, o cuando hay modificación química de alguna estructura del antibiótico original) capaz de inducir la muerte celular o inhibir el crecimiento de bacterias. Se utiliza el término antibiótico para referirnos al subgrupo de antimicrobianos con actividad antibacteriana (Seija & Vignoli, 2006). Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo (Seija & Vignoli, 2006).

### **1.3. Clasificación de los antibióticos y mecanismos de acción**

Cuando la acción de los antibióticos incluye una amplia gama de especies bacterianas se habla de antibióticos de amplio espectro, mientras que si solo afectan a una gama reducida de bacterias se habla de antibióticos de espectro reducido (Seija & Vignoli, 2006). Los antibióticos que destruyen o provocan lisis en las bacterias son agentes con efectos bactericida, mientras que los que inhiben el crecimiento bacteriano son antibióticos con efecto bacteriostático y debido a que impiden el desarrollo y la multiplicación bacteriana sin provocar su lisis (Madigan *et al.*, 2015). Otro concepto farmacodinámico de interés en la interacción entre bacterias y antibióticos es el efecto post-antibiótico (EPA). Proceso que consiste en la supresión del crecimiento bacteriano tras la exposición a un antibiótico, expresado de otra manera, el tiempo que tarda un organismo en recuperarse de los efectos producidos por el antibiótico (Macgowan & Bowker, 1997; Craig, 1998). Atendiendo a su mecanismo de acción y estructura química, los antibióticos principales de interés clínico y sus principales representantes se describen a continuación.

#### **1.3.1. Inhibidores de síntesis de la pared bacteriana**

##### **1.3.1.1. $\beta$ -lactámicos**

Los  $\beta$ -lactámicos son una familia de antibióticos que estructuralmente poseen un anillo  $\beta$ -lactámico. Son el grupo más numeroso de los antimicrobianos, además de ser los más utilizados en la práctica clínica. Su acción bactericida es lenta, actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, tienen amplio margen terapéutico y escasa toxicidad. Su espectro ha ido aumentando a lo largo del tiempo con la incorporación de nuevas moléculas que actúan frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, pero la aparición progresiva de la resistencia adquirida por los microorganismos ha limitado su uso. Los  $\beta$ -lactámicos se pueden clasificar en cuatro grupos diferentes: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (Seija & Vignoli, 2006).

Los  $\beta$ -lactámicos actúan como sustratos competitivos de distintas enzimas participantes en la síntesis de la pared celular, especialmente de las proteínas ligadoras de penicilina (PBP's, *por sus siglas en inglés*) ya que presentan una similitud estructural con el extremo *D*-alanina-*D*-alanina del pentapéptido que enlaza las cadenas de ácido *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina, constituyendo cadenas largas de glúcidos formados por repeticiones de ácido *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina. El ácido murámico fija y entrecruza a los péptidos para formar una malla, esta última etapa de síntesis es llamada transpeptidación, en presencia de antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, las transpeptidasas hidrolizan el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico y se forma un éster estable entre el compuesto hidrolizado y un grupo hidroxilo de la serina del sitio activo de la enzima. De este modo la pared celular se debilita y puede lisarse por la presión osmótica intracelular (Suárez & Gudiol, 2009; Ma García-Hernández *et al.*, 2011).

#### **1.3.1.2. Glucopéptidos**

Los glucopéptidos son antibióticos que contienen un heptapéptido como estructura central. Dentro de los glucopéptidos se encuentran la vancomicina y teicoplanina, tienen efecto bacteriostático frente a *Enterococcus* sp. caso contrario con lo que sucede contra las demás bacterias Gram-positivas que tienen efecto bactericida (Palomo, 2014). Los glucopéptidos actúan en la tercera fase (transglucosilación) de la biosíntesis de la pared bacteriana inhibiendo la síntesis del peptidoglucano. Su mecanismo de acción de la vancomicina consiste en unirse al lípido II precisamente con las terminaciones *D*-alanina *D*-alanina del disacárido pentapéptido evitando así la acción de las glucotransferasas y transpeptidasas y en consecuencia evitando la elongación del peptidoglucano (Ogrady *et al.*, 1997).

#### **1.3.1.3. Fosfonopéptidos**

La fosfomicina es un derivado del ácido fosfónico, sintetizada a partir de *Streptomyces fradiae* y *Pseudomonas syringae*. Antibiótico con efecto bactericida y un amplio espectro de acción tanto en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En bacterias

Gram-negativas la fosfomicina atraviesa la membrana externa mediante las porinas; debido a su tamaño pasa la barrera del peptidoglucano sin dificultad y finalmente atraviesa la membrana citoplasmática a través de sistemas de transporte activo. Posteriormente, inhibe la UDP-N-acetilglucosamina-enolpiruvil transferasa (MurA), enzima responsable de catalizar la formación de N-acetilmurámico, precursor del peptidoglucano, a través de la unión de N-acetilglucosamina y fosfoenolpiruvato. Sin embargo, la fosfomicina al ser un análogo estructural del fosfoenolpiruvato, se une covalentemente con la enzima MurA provocando la lisis bacteriana (Pedreira *et al.*, 2003; Falagas *et al.*, 2008; Candel *et al.*, 2019).

#### **1.3.1.4. Isoxazolidinonas**

La cicloserina es un antibiótico aislado a partir de *Streptomyces orchidaceous* análogo estructural del aminoácido D-alanina. Actúa sobre la base de la D-alanina, inhibiendo competitivamente la actividad de las enzimas L-alanina-racemasa (transforma L-alanina en D-alanina), D-alanil-D-alanina-sintetasa (forma dímeros de D-alanina) y alanina permeasa, e interfiere con la síntesis de la pared de la bacteria (Spigelman, 2007; Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

#### **1.3.1.5. Bacitracina**

La bacitracina es un antibiótico polipeptídico aislado de *Bacillus subtilis*, con actividad frente a bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus* sp. y *Streptococcus* sp.), tiene efecto bacteriostático o bactericida dependiendo de su concentración. Este antimicrobiano se une al fosfobactoprenol para bloquear su desfosforilación, e impide que pueda utilizarse para transportar los polímeros lineales de disacárido-pentapéptido a través de la membrana citoplasmática, hasta la pared de la bacteria que está en formación (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

## **1.3.2. Inhibidores de síntesis de proteínas**

### **1.3.2.1. Aminoglucósidos**

Se denominan también oligosacáridos obtenidos mediante síntesis de bacterias del género *Streptomyces* que pertenecen al phylum Actinobacteria. Su estructura química se compone de aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupos amino (aminociclitol). De acuerdo con el componente aminociclitol se clasifican en dos grupos: aminoglucósido con aminociclitol y aminociclitol sin aminoglucósido (Mandell *et al.*, 1988).

Los aminoglucósidos tienen efecto bactericida frente a bacilos Gram-negativos aerobios, entre ellos, enterobacterias y bacilos no fermentadores por ejemplo *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* sp. Además, tienen efecto ante bacterias Gram-positivas, incluyendo *Staphylococcus* sp. y *Enterococcus* sp. La acción de los aminoglucósidos comprende una interacción inicial con la superficie externa de la membrana celular bacteriana para difundir a través de los poros proteicos de la cara exterior de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, penetrando en el espacio periplásmico. El transporte subsecuente de los aminoglucósidos a través de la membrana citoplasmática depende del transporte de electrones (transporte activo). Esta fase puede ser bloqueada o inhibida por cationes divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , produciendo hiperosmolaridad, reducción de pH y anaerobiosis. Después de ser transportados a través de la membrana citoplasmática, los aminoglucósidos se unen en el sitio A del ribosoma 30S e interfieren con la síntesis proteica causando una lectura errónea del RNAm, al insertarse en la membrana celular, estas proteínas estructuralmente alteradas aumentan su permeabilidad y provocan una mayor penetración de aminoglucósidos dentro de la bacteria produciendo la lisis bacteriana (Bryan & Kwan, 1983; Hancock *et al.*, 1991; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999).

### 1.3.2.2. Macrólidos y cetólidos

Los macrólidos son un grupo de antibióticos semisintéticos derivados de la eritromicina producida por la especie del hongo *Streptomyces erythreus*. En su estructura química tienen un anillo lactónico macrocíclico al que se unen uno o varios azúcares unidos mediante enlaces glucosídicos que pueden ser neutros o básicos. La sustitución del azúcar neutro (cladinosa) en posición tres de los macrólidos (eritromicina), por un grupo cetónico ha dado origen a una nueva familia de antibióticos denominados cetólidos (Barman Balfour & Figgitt, 2001). Su espectro de acción engloba microorganismos Gram-positivos tanto cocos (excepto *Staphylococcus* sp. resistentes a meticilina y *Enterococcus* sp.), como bacilos y algunos microorganismos Gram-negativos.

Los macrólidos se unen de forma reversible al dominio V del centro de la peptidiltransferasa, en el ARNr 23S de la subunidad 50S del ribosoma, interfiriendo así el proceso de elongación de la síntesis proteica. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilos de los macrólidos (entre el -OH en posición dos del azúcar desosamina) y determinadas bases de ARNr. El grupo de cetólidos interaccionan con el dominio II del ARNr de la subunidad 23S por lo que la afinidad de los cetólidos por el ribosoma es mucho mayor que el resto de los macrólidos, donde la interacción entre la cladinosa y el dominio II del ARNr 23S es débil. Estos lugares de unión se sitúan en el orificio de entrada al túnel ribosómico por donde sale la proteína en formación, de manera que al unirse los macrólidos o los cetólidos, se bloquea el orificio impidiendo el crecimiento del péptido (Retsema & Fu, 2001). También se ha descrito en los cetólidos, una inhibición de la formación de los ribosomas 50S al evitar el ensamblaje del ARNr 5S y 23S con las riboproteínas, impidiendo así el inicio de la síntesis proteica (Nilius, 2002).

### **1.3.2.3. Anfenicoles**

El cloranfenicol es un derivado del ácido dicloroacético y tiene un anillo nitrobenzeno, es un antibiótico bacteriostático que bloquea la síntesis proteica de la bacteria uniéndose reversiblemente a la proteína L16 localizada en la subunidad 50S. La proteína L16 es mediadora en la fijación del ARNt a la enzima peptidiltransferasa evitando con ello la formación de los enlaces peptídicos (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

### **1.3.2.4. Oxazolidinonas**

El linezolid es un antibiótico obtenido por síntesis, cuya estructura es tricíclica. Tiene efecto bacteriostático frente a bacterias Gram-positivas, incluidas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Enterococcus* sp., es inactivo o poco activo frente a bacterias Gram-negativas. El linezolid inhibe la síntesis proteica e impide la formación del complejo de iniciación 70S. El ARNm se fija a la subunidad 50S en el centro peptidiltransferasa dentro de la subunidad 23S (dominio V), distorsionando así el punto de unión del formilmetionil-ARNt evitando la formación del complejo de iniciación. Esta familia de antibióticos tiene un mecanismo de acción singular, y al actuar en una diana distinta no hay resistencia cruzada con otros antibióticos que también inhiben la síntesis proteica (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

### **1.3.2.5. Tetraciclinas**

Son moléculas naturales o semisintéticas con un núcleo hidronaftaceno, que contienen cuatro anillos fundidos al que se pueden unir radicales que darán lugar a las diferentes tetraciclinas, son antibióticos de amplio espectro. Penetran en el citoplasma de la bacteria por un proceso dependiente de energía y se unen de forma reversible a la subunidad 30S del ribosoma (proteínas S7, S14, S19) para bloquear el acceso de los complejos aminoacil-ARNt, impidiendo la continuación de la síntesis proteica (Shlaes, 2006).

### 1.3.3. Inhibidores de síntesis del DNA

Las quinolonas de uso clínico tienen una estructura formada por dos anillos, con un nitrógeno en la posición uno, un grupo carbonilo en la posición cuatro y un grupo carboxilo en la posición tres. La familia de las quinolonas actúa sobre el DNA inhibiendo la acción de las proteínas topoisomerasas tipo IIA propias de los procariontes uniéndose a la DNA-girasa y a la topoisomerasa IV. La DNA-girasa está constituida por dos subunidades B y dos subunidades A y es el blanco principal en bacterias Gram-negativas. La topoisomerasa IV está constituida por dos subunidades ParE y dos subunidades ParC y es el principal blanco de las bacterias Gram-positivas. Las quinolonas más hidrofílicas atraviesan la membrana externa de las bacterias Gram-negativas mientras que las quinolonas más hidrofóbicas difunden a través de las membranas (Morrissey *et al.*, 1996; Rodríguez-Martínez, 2005). Al ingresar en el citoplasma bacteriano, las quinolonas interactúan con los dominios de mellado-empalme cuando las topoisomerasas forman los complejos de clivaje y están listas para dar paso al DNA-T a través de la puerta transitoria (Leo *et al.*, 2005). Para impedir esta acción importante en la replicación del DNA, interviene la quinolona para formar el aducto (clivaje-quinolona). El aducto es posible porque los grupos 3-carboxi y 4-oxo forman enlaces de coordinación con el  $Mg^{2+}$  ion fundamental que enlaza al antibiótico con el extremo cortado de la cadena de DNA y la ser 83 (GyrA) aminoácido presente en la hélice cuatro de la topoisomerasa. El anillo sustituyente en la posición siete permite una interacción adicional con la otra subunidad de corte y empalme en la holoenzima que refuerza la actividad inhibitoria al impedir su separación (Andersson & MacGowan, 2003; Leo *et al.*, 2005). El resultado es una estructura “en burbuja” estable que evoluciona hacia la modificación estructural y funcional del DNA (inhibición del súper-enrollamiento) con las siguientes consecuencias (Froelich-Ammon & Osheroff, 1995; Khodursky & Cozzarelli, 1998; Hiasa *et al.*, 2003; Rodríguez-Martínez, 2005; Leo *et al.*, 2005; Drlica *et al.*, 2008). En primer lugar, los aductos conteniendo DNA girasa condicionan agregados proteicos por delante de la horquilla replicativa o transcriptiva que colisionan con estas e impiden su avance, anulando transitoriamente la síntesis

de DNA y mRNA, y en segundo lugar el DNA queda abierto en múltiples puntos a manera que va aumentando la concentración del antibiótico.

### **1.3.4. Inhibidores de la síntesis de factores metabólicos**

#### **1.3.4.1. Sulfamidas**

Las sulfamidas derivan de la sulfanilamida son antibióticos sintéticos, bacteriostáticos inicialmente de amplio espectro, actualmente su espectro de actividad está limitado debido a la cada vez más extendida resistencia adquirida, las sulfonamidas son análogos del ácido paraaminobenzoico (PABA, por sus siglas en inglés) solo que el grupo carboxilo es reemplazado por un grupo sulfonilo ( $\text{SO}_2\text{NH}_2$ ) (Vicente & Pérez-Trallero, 2010). Las sulfamidas y el PABA compiten por la enzima dihidropteroato sintetasa, impidiendo así la formación de ácido dihidroterico, precursor en el metabolismo del ácido fólico, este último imprescindible para la síntesis de timidinas, purinas y metionina compuestos precursores de ácidos nucleicos y proteínas respectivamente, necesarias para el crecimiento de las bacterias (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

#### **1.3.4.2. Diaminopirimidinas y Trimetoprim**

Las sulfamidas actúan sinérgicamente con algunos componentes de la familia de las diaminopirimidinas, como la pirimetamina y el trimetoprim, esta combinación es la más utilizada debido a su alto espectro de acción contra bacterias Gram-negativas como *E. coli*. El cotrimoxazol (TMP-SXT), una combinación de trimetoprima y sulfametoxazol en proporción 1:5, es la combinación empleada más frecuentemente (Masters *et al.*, 2003). Estos antibióticos inhiben otra enzima integral de las bacterias al competir por la dihidrofolato reductasa que cataliza la conversión de ácido dihidrofólico en ácido tetrahidrofólico (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

### **1.3.5. Inhibidores de estructuras de membrana citoplasmática**

#### **1.3.5.1. Polimixinas**

Son antibióticos polipeptídicos, cíclicos y policatiónicos, con una cadena de ácido graso unido al péptido y se comportan como detergentes catiónicos. Los antibióticos que actúan en membrana tienen efecto bactericida. Son activos frente a bacilos Gram-negativos aerobios, incluyendo *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multi-resistentes. Tienen una parte hidrofílica (péptido) con alta carga positiva que por atracción electrostática se une a la superficie de la membrana, cuya carga neta es negativa. El extremo lipofílico (ácido graso) mediante interacciones hidrofóbicas se une a los fosfolípidos de la membrana. El resultado de esta interacción con la estructura de membrana es un aumento de permeabilidad provocando la salida de iones potasio y pérdida de metabolitos esenciales además entrada de otros iones que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal (Li *et al.*, 2006).

#### **1.3.5.2. Lipopéptidos cíclicos**

La daptomicina es una molécula peptídica cíclica (parte hidrofílica) a la que se une una cadena lateral de ácido graso (parte lipofílica). Este antimicrobiano bactericida, posee un efecto potente contra una amplia variedad de bacterias Gram-positivas (Pigrau & Almirante, 2009). Actúa penetrando en la membrana citoplasmática sin entrar a la célula, mediante la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio, produciéndose una rápida despolarización de la membrana con alteración del potencial eléctrico de la membrana y salida de iones potasio. Como consecuencia de ello, se bloquea la inhibición de síntesis de peptidoglicano, bloqueo de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos, provocando la muerte bacteriana (Kanafani & Corey, 2007; Sauermann *et al.*, 2008; Pigrau & Almirante, 2009). Se sabe que su actividad depende de la presencia de calcio que es óptima a las concentraciones normales presentes en suero (50 mg/l). Probablemente, el calcio favorece la unión de la parte lipofílica de la molécula de daptomicina a la membrana citoplasmática, donde la estructura de la daptomicina presentará cambios conformacionales que provocará su inserción en la membrana

citoplasmática. La unión de varias moléculas en la membrana forma canales por los que saldrán los iones potasio. El resultado es una potente actividad bactericida, con efecto post antibiótico (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

## **2. Mecanismos de resistencia bacteriana**

Las bacterias adquieren la resistencia a los antibióticos a través de diversos mecanismos. Esta puede ser natural, provenir de mutaciones o bien originarse por transferencia de genes. Cuando todas las cepas pertenecientes a la misma especie son resistentes a un antibiótico, se habla de resistencia natural. Cuando la resistencia bacteriana solo aparece en algunas cepas normalmente sensible se habla de resistencia adquirida siendo esta la forma más habitual y puede darse por mutación, adquisición o transferencia de nuevos genes mediante procesos de conjugación, transformación y transducción en estos procesos de transferencia de genes se involucra una célula donadora y otra célula receptora (Cohen *et al.*, 1972). De manera general la resistencia a los antibióticos en las bacterias se puede adquirir esencialmente a través de la hidrólisis enzimática, modificación del sitio blanco, alteración de la permeabilidad y bombas de expulsión para protegerse de la acción de los antibióticos. El mecanismo de resistencia a desarrollar por parte de la bacteria dependerá de la bacteria y antibiótico a utilizar (Hawkey, 1998; Tenover, 2006).

### **2.1. Hidrólisis enzimática**

Las bacterias producen enzimas que hidrolizan al antibiótico impidiendo que actúe sobre ellas, las  $\beta$ -lactamasas de transmisión plasmídica hidrolizan el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico, estas enzimas son el principal mecanismo de resistencia en bacterias Gram-negativas clínicamente importantes. Mutaciones continuas producen la aparición de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE's), la expresión de las BLEE's se atribuye al uso masivo de las cefalosporinas de tercera generación y aztreonam; actualmente las BLEE's confieren resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos con excepción de los carbapenémicos las cefamicinas y las combinaciones de  $\beta$ -

lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, como el tazobactam y sulbactam. Las BLEE's, derivan en su mayoría de las  $\beta$ -lactamasas tipo TEM (Temoniera) y SHV (sulphydryl variable) a partir de una serie de mutaciones puntuales en el centro activo de las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas (Jacoby & Medeiros, 1991). La acción catalítica de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AGMEs, *por sus siglas en inglés*) y las metiltransferasas son los mecanismos predominantes para lograr la resistencia a los aminoglucósidos más comunes, como la neomicina, gentamicina y la tobramicina. La familia de las AGMEs se clasifica en tres subfamilias según el grupo funcional que transfieran; O-fosfotransferasas, O-nucleotidiltransferasas y N-acetiltransferasas (Shaw *et al.*, 1993; Guzman *et al.*, 2016; Troncoso *et al.*, 2017).

## **2.2. Modificación del sitio blanco**

Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de esta. Este mecanismo es principalmente utilizado por las bacterias Gram positivas las cuales generan cambios estructurales de algún aminoácido en los sitios de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos a nivel de las PBP's. Mutaciones puntuales en el sitio catalítico de estas proteínas generan la resistencia (Cavaco *et al.*, 2008).

Existen diferentes fenotipos de resistencias a los glucopéptidos producidos por diferentes determinantes genéticos de resistencia, denominados VanA, VanB, VanC, VanD, VanE y VanG. Todos estos fenotipos comparten un mecanismo de resistencia muy similar basado en la modificación del sitio blanco donde actúan los glucopéptidos, es decir, modifican el dipéptido *D*-alanina *D*-alanina lo cual es sustituido por *D*-alanina *D*-lactato o por *D*-alanina *D*-serina, lo que les confiere baja afinidad por los glucopéptidos (Palomo, 2014; Gastelo Acosta & Maguiña Vargas, 2018).

La modificación por mutación de los genes *gyrA* y *parC* que codifican para DNA girasa y topoisomerasa IV ofrecen resistencia a fluoroquinolonas. La alta resistencia hacia fluoroquinolonas, tales como ciprofloxacina se relacionan con más de una mutación a

nivel de gen *gyrA* afectando la posición 83, además hay mutaciones en el gen *parC* donde se afectan los codones 80 o 84 de manera usual (Mosquito *et al.*, 2014). Las mutaciones en el gen que codifica la enzima aminoglucósido *N*-6'-acetiltransferasa [AAC (6')-Ib], que confiere resistencia a los aminoglucósidos, de lo anterior resulta una variante [AAC (6')-Ib-cr] que promueve resistencia a ciprofloxacina y a norfloxacina (Robicsek *et al.*, 2006). La modificación por fosforilación en quinolonas, sucede cuando las enzimas *crpP* utilizan ATP como grupo donante de fosfato para conferir resistencia a *P. aeruginosa* frente a ciprofloxacina (Chávez-Jacobo *et al.*, 2018). La resistencia a las quinolonas mediada por plásmidos (PMQR) confiere una menor susceptibilidad a estos antibióticos. Algunos ejemplos de sistemas PMQR incluyen la proteína Qnr, que evita la unión de las quinolonas a las proteínas diana (Fàbrega *et al.*, 2009; Hooper & Jacoby, 2015). Las modificaciones del sitio de unión al ribosoma consisten en una metilación de un residuo de adenina o cambios en la secuencia de bases de la subunidad 23S del ARNr. La metilación de este sitio obedece a la presencia de la enzima metilasa codificada por los genes *erm* que pueden expresarse de forma constitutiva o inducible. La inducción de la metilasa se ha relacionado con la presencia de cladinosa en los macrólidos de 14 y 15 átomos. Los macrólidos de 16 átomos clindamicina y telitromicina no inducen la actividad de la metilasa porque carecen de la cladinosa (Chellat *et al.*, 2016).

### **2.3. Alteración de la permeabilidad**

Las porinas son canales embebidos en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas que trabajan como filtros en una membrana permeable. Además de otras funciones vitales, estas moléculas tienen la capacidad de retardar el acceso de los antibióticos al interior de la bacteria. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos deben penetrar a través de estos canales; cuando por una mutación se pierde una porina, aumentan la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del antibiótico. Las porinas pueden ser específicas o inespecíficas dependiendo de su selectividad para las moléculas que dejan pasar. En *P. aeruginosa*, los carbapenémicos, como el imipenem y el meropenem, utilizan una porina específica llamada OprD. La OprD puede cerrarse

durante la terapia con carbapenémicos, llevando a una resistencia (Troncoso *et al.*, 2017).

## 2.4. Bombas de expulsión

Se encuentran en la membrana externa de la célula y expulsan hacia el exterior de la bacteria gran cantidad de moléculas, entre ellas (antibiótico). La función principal de este mecanismo es mantener al antibiótico a bajas concentraciones dentro de la célula para que la bacteria pueda sobrevivir. Para ello, utilizan la hidrólisis de ATP o un mecanismo de contra-transporte iónico como sustrato energético (Troncoso *et al.*, 2017; Vila *et al.*, 2007).

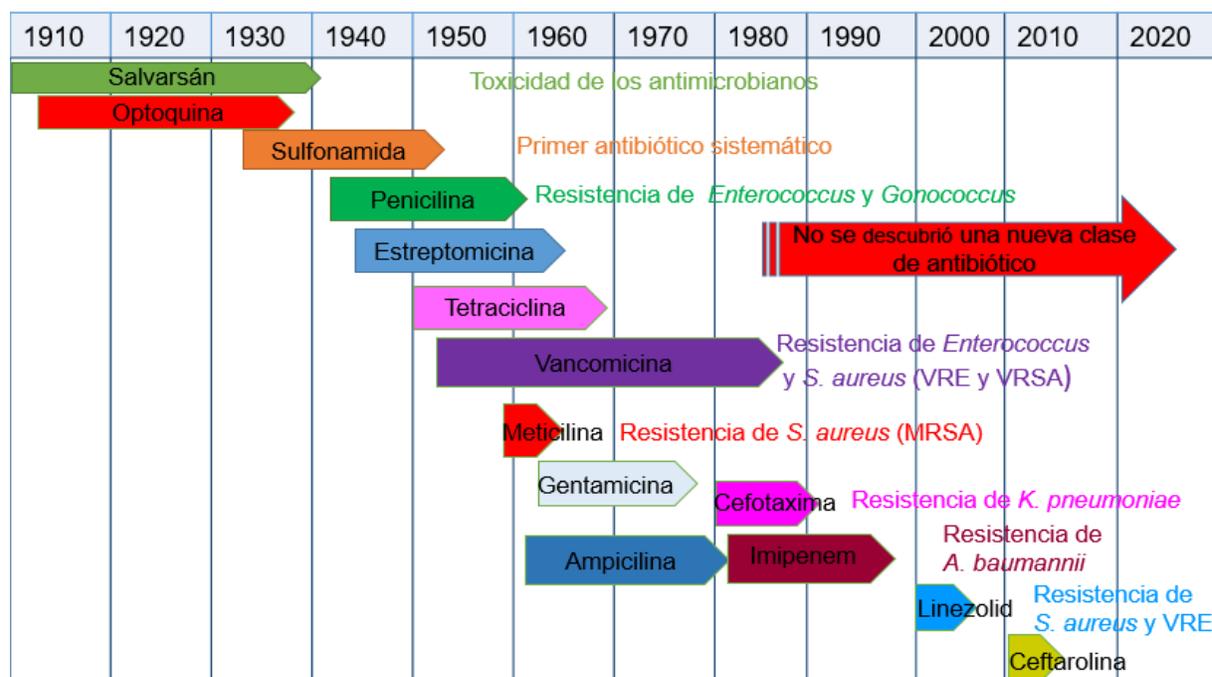
Estos transportadores se pueden clasificar en seis familias: La familia ABC (*ATP binding cassette*), MF (*major facilitator*), MATE (*multidrug and toxic efflux*), RND (*resistance nodulation division*), SMR (*small multidrug resistance*) y DMT (*drug/metabolite transporter superfamily*) (Jack *et al.*, 2001; Vila *et al.*, 2007; Coyne *et al.*, 2011). La diferencia de las bombas de expulsión es que utilizan diferentes fuentes de energía para expulsar antibióticos; la familia ABC es dependiente de hidrólisis de ATP, la familia MATE utiliza un gradiente electroquímico atribuido por Na<sup>+</sup> o H<sup>+</sup> y las bombas pertenecientes a la familia MFS, RND y SMR utilizan la fuerza protón-motriz para ejercer su función. En *A. baumannii* la resistencia mediada por bombas de expulsión, generalmente, se asocia a las familias RND y MFS (Opazo C *et al.*, 2009; Coyne *et al.*, 2011). Los sistemas de expulsión más frecuentes encontrado en *P. aeruginosa* es MexAB-OprM y MexXY-OprM perteneciente a la familia RND y la bomba de salida QepA que disminuye la susceptibilidad a ciprofloxacina y norfloxacina. Su papel es crucial en la resistencia intrínseca de esta bacteria a antibióticos utilizados clínicamente como los β-lactámicos (excepto imipenem), fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol y trimetoprim. La bomba MexXY-OprM importante en expulsión de múltiples antibióticos, especialmente de los aminoglucósidos; recientemente se ha asociado con resistencia al cefepime; sin

embargo, no tiene acción contra cefalosporinas de tercera generación, como la ceftazidima (Peleg *et al.*, 2007).

La expresión de los diversos mecanismos de resistencia que poseen las bacterias ha dado pauta al surgimiento de la resistencia antimicrobiana (RAM) como un problema mundial (Chellat *et al.*, 2016; Ruddaraju *et al.*, 2020).

### 3. Importancia de la resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana se ha propagado a casi todos los antibióticos que se han desarrollado para la aplicación en la clínica, el surgimiento de esta resistencia ha sido paulatina a lo largo de los años conforme han surgido los nuevos compuestos de antimicrobianos. Desde el descubrimiento y uso de la penicilina en los años 40 hasta el desarrollo de los últimos antibióticos, las bacterias han sido capaz de desarrollar resistencia y perturbar la función de los agentes antimicrobianos a corto y mediano plazo (Figura 1).

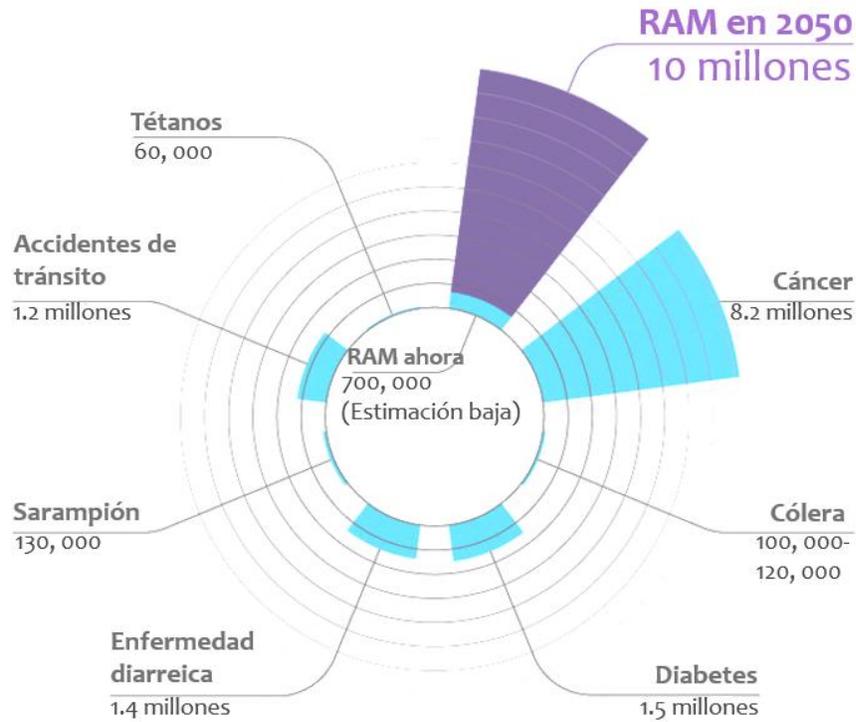


**Figura 1.** Descubrimiento de fármacos antibiótico y desarrollo de resistencia antimicrobiana (Ruddaraju *et al.*, 2020).

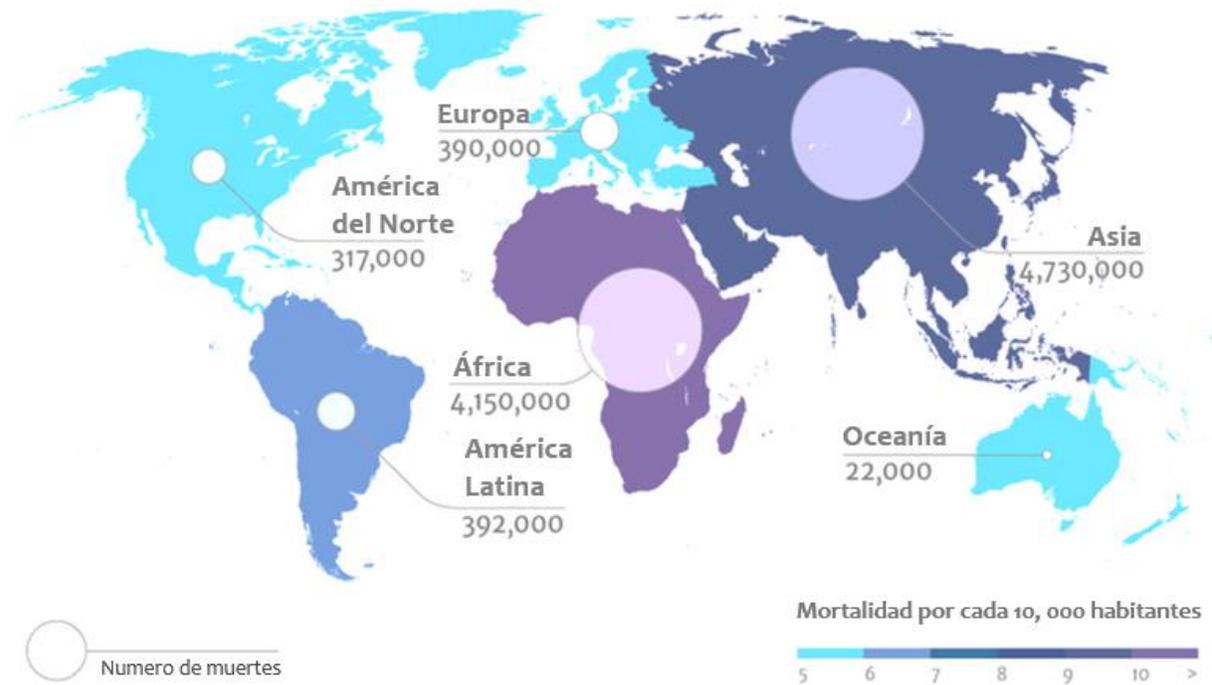
Dado el incremento de bacterias resistentes a múltiples grupos de antibióticos se ha generado un aumento importante en los costos de atención de la salud.

### **3.1. Costos económicos y mortalidad asociados a la resistencia antimicrobiana**

La resistencia antimicrobiana se traduce en un riesgo elevado y complicación de las infecciones producidas por bacterias multirresistentes que eventualmente podría conducir a la muerte del paciente. Debido a las estancias hospitalarias prolongadas, los costos de atención se ven incrementados. En la actualidad aproximadamente a nivel mundial 700,000 muertes al año son atribuidas a la resistencia a los antibióticos, con este ritmo se espera que para el 2050 habrá 10 millones de muertes al año, esta cifra supera los fallecimientos por cáncer y otras enfermedades; el impacto en la economía mundial será de hasta 100 trillones de dólares (Figura 2 y 3) (O' Neill, 2014). Los costos elevados serán el resultado de tratamientos empíricos con antibiótico de amplio espectro. En la actualidad la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en la Unión Europea (UE), los Estados Unidos (EE. UU.) y Tailandia, las bacterias resistentes a los antibióticos son responsables de más de 25,000, 23,000 y 38,000 muertes cada año respectivamente (OMS, 2014).



**Figura 2.** Muertes atribuibles a las RAM cada año en comparación con otras causas de muerte (O' Neill, 2014)



**Figura 3.** Muertes anuales atribuibles en cada continente causadas por la RAM para 2050 (O' Neill, 2014).

Dado los crecientes niveles de resistencia antimicrobiana y los costos asociados a la atención de infecciones producidas por bacterias multirresistentes, se implementó un plan de acción mundial para combatir esta problemática.

### **3.2. Plan de acción mundial ante la resistencia antimicrobiana**

La asamblea Mundial de la salud solicitó a la OMS que propusiera un plan de acción global para hacer frente al problema de la resistencia a los antibióticos mediante cinco objetivos planteados (OMS, 2016).

- i. Mejorar la concientización y la comprensión con respecto a la resistencia a los antimicrobianos a través de una comunicación, educación y formación efectiva.
- ii. Reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación.
- iii. Reducir la incidencia de las infecciones con medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención de las infecciones.
- iv. Utilizar de forma óptima los medicamentos antimicrobianos en la salud humana y animal.
- v. Preparar argumentos económicos a favor de una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países y aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones.

Bajo la premisa del plan de acción mundial de la resistencia antimicrobiana, la OMS agrupó en tres niveles de prioridad a diversas especies bacterianas, dentro de las cuales se encuentran las del grupo *ESKAPE* (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo (i+d) de nuevos antibióticos (OMS, 2017).

<b>Prioridad critica</b>	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Resistente a carbapenémicos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente a carbapenémicos
<i>Enterobacteriaceae</i>	Resistente a carbapenémicos y productores de BLEEs
<b>Prioridad alta</b>	
<i>Enterococcus faecium</i>	Resistente vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente meticilina y resistente a vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i>	Resistente a claritromicina
<i>Campylobacter</i> sp.	Resistente a fluoroquinolonas
<i>Salmonella</i> sp.	Resistente a fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Resistente a cefalosporinas y a fluoroquinolonas
<b>Prioridad media</b>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Resistente a penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i>	Resistente a ampicilina
<i>Shigella</i> sp.	Resistente a fluoroquinolonas

### 3.3. Epidemiología de bacterias del grupo **ESKAPE** en el mundo y en América Latina

Durante el periodo 2007 al 2016 en 15 hospitales de China se evaluaron 2,913 aislamientos clínicos de infecciones intra-abdominales (IAIs) del programa de vigilancia de resistencia a las infecciones nosocomiales (CARES). Las especies más comúnmente aisladas fueron, *E. coli* (n=973/33.4%), *K. pneumoniae* (n=314/10.8%), *E. faecium* (n=312/10.7%), *P. aeruginosa* (n=230/7.9%), *A. baumannii* (n=186/6.4%) *E. faecalis* (n=175/6.0%), *S. aureus* (n=140/4.8%) y *E. cloacae* (n=104/3.6%) (Zhang *et al.*, 2018).

En un estudio realizado entre 2011 y 2015 en nueve hospitales de la provincia de KwaZulu-Natal, Sudáfrica, se aislaron 64,502 bacterias del grupo *ESKAPE* colectadas de sangre, orina, catéter y otros sitios; los resultados mostraron que *S. aureus* se aisló con mayor frecuencia (n=24,495/38%), seguido de *K. pneumoniae* (n=14,282/22.2%), *P. aeruginosa* (n=11,231/17.4%), *A. baumannii* (n=8,010/12.4%), *Enterobacter* sp. (n=4,267/6.6%) y *E. faecium* (n=2,217/3.4%). De los aislamientos provenientes de hemocultivos, *S. aureus* (n= 3,787/35.8%) y *K. pneumoniae* (n=3,059/28.9%) fueron los más prevalentes. En muestras respiratorias, *K. pneumoniae* (n=2,469/29.2%), *A. baumannii* (n=2,036/24.1%) y *P. aeruginosa* (n=2,015/23.8%) fueron los más frecuentes; en orina *K. pneumoniae* fue la mayoritaria (n=4,997/55.5%); de las muestras provenientes de catéter *A. baumannii* (31.5%), *S. aureus* (23.4%) y *K. pneumoniae* (23.1%) fueron los predominantes; en heridas *S. aureus* fue la especie más frecuentemente aislada (53.4%) (Ramsamy *et al.*, 2018).

En un trabajo realizado en el año 2012 en el Instituto Nacional del Cáncer, de la Universidad del Cairo, se analizaron 81 muestras de hemocultivos de bacterias del grupo *ESKAPE*. Los resultados encontrados mostraron la siguiente distribución: *K. pneumoniae* (n=30/37%), *S. aureus* (n=19/23%), *Enterobacter* sp. (n=10/12%), *A. baumannii* (n=8/10%), *P. aeruginosa* (n=7/9%) y *E. faecium* (n=7/9%) (El-Mahallawy *et al.*, 2016).

En un estudio realizado para monitorear las tendencias de resistencia antimicrobiana durante 2013 al 2015 en 37 laboratorios clínicos de 11 países de Asia y el Pacífico, se aislaron 10,667 bacilos Gram-negativos de pacientes hospitalizados con IAIs (n=7,173), y con infecciones del tracto urinario (UTIs) (n=3,494), los resultados mostraron que 4,140 aislamientos pertenecieron a *K. pneumoniae*, *Enterobacter* sp., *P. aeruginosa* y *A. baumannii* aisladas de IAIs (n=3,052/42.5%) y de UTIs (n=1,088/31.1%) (Karlowsky *et al.*, 2017).

En un estudio retrospectivo del 2013 a 2016 en la India, se examinaron 10,113 muestras clínicas provenientes de orina, heridas, infecciones respiratorias y sangre;

en 2,107 de estas muestras se aislaron bacterias del grupo *ESKAPE*. Los resultados de prevalencia mostraron en primer lugar a *S. aureus* (n=575/19.17%), seguido de *K. pneumoniae* (484/16.14%), *P. aeruginosa* (n=329/10.97%), *Acinetobacter* sp. (n=290/9.67%), *Enterococcus* sp. (n=219/7.30%) y *Enterobacter* sp. (n=210/7.00%) (Jagadevi *et al.*, 2018).

Un estudio realizado en dos periodos 2015 y 2017 en un hospital en Iraq, se recolectaron 332 muestras de diferentes fuentes, de las cuales 73/21.98% fueron bacterias del grupo *ESKAPE*; *S. aureus* (n=17/23.28%), *K. pneumoniae* (n=13/17.81%), *A. baumannii* (n=12/16.44%), *E. cloacae* (n=12/16.44%), *P. aeruginosa* (n=11/15.07%) y *E. faecalis* (n=8/10.96%) (Khaled & Abdullah, 2018).

Durante el 2016 en cuatro laboratorios del sector privado en Sudáfrica, se analizaron un total de 9,029 hemocultivos positivos a bacterias del grupo *ESKAPE*, las cuales se encontraron con diferentes frecuencias. *E. coli* n=2,781, *K. pneumoniae* n=2,466, *S. aureus* n=1,514, *P. aeruginosa* n=914, *E. faecalis* n=739, *E. faecium* n=311 y *A. baumannii* n=304 (Perovic *et al.*, 2018).

En un estudio realizado en un hospital en Irán, se aislaron 384 cepas bacterianas del grupo *ESKAPE* provenientes de diversas fuentes, sangre n=87(22.66%), orina n=74(19.27%), herida n=44(11.45%), absceso n=37(9.63%), líquido sinovial n=31(8.07%), catéter n=31(8.07%), tráquea n=29(7.5%), líquido de ascitis n=26(6.77%) y líquido pleural n=25 (6.5%). Las bacterias aisladas fueron: *K. pneumoniae* (n=98/25.52%), *P. aeruginosa* (n=85/22.13%), *S. aureus* (n=73/19.01%), *Enterobacter* sp. (n=69/17.96%), *A. baumannii* (n=37/9.63%), y *E. faecium* (n=22/5.72%) (Navidinia *et al.*, 2017).

En un trabajo realizado en el periodo 2010-2015 en un hospital público de Brasil, se analizaron un total de 2,527 muestras clínicas, de las cuales 577 fueron bacterias del grupo *ESKAPE*, los microorganismos más prevalentes fueron *K. pneumoniae* (41%),

*S. aureus* (22%), *P. aeruginosa* (14%), *Enterobacter* sp. (11%), *A. baumannii* (8%) y *E. faecium* (4%) (Silva *et al.*, 2017).

En un estudio llevado a cabo en 11 países de América Latina durante 2013 al 2015, se analizaron 8,462 aislamientos clínicos de los cuales 3,083 fueron bacterias del grupo *ESKAPE*, Gram negativas (*K. pneumoniae*, *Enterobacter* sp., *P. aeruginosa* y *A. baumannii*), de IAIs (36.7%) y UTIs (36.7%) (Karlowsky *et al.*, 2017).

### **3.4. Epidemiología de bacterias del grupo *ESKAPE* en México**

En el Instituto Nacional de Cancerología en la Ciudad de México, durante 2005 al 2015 se procesaron 33,127 hemocultivos en 6,397 cultivos hubo desarrollo microbiano de estos, 1,811/27.8% fueron bacterias del grupo *ESKAPE*: se encontró a *S. aureus* (n=571/8.7%), *P. aeruginosa* (n=384/5.6%), *K. pneumoniae* (n=367/5.6%), *Enterobacter* sp. (n=250/4.4), *E. faecium* (n=143/2.1%), *A. baumannii* (n=96/1.4%) y otros (4,586/72.2%) (Velázquez-Acosta *et al.*, 2018).

En un monitoreo realizado en el Hospital Universitario de Monterrey, Nuevo León, México, durante 2011 y 2012, se obtuvieron 1,692 aislamientos clínicos de las unidades de cuidados intensivos (UCI) colectados de vías respiratorias, sangre, orina, y otros sitios; en 1,092//64.5% se encontraron bacterias del grupo *ESKAPE*. *A. baumannii* (15.8%), *P. aeruginosa* (14.3%), *S. aureus* (14.2%) y *K. pneumoniae* (11.3%). En muestras respiratorias y sangre *A. baumannii* y *S. aureus* fueron los más frecuentes (18.8%/18.3% y 13.6%/12.3%) respectivamente. En muestras de orina *P. aeruginosa* estuvo presente en un 23.3%, mientras que en muestras de catéter *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* tuvieron 15% en cada una (Llaca-Díaz *et al.*, 2013).

Durante el año 2013 en México, se llevó a cabo un estudio en 197 unidades hospitalarias del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Se obtuvieron 48,377 cultivos asociados a IAAS, en los cuales se identificaron las siguientes especies: *E. coli* (n=8,192/16.9%), *P. aeruginosa* (n=5,275/10.9%), *S. aureus* (n=4,725/9.8%), *K.*

*pneumoniae* (n=3,122/6.5%), *Acinetobacter* sp. (n=1,437/3.0%) y *E. cloacae* (n=1,696/3.5%) (Arias-Flores *et al.*, 2016).

En un estudio realizado en el periodo 2016-2017 en 11 hospitales pertenecientes a la red del plan universitario de control de la resistencia antimicrobiana (PUCRA) se obtuvieron un total de 2,156 aislamientos clínicos a partir de hemocultivos, las prevalencias de bacterias del grupo *ESKAPE* fueron las siguientes; *K. pneumoniae* n=699, *S. aureus* n=566, *P. aeruginosa* n=423, *A. baumannii* n=190 y *E. cloacae* n=219 (Plan Universitario para el Control de Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) UNAM, 2018).

### **3.5. Resistencia de bacterias del grupo *ESKAPE* en el mundo y en América Latina**

En un estudio realizado en 15 hospitales de china en el periodo 2007 al 2016 se evaluaron las tasas de susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos clínicos del grupo *ESKAPE* y se obtuvieron los siguientes resultados: 92% (n=314) de las cepas de *K. pneumoniae* fueron sensibles a meropenem, imipenem y tigeciclina; *P. aeruginosa* 83.4% (n=230) fueron sensibles a amikacina; *A. baumannii* 84.4% (n=186) sensibles a tigeciclina; *S. aureus* 63.6% (n=140) fueron sensibles a meticilina y 36.4% fueron MRSA; *E. faecium* 97.4% (n=312) fueron sensibles a teicoplanina y vancomicina, y el 84% y 1.9% fueron resistentes a ampicilina y vancomicina respectivamente (Zhang *et al.*, 2018).

En un estudio realizado en 15 países de la UE en el periodo 2008-2016 de bacterias asociadas a IAAS adquiridas en la UCI, se encontró que el 29.9% de las cepas de *S. aureus* (n=2,025) fueron resistentes a oxacilina; el 7.3% (n=2,025) de *Enterococcus* sp., fueron resistentes a vancomicina y el 23% de las cepas de *P. aeruginosa* (n=2647) fueron resistentes a ceftazidima; el 37.8% de las cepas de *Klebsiella* sp. (n=3,682) y el 32.1% de las cepas de *Enterobacter* sp. (n=2,714) fueron resistentes a cefalosporinas de tercera generación. La resistencia a carbapenémicos se encontró

en *Klebsiella* sp. (10.7%), *P. aeruginosa* (26.4%) y *A. baumannii* (66.1%) (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

En un estudio realizado en nueve hospitales en Sudáfrica entre 2011 y 2015, se aislaron 64,502 bacterias del grupo *ESKAPE* y se observaron tasas decrecientes de MRSA (28% a 18%) en el periodo 2011 y 2014 y tasas crecientes de *K. pneumoniae* productora de BLEEs 54.6% en 2011 a 65.5% en 2015. Por otro lado, la resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae* y *Enterobacter* sp., fue menor al 6% durante 2011-2014. Sin embargo, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* aumento de 4% en 2014 a 16% en 2015. En el periodo de 2013-2015 *P. aeruginosa* disminuyó la resistencia frente a los siguientes antibióticos; ceftazidima (17% a 13%), piperacilina- tazobactam (27% a 21%), meropenem (18% a 10%), ciprofloxacina (22% a 18%) y amikacina (10% a 8%). La resistencia de *A. baumannii* disminuyo de 85% en 2012 a 70% en 2015 frente a meropenem, imipenem, ciprofloxacina, piperacilina-tazobactam y ceftazidima y los 2,217 aislamientos de *E. faecium* fueron susceptibles a vancomicina y linezolid (Ramsamy *et al.*, 2018).

Durante el 2013 al 2015 en un estudio realizado en 37 laboratorios clínicos de 11 países de Asia y el Pacífico, se monitoreo las tendencias de resistencia antimicrobiana, y se encontró que los perfiles de susceptibilidad en cepas del grupo *ESKAPE* provenientes de pacientes con IAI fueron los siguientes: en *K. pneumoniae* BLEEs positiva (n=244) el 95.1% fueron resistentes a imipenem, 95.5% a ceftriaxona, 80.3% a ceftazidima y 8.1% a amikacina, las cepas de *K. pneumoniae* BLEEs negativa (n=1,261) mostraron porcentajes de resistencias más bajos que fueron del 0.5% al 2.8% en amikacina, imipenem y cefepime; en las cepas de *Enterobacter* sp. (n=661) se observaron porcentajes de resistencia de 0.3%, 7.7% y 8.2% para amikacina, imipenem y levofloxacina, respectivamente; *P. aeruginosa* (n=778) fue sensible a amikacina y cefepime en 95.5% y 85.7% respectivamente y el 15.4% fueron resistentes a imipenem; en las cepas de *A. baumannii* (n=108) se encontró resistencia a cefepime y ceftriaxona (71.3%), ceftazidima (70.4%), imipenem y piperacilina-tazobactam (69.4%) y 57.4% a amikacina (Karlowsky *et al.*, 2017).

En la India en el periodo 2013 a 2016 se evaluó el perfil de susceptibilidad en bacterias del grupo *ESKAPE* y se observó que el 98.6% (n=219) de las cepas de *Enterococcus* sp., fueron resistentes a ampicilina y 62.7% mostraron resistencia a eritromicina; en las cepas de *S. aureus* (n=575) el 97.2% fueron resistentes a ampicilina, cotrimoxazole (78.3%), tetraciclina (71.3%) y gentamicina (66.2%); todas las cepas de *K. pneumoniae* (n=484) fueron resistentes a ampicilina, el 89.4% a cotrimoxazol, 87.3% a ciprofloxacina y el 80.4% a ceftriazona; el 90.5% de las cepas de *Acinetobacter* sp. (n=290) fueron resistentes a ciprofloxacina, 89.2% a levofloxacina y 87.3% a ceftriazona y ceftazidima; para *P. aeruginosa* (n=329) se encontró que el 86.8% fueron resistentes a ciprofloxacina; todas las cepas de *Enterobacter* sp. (n=210) fueron resistente a ampicilina, el 88.4% a cotrimoxazol, 83.1% a ciprofloxacina y el 82.8% a levofloxacina (Jagadevi *et al.*, 2018).

Durante el año 2016 en cuatro laboratorios en Sudáfrica, se analizaron un total de 9,029 hemocultivos, los resultados de susceptibilidad antimicrobiana mostraron que el 56.9% de las cepas de *K. pneumoniae* fueron resistentes a cefotaxima/ceftriaxona, el 55.2% a ceftazidima, 42.5% a gentamicina y el 40.5% tuvieron resistencia a ciprofloxacina; en *A. baumannii* se observó que el 56.3% de las cepas fueron resistentes a meropenem y el 54.3% a imipenem; para *P. aeruginosa* se observó que el 37.8% de las cepas mostraron resistencia a imipenem; para *E. faecium* el 92.1% fueron resistentes a penicilina/ampicilina y el 95.5% fueron sensibles a vancomicina y el 26% de las cepas de *S. aureus* fueron resistente al  $\beta$ -lactámico (Perovic *et al.*, 2018).

En un trabajo realizado en el periodo 2010-2015 en un hospital público de Brasil, se analizaron un total de 2,527 muestras clínicas, de las cuales 577 fueron bacterias del grupo *ESKAPE*. Los resultados de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana mostraron que las cepas de *E. faecium* fueron resistente a eritromicina (95.8%), linezolid (87.5%), daptomicina (83.3%) y el 91.7% fueron resistentes a ciprofloxacina, ampicilina y penicilina. En las cepas de *S. aureus* se observó resistencia a penicilina (96.9%), eritromicina (75%), ciprofloxacina, levofloxacina (63.3%) y oxacilina (40%). La resistencia de *K. pneumoniae* ante aztreonam, cefepime y cefotaxima fue del 75.2%

y para ertapenem fue 69.7%. Todas las cepas de *A. baumannii* fueron sensibles a imipenem, ciprofloxacina, ceftazidima y tuvieron resistencias del 8.9%, 11.2%, 14% y 17.8% a cefotaxima, cefepime, meropenem y levofloxacina respectivamente. La resistencia de *P. aeruginosa* ante ciprofloxacina fue del 54.3%, seguido de levofloxacina e imipenem (53.1%) y norfloxacina (47%). Los porcentajes de resistencias para *Enterobacter* sp. a cefalotina fue del 96% amoxicilina/ ácido clavulánico (87.5%), cefoxitina (79.2%), ampicilina (78.5%) y cefotaxima (73.9%) (Silva *et al.*, 2017).

### **3.6. Resistencia de bacterias del grupo *ESKAPE* en México**

En el Instituto Nacional de Cancerología en la Ciudad de México, durante 2005 al 2015 se analizó el perfil de susceptibilidad de bacterias del grupo *ESKAPE* aisladas de hemocultivo. De las cepas de *E. faecium* (n=143) el 31.5% fueron resistentes a vancomicina; *A. baumannii* (n=96) 24% fueron resistentes a múltiples antibióticos; *S. aureus* (n=571) 21.2% fueron resistentes a metilicina; *K. pneumoniae* (n=367) 11.2% fueron BLEEs positivas; *P. aeruginosa* (n=384) 11.2% fueron resistentes a múltiples antibióticos y *Enterobacter* sp. (n=250) 2.4% fueron BLEEs positivas (Velázquez-Acosta *et al.*, 2018).

En un trabajo realizado en el Hospital Universitario de Monterrey, Nuevo León, México, durante 2011 y 2012, se analizaron los perfiles de susceptibilidad de las bacterias del grupo *ESKAPE* y se obtuvieron los siguientes resultados: *S. aureus* (n= 242) resistente a ampicilina 90% y penicilina 89.3%; todas las cepas de *K. pneumoniae* (n=192) fueron resistentes a ampicilina y ticarcilina y 54.7% a cefuroxima; en las cepas de *A. baumannii* (n=268) se observó resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol (86.9%) y cefotaxima (86.1%); *P. aeruginosa* (n=242) mostró resistencia a cloranfenicol en un 95.4%; todas las cepas de *Enterobacter* sp. (n=114) fueron resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico (Llaca-Díaz *et al.*, 2013).

En un estudio realizado en 2018 en 47 centros hospitalarios de 20 estados de la república mexicana se evaluó la tasa de resistencia a los antimicrobianos, de 22,943 cepas Gram-negativas y positivas, 10,294 pertenecieron al grupo de bacterias *ESKAPE*. Los resultados para los Gram-negativos fueron los siguientes: Más del 50% de las cepas de *Klebsiella* sp. (n=3,334) fueron resistentes a ampicilina-sulbatam, aztreonam, cefazolina, ceftriaxona y trimetoprim-sulfametoxazol y el 46% fue resistente a gentamicina. Las cepas de *P. aeruginosa* (n=1,995) mostraron resistencia a imipenem (29.9%), meropenem (27.8%), ciprofloxacina (18.6%), amikacina (17.3%) y gentamicina (16.7%); *Enterobacter* sp. (n=1,334) mostró resistencia a cefazolina (91.7%), ceftriaxona (42.1%), gentamicina (15.8%), ciprofloxacina (13.8%) y amikacina (6.1%); *Acinetobacter* sp. (n=861) mostró resistencia a ciprofloxacina (82.3%), meropenem (79.6%), y gentamicina (42.5%). Los resultados para bacterias Gram-positivas fueron los siguientes: las cepas de *S. aureus* (n=2,646) mostraron resistencia a penicilina (90.3%), ciprofloxacina (26.3%), oxacilina (23.1%), y gentamicina (8.4%); *E. faecium* (n=124) mostro resistencia a ciprofloxacina (60.8%) y vancomicina (20.7%). En este mismo estudio se evaluó la multirresistencia de bacterias del grupo *ESKAPE*: *Acinetobacter* sp. multidrogo resistente (MDR) (459/53.0%), posibles extremadamente resistentes (XDR) (372/43.2%), XDR (76/8.8%) y posibles pandrogo resistentes (PDR) (334/38.8%); *Klebsiella* sp. MDR (752/22.6%); *Enterobacter* sp. MDR (159/11.9%); *P. aeruginosa* MDR (175/8.8%), posibles XDR (165/8.3%), XDR (3/0.2%) y posibles PDR (87/4.4%) (Garza-González *et al.*, 2019).

En un estudio multicéntrico en hospitales públicos y privados de México, se evaluó el perfil de resistencia de bacterias del grupo *ESKAPE* y se encontró que *S. aureus* (n=40) y *K. pneumoniae* (n=38) fueron las especies más frecuentes, *S. aureus* mostró resistencia a daptomicina y oxacilina 77.5% y 50% respectivamente y *K. pneumoniae* fue resistente a moxifloxacina (76.3%), piperacilina (73.6%), gentamicina y meropenem (23.4%) (Gutiérrez Muñoz *et al.*, 2017).

En un estudio realizado en el periodo 2016-2017 en 11 hospitales pertenecientes a la red del Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) se

analizaron los perfiles de susceptibilidad de las bacterias del grupo *ESKAPE* y se obtuvieron los siguientes resultados: *K. pneumoniae* (n=699) mostro resistencia a ampicilina (692/99%), ceftazidima y cefotaxima (436/62%), ciprofloxacina (268/38%) y amikacina (89/13%); *S. aureus* n=566 mostro resistencia a eritromicina (224/40%), clindamicina (204/36%), ciprofloxacina (184/32%), oxacilina (168/30%) gentamicina (88/15%); *P. aeruginosa* n=423 mostro resistencia a meropenem (140/33%), cefepime (92/22%), Ceftazidima (88/21%); *E. cloacae* (n=219) mostro resistencia a cefepime (134/61%), cefuroxima (120/55%) y *A. baumannii* n=190 mostro resistencia a amikacina (50/92%), ciprofloxacina (154/81%) y ampicilina (143/75%) (Plan Univeristario para el Control de Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) UNAM, 2018)

Diversos estudios han demostrado la presencia en aguas residuales a bacterias resistentes a múltiples antibióticos. Las PTAR parecen ser efectivas para eliminar bacterias resistentes a los antibióticos durante el proceso de tratamiento. Sin embargo, es posible que las plantas de tratamiento funcionen como una incubadora de resistencia a los antibióticos bajo ciertas condiciones (Michael *et al.*, 2013; Rizzo *et al.*, 2013; Pärnänen *et al.*, 2019).

#### **4. Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales**

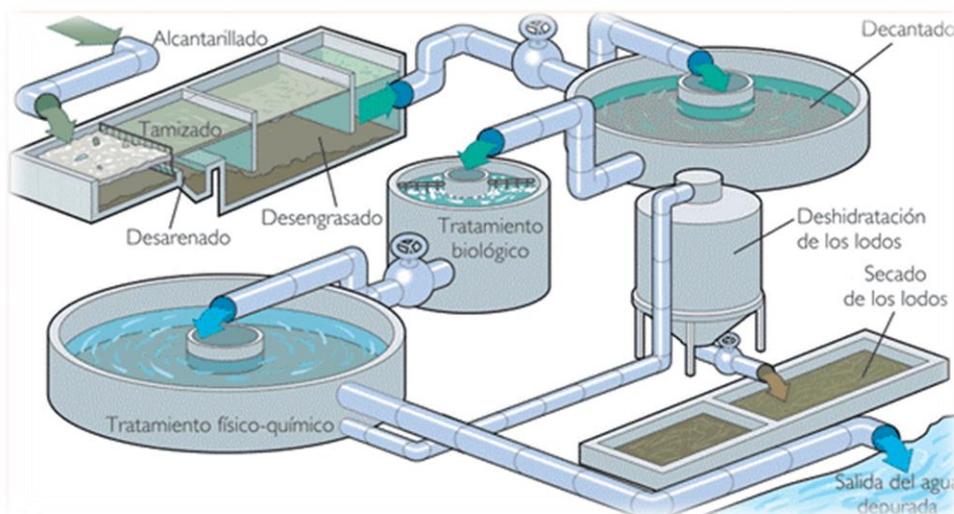
Una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) es una instalación en la que se utiliza una combinación de procesos, físicos, químicos y biológicos para tratar aguas de efluentes de uso humano y aguas industriales, con el objetivo de eliminar contaminantes y obtener un efluente tratado y que pueda ser reutilizable en el ambiente (Hreiz *et al.*, 2015). Las aguas residuales son aquellas cuyas características originales han sido modificadas por actividades humanas y que por su calidad requieren un tratamiento previo, antes de ser reusadas o vertidas a un cuerpo natural de agua o descargadas al sistema de alcantarillado; estas son una mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas, suspendidas o disueltas. La mayor parte de materia orgánica consiste en residuos alimenticios, excretas, materia vegetal, sales

minerales y materiales diversos como jabones y detergentes sintéticos (CONAGUA, 2015).

#### 4.1. Tipo de tratamientos

Los tipos de aguas residuales incluyen: aguas residuales municipales, aguas residuales industriales, mezclas de aguas residuales industriales / domésticas y aguas residuales agrícolas. Las aguas residuales se originan a partir de las aguas residuales domésticas, desechos industriales, desechos de animales, escorrentía de lluvias e infiltración de aguas subterránea. Las aguas residuales constan de un 99.9% de agua y el 0.1% de sólidos, sea material suspendido o disuelto (Gray, 2010).

Por razones de salud pública, las aguas residuales no se desechan en lagos o corrientes sin tratamiento previo; la materia orgánica se elimina por métodos mecánicos y químicos; pero si el material es de naturaleza orgánica, el tratamiento es biológico, implicando actividad microbiana. El tratamiento de las aguas residuales es un proceso complejo, donde se distinguen cuatro etapas (pretratamiento, tratamiento primario, secundario y terciario) que comprenden procesos físicos químicos y biológicos (Figura 4) (Abarca MS, 2007).



**Figura 4.** Etapas de tratamiento de las aguas residuales en la planta de tratamiento (Menéndez & García, 2013).

#### **4.1.1. Pretratamiento**

El pretratamiento es un proceso de eliminación de constituyentes de mayor tamaño como arenas o basura cuya presencia puede provocar problemas de mantenimiento y funcionamiento de los diferentes procesos operaciones y sistemas auxiliares (Orta Arrazcaeta, 2002; CONAGUA, 2015).

#### **4.1.2. Tratamiento primario**

El tratamiento primario es un proceso físico, destinado a remover solidos de menor tamaño, a través de la sedimentación, con el fin de mejorar el tratamiento del agua residual en las unidades subsecuentes. Esta etapa permite eliminar el 90% de los sólidos sedimentables y el 65% de los sólidos en suspensión, además disminuye un 35% de la demanda bioquímica de oxígeno (Delgadillo & Condori, 2010; CONAGUA, 2015).

#### **4.1.3. Tratamiento secundario**

Es la degradación de la materia orgánica presente en el agua residual, mediante procesos biológicos llevados a cabo por microorganismos. Esta etapa de tratamiento puede ser aeróbica, en donde los microorganismos degradan la materia orgánica transformándola en dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y moléculas de agua. En el tratamiento anaeróbico la materia orgánica contenida en un sustrato es convertida en una mezcla de gases conocida como biogás principalmente metano y dióxido de carbono (Perez, 2012; CONAGUA, 2015).

#### **4.1.4. Tratamiento terciario**

El tratamiento terciario consta de un proceso químico para aumentar la calidad del efluente, el proceso de la cloración tiene la finalidad de eliminar microorganismos, reducir la demanda bioquímica de oxígeno, eliminar o reducir colores y olores. Los

compuestos de cloro más utilizados son el gas cloro ( $\text{Cl}_2$ ), el hipoclorito sódico ( $\text{NaClO}$ ) y el dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) también se adicionan sustancias flocculantes (químicos que aceleran la sedimentación de sólidos suspendidos) como el aniónico sólido o líquido, catiónico sólido seguido de la remoción física de sedimentos y finalmente la decantación (CONAGUA, 2015).

## **5. Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) y Resistencia Antimicrobiana (RAM)**

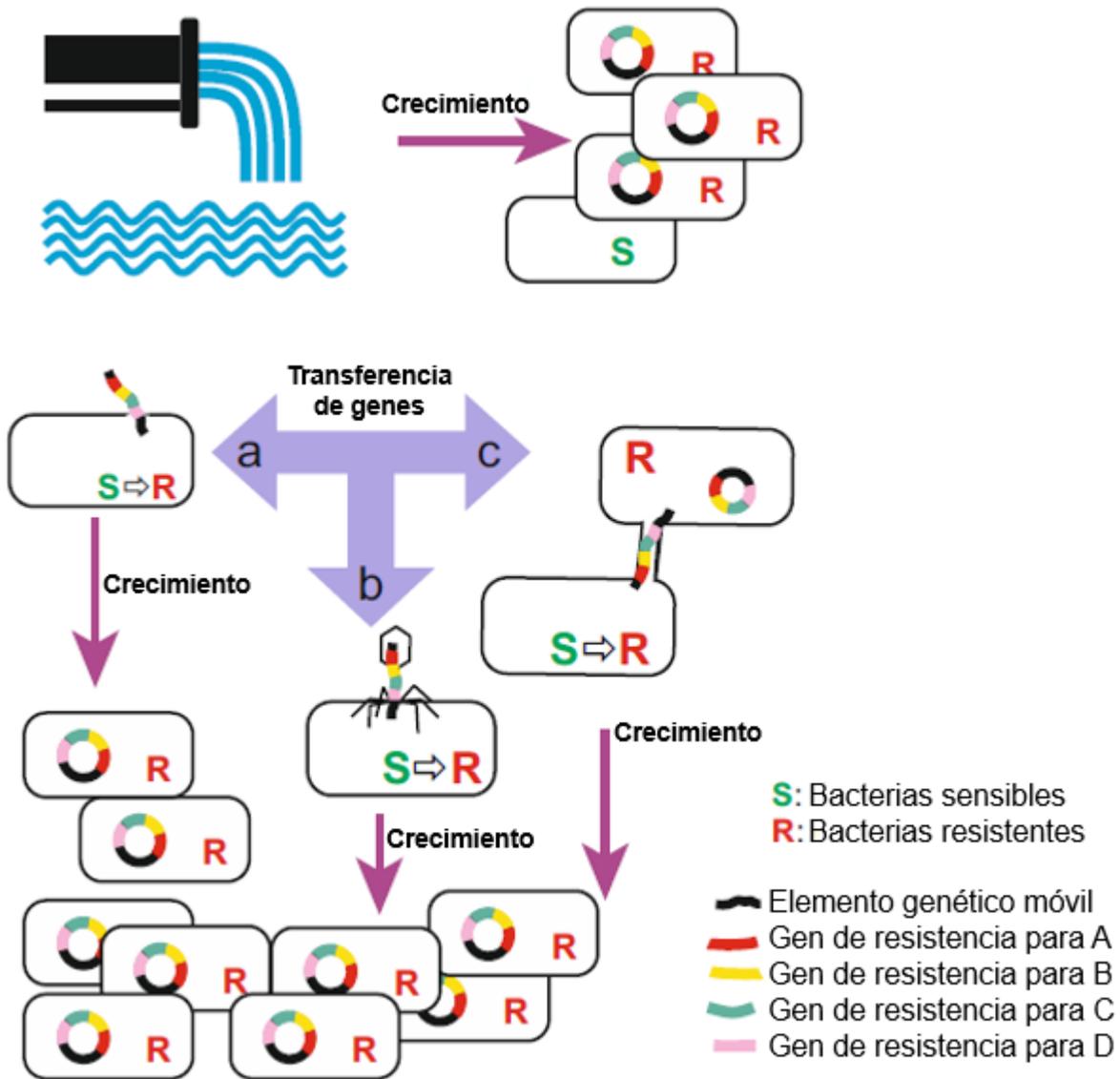
Los efluentes hospitalarios contienen patógenos y diversos agentes químicos que inducen a la resistencia bacteriana escapando fácilmente de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Una porción de antimicrobianos administrados a los humanos se usan en el hogar y eventualmente terminan en las aguas residuales, las PTAR funcionan como reservorios de antibióticos, genes de resistencia a los antimicrobianos (GRA) y bacterias resistentes de diferentes entornos, además son fuentes importantes para el desarrollo de resistencia a los antibióticos y proporcionan una ruta potencial de diseminación de los GRA, las aguas residuales incorporadas a las PTAR combinan excretas y residuos producidos en un área determinada. Se ha propuesto que las PTAR son puntos críticos para la transferencia horizontal de genes entre diferentes especies bacteriana, permitiendo la aparición y diseminación de la resistencia (Rizzo *et al.*, 2013).

Una vez que las bacterias resistentes ingresan a las PTAR pueden diseminar sus determinantes de resistencia entre las bacterias de la comunidad microbiana endógena y las que transitan a través de las PTAR. Se han encontrado bacterias resistentes en las PTAR y en sus efluentes, lo que denota que las PTAR no son completamente efectivas para eliminar estas bacterias (Bouki *et al.*, 2013; Rizzo *et al.*, 2013; Berendonk *et al.*, 2015). Sin embargo, los niveles de resistencia se reducen debido al tratamiento, ya que las cargas bacterianas y los GRA se reducen significativamente, pero no se eliminan en su totalidad (Bengtsson-Palme *et al.*, 2016). En general, los efluentes hospitalarios contribuyen con menos del 1% de la cantidad

total de las aguas residuales, por lo que las aguas residuales hospitalarias se diluyen ampliamente en las PTAR, planteando que los demás efluentes que llegan a las PTAR contienen gran cantidad de bacterias resistentes (Yang *et al.*, 2014).

Los factores que contribuyen a la resistencia a los antibióticos durante el proceso de tratamiento de aguas residuales, son la formación de partículas de lodo con microorganismos que acumulan y liberan plásmidos bacterianos portadores de GRA, facilitando el intercambio de genes de resistencia entre diversos géneros bacterianos, otro factor es la presencia de antibióticos que a bajas concentraciones pueden inducir respuestas genéticas conduciendo a adaptaciones y mutaciones en la población microbiana. Por lo tanto, los métodos convencionales de tratamiento de aguas residuales basados en lodos activados proporcionan las condiciones ideales para la transferencia de GRA (Huang *et al.*, 2014).

El ambiente de aguas residuales provoca una presión de selección por las concentraciones de antibióticos, metales o biocidas, conduciendo a la diseminación de bacterias resistentes, destacando que las bacterias sensibles endógenas en este ambiente pueden adquirir genes de resistencia mediante transferencia horizontal, conjugación, transformación o transducción convirtiéndose en bacterias resistentes a los antibióticos (Figura 5).



**Figura 5.** Selección y transferencia de genes de resistencia a los antibióticos en aguas residuales (Karkman *et al.*, 2018).

### 5.1. Prevalencia de bacterias del grupo *ESKAPE* en aguas residuales

De febrero 2011 abril 2013 se tomaron 20 muestras de aguas residuales en cinco ciudades de Nigeria, las muestras se dividieron en tres tipos: muestras de aguas residuales, plantas de tratamiento y agua de río, en el estudio se observó la siguiente distribución: en muestras de aguas residuales (*Acinetobacter* sp. n= 25, *Enterobacter* sp. n=20, *K. pneumoniae* n=14, *Enterobacter hormaechei* n=6, *Pseudomonas* sp. n=6 y *Staphylococcus* sp. n=6), en plantas de tratamiento (*Pseudomonas* sp. n=3, *K.*

*pneumoniae* n=2, *Acinetobacter* sp. n=1, *Enterobacter hormaechei* n=1, *Enterobacter* sp. n=1 y *Staphylococcus* sp. n=1) y en agua del río n=17 (*Acinetobacter* sp. n=5, *Pseudomonas* sp. n=4, *Enterobacter* sp. n=3, *K. pneumoniae* n=2, *Staphylococcus* sp. n=2 y *Enterobacter hormaechei* n=1) y otras especies en los tres tipos de muestra (n=151) (Obayiuwana *et al.*, 2018).

Un estudio realizado en la India durante 2013-2014 en una PTAR de un hospital, se obtuvieron 140 muestras de aguas residuales de las cuales se obtuvieron 106 microorganismos, cuyos resultados mostraron la siguiente distribución: *S. aureus* (11.42%), *P. aeruginosa* (9.28%), *K. pneumoniae* (8.57%) y otros (70.73%) (Kalaiselvi *et al.*, 2016).

En un estudio realizado en 2014 en 12 hospitales de Nueva Delhi en la India, se recolectaron muestras de aguas residuales del efluente, y se realizaron cultivos para identificar enterobacterias resistentes a carbapenémicos (RCB) y BLEEs; en los hospitales grandes las cepas RCB (n=953) fueron: *K. pneumoniae* (26%), *A. baumannii* (11%), *E. cloacae* (6%), *E. aerogenes* (1%) y otras especies (56%); en los hospitales pequeños las cepas CBR (n=494) fueron: *A. baumannii* (25%), *K. pneumoniae* (14%), *E. cloacae* (11%), *E. aerogenes* (5%) y (45%) otras especies. En los hospitales grandes las cepas BLEEs (n=748) fueron: *K. pneumoniae* (19%), *E. aerogenes* (12%), *E. cloacae* (3%) y otras (66%), en los hospitales pequeños las cepas BLEEs (n=452) fueron: *E. aerogenes* (15%), *K. pneumoniae* (12%), *E. cloacae* (4%) y otras especies (69%) (Lamba *et al.*, 2017).

De octubre de 2017 a marzo 2018 en hospitales de Grecia se investigó la prevalencia de bacterias aisladas a partir de 12 muestras de aguas residuales en donde se identificaron 70 cepas del grupo *ESKAPE* con los siguientes resultados; *K. pneumoniae* (n=24), *P. aeruginosa* (n=9), *Enterococcus* sp. (n=7), *S. aureus* (n=6) y otros (n=24) (Sakkas *et al.*, 2019).

En un estudio realizado en Hong Kong, se tomaron nueve muestras del afluente y efluente de tres PTAR, se detectaron un total de 16 especies bacterianas de las cuales 10 especies eran bacterias potencialmente patógenas, lo que representó el 48.7% de todas las bacterias resistentes identificadas: *Aeromonas*, *Escherichia*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (74.4%), destacando cuatro especies del grupo *ESKAPE*, *A. baumannii* (6.6%), *K. pneumoniae* (5.5%), *P. aeruginosa* (3.3%) y *E. faecium* (2.6%) (Che *et al.*, 2019).

En un estudio realizado en PTAR de seis regiones en el sur de India, se aislaron un total de 101 bacterias Gram negativas, entre ellas *P. aeruginosa* con 15 aislamientos y otras especies no incluidas en el grupo *ESKAPE* (n=86) (Manohar *et al.*, 2017).

## **5.2. Resistencia de bacterias del grupo *ESKAPE* en aguas residuales**

En un estudio realizado en 2014 en Croacia se muestrearon aguas residuales de una PTAR, las aguas provenían de un sistema combinado de alcantarillado doméstico, aguas hospitalarias, industriales y pluviales, los resultados obtenidos mostraron 21 cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos, levofloxacina y ciprofloxacina y 20 de ellas resistente a gentamicina (Hrenovic *et al.*, 2016).

De octubre de 2017 a marzo 2018 se analizó el perfil de resistencia de bacterias aisladas de 12 muestras de aguas residuales de hospitales del noroeste de Grecia, en donde se identificaron 46 cepas del grupo *ESKAPE*: *K. pneumoniae* (n=24) resistentes a tobramicina y ceftriazona, 95.8% resistente a ceftazidima y trimetoprim/sulfametoxazol; *P. aeruginosa* (n=9) todas resistentes a tobramicina y a meropenem, 88.8% resistentes a amikacina, gentamicina, ciprofloxacina e imipenem; *Enterococcus ssp.* (n=7) el 85.5% fueron resistentes a ampicilina y el 71.4% a linezolid, eritromicina, ciprofloxacina y tetraciclina; *S. aureus* (n=6) fue resistentes a penicilina, eritromicina y ciprofloxacina (Sakkas *et al.*, 2019).

En un estudio realizado en la India se muestrearon PTAR para conocer el perfil de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias Gram-negativas, se aislaron un total de 101 cepas de diferentes géneros, la única especie relacionado al grupo *ESKAPE* fue *P. aeruginosa* (n=15), todas las cepas fueron resistentes a ampicilina, eritromicina (87%), azitromicina y amikacina (73%), cefotaxima y amoxicilina ácido clavulánico (67%), clindamicina (60%), y meropenem (20%) y el 73% de las cepas se consideraron como multirresistentes (Manohar *et al.*, 2017).

Actualmente, los estudios que evalúan el alcance y la frecuencia de la resistencia a los antibióticos en las PTAR se basan principalmente en la aplicación de técnicas moleculares (PCR cuantitativo, la secuenciación metagenómica y secuenciación masiva del genoma) permitiendo la detección y cuantificación de cientos de genes (Karkman *et al.*, 2016; Muziasari *et al.*, 2016; Muurinen *et al.*, 2017).

## 6. JUSTIFICACIÓN

La resistencia antimicrobiana es un tema preocupante debido al incremento en la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos; un grupo reducido de bacterias se encuentra involucrado en infecciones hospitalarias y comunitarias, y es conocido como grupo *ESKAPE*. Estas bacterias pueden ser diseminadas al ambiente a través de las aguas residuales que llegan a las plantas de tratamiento. Las PTAR son consideradas como reservorios y sitios de diseminación de genes y bacterias resistentes, a partir de las cuales se puede propagar la resistencia antimicrobiana. La detección de marcadores de resistencia en este entorno, resulta importante para generar la evidencia científica necesaria para proponer medidas de control de la resistencia antimicrobiana.

## 7. HIPÓTESIS

La presión selectiva que ejercen los antibióticos utilizados en el ambiente hospitalario, cuyas trazas son dispuestas en la PTARs de los hospitales a través de la descarga de aguas residuales favorece el intercambio de marcadores de resistencia entre las bacterias del mismo o diferente género, por lo que se esperaría que las bacterias del grupo *ESKAPE* aisladas de las aguas residuales muestren un patrón fenotípico de multi-resistencia.

## **8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son los marcadores fenotípicos de resistencia antimicrobiana que expresan las bacterias del grupo *ESKAPE* aisladas de aguas residuales?

## **9. OBJETIVO GENERAL**

Detectar los marcadores fenotípicos de resistencia antimicrobiana que expresan las bacterias del grupo *ESKAPE* aisladas de aguas residuales.

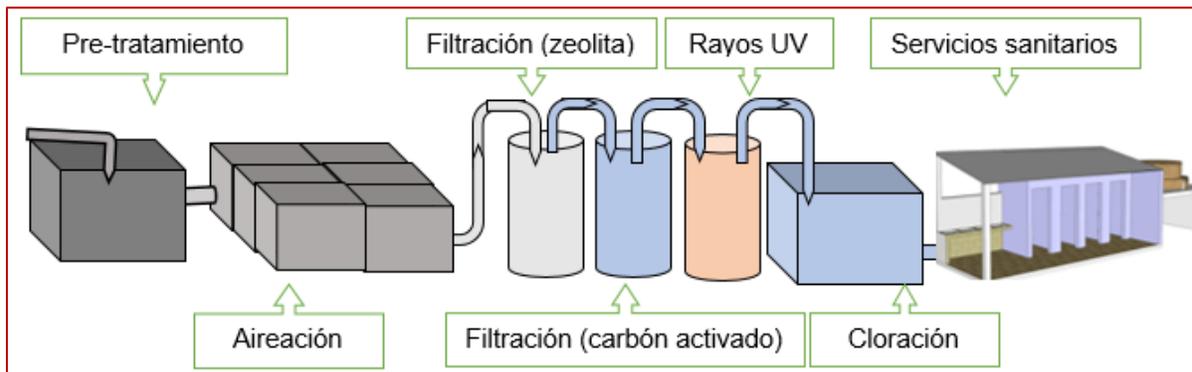
### **9.1. Objetivos específicos**

- a) Identificar las especies de bacterias del grupo *ESKAPE* presentes en aguas residuales no tratadas.
- b) Identificar las especies de bacterias del grupo *ESKAPE* presentes en aguas residuales tratadas.
- c) Determinar el fenotipo de resistencia de las bacterias del grupo *ESKAPE* aisladas de aguas residuales.

## 10. METODOLOGÍA

### 10.1. Área de estudio

Este estudio se llevó a cabo en la planta de tratamiento de aguas residuales del Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca (HRAEI). Ubicado en la Carretera Federal México-Puebla km 34.5; Pueblo de Zoquiapan, Ixtapaluca Estado de México C.P. 56530. El HRAEI opera con 246 camas censables, 186 camas no censables y 14 quirófanos. La PTAR adjunta al HRAEI tiene diferentes procesos de tratamiento los cuales incluye: pretratamiento, aireación y desinfección microbiológica (Figura 6).



**Figura 6.** Planta de tratamiento de aguas residuales en el Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca.

### 10.2. Diseño de estudio

Estudio de tipo transversal observacional descriptivo, con un muestreo por conveniencia. Proyecto anidado al proyecto titulado “*Mapa de uso clínico de antibióticos y de reservorio de genes de resistencia bacteriana en el ambiente de tratamiento de aguas residuales.* **CI-2512018/1533**. Se tomó una muestra de un litro de agua residual y un litro de agua tratada, en la entrada y la salida de la PTAR. Estas muestras fueron transportadas a 4°C al laboratorio de la Dra. Celia Alpuche Aranda, ubicado en el Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos.

### 10.3. Análisis microbiológico

Para el análisis microbiológico se utilizó una alícuota de 50 ml de agua residual y una alícuota de 100 ml de agua tratada. Ambas alícuotas fueron centrifugadas a 5,000 rpm durante 20 minutos. Se decantó y desechó el sobrenadante, las pastillas obtenidas fueron re-suspendidas en 10 ml de amortiguador de fosfato salino (PBS). A partir de esta suspensión, se realizó una dilución 1:10; 50 µl de esta dilución fue sembrada en cuatro medios cromogénicos.

#### 10.3.1. Selección de medios cromogénicos

Para la siembra de las muestras se ocuparon los siguientes cromo-agares: *HiCrome Enterococcus faecium Agar Base™*, *Rapid HiEnterococci Agar™*, *HiCrome ECC Agar™*, *HiCrome Acinetobacter Agar Base™*, los cuales son medios de cultivo que contienen cromógenos que sirven para detectar distintas enzimas producidas por la bacteria durante sus procesos metabólicos. Cuando la bacteria produce la enzima específica, hidroliza el sustrato liberando un compuesto cromogénico, debido a una reacción enzima-sustrato la colonia bacteriana adquiere un color específico. Las enzimas pueden ser específicas de un género, una especie o un grupo reducido de especies de bacterias. Estos cromo-agares utilizados identifican presuntivamente las bacterias del grupo *ESKAPE*, a través de diferente coloración como se indica en el Cuadro 2. Se utilizaron cepas controles del ATCC® para cada género bacteriano del grupo *ESKAPE*.

**Cuadro 2.** Medios de cultivo cromogénicos y cepas ATCC® recomendadas para cada cromo-agar.

<b>Cromo-agares</b>	<b>Bacteria identificada</b>	<b>Color</b>	<b>ATCC®</b>
HiCrome <i>Enterococcus faecium</i> Agar Base	<i>E. faecium</i>	Verde	<i>E. faecium</i> ATCC® 19434
Rapid HiEnterococci Agar	<i>S. aureus</i>	Sin color	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923
HiCrome™ ECC Agar	<i>K. pneumoniae</i>	Rosa	<i>K. pneumoniae</i> ATCC® 13883 <i>E. coli</i> ATCC 25922
HiCrome <i>Acinetobacter</i> Agar Base	<i>A. baumannii</i>	Morado	<i>A. baumannii</i> ATCC® BAA1605
HiCrome™ ECC Agar	<i>P. aeruginosa</i>	Paja	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853

### 10.3.2. Características de los cromo-agares utilizados

- *HiCrome Enterococcus faecium Agar Base*: El principio del medio cromogénico se sustenta en que las especies de *Enterococcus* sp. poseen la enzima glucosidasa, que enciende específicamente el sustrato cromogénico p-nitrofenol-glucósido (pNPG) para producir colonias de color azul. *E. faecium* fermenta arabinosa; y escinde el sustrato cromogénico presente en el medio para producir colonias de color verde junto con coloración amarilla en el medio.
- *Rapid HiEnterococci Agar*: Las especies de *Enterococcus* sp. poseen la enzima β-glucosidasa que enciende el sustrato cromogénico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido), dando como resultado un color verde azulado.
- *HiCrome™ ECC Agar*: La especie de *K. pneumoniae* contiene la enzima galactosidasa que enciende el sustrato cromogénico X-glucurónido Salmon-GAL (6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido) dando como resultado colonias de color rosa.
- *HiCrome Acinetobacter Agar Base*: La peptona especial aporta compuestos nitrogenados, carbonosos, aminoácidos, vitaminas y otros factores de

crecimiento esenciales para el organismo. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. La mezcla selectiva inhibe los organismos Gram-positivos. El sustrato cromogénico ( $\beta$ -alanil pentilresorufamina), es hidrolizado por la enzima  $\beta$ -alanil aminopeptidasa presente en bacterias del orden Pseudomonales esta reacción enzima-sustrato en el medio permite la diferenciación de especies de *Acinetobacter* de otros organismos.

### 10.3.3. Preparación de los cromo-agares

Se prepararon los cromo-agares previamente descritos, a los cuales se les agregaron los siguientes antimicrobianos: cefotaxima (CTX), ceftazidima (CTZ), imipenem, gentamicina, ciprofloxacina, oxacilina y vancomicina. Las concentraciones utilizadas para cada uno de estos antimicrobianos se asignaron con base en lo indicado en (CLSI, 2019), mismas que se describen en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Concentraciones de antibióticos utilizados para los diferentes géneros del grupo *ESKAPE* (CLSI, 2019).

Cromo-agares	Bacteria del grupo <i>ESKAPE</i>	Antimicrobiano utilizado	Concentración utilizada ( $\mu$ g/ml)
<b>HiCrome <i>Enterococcus faecium</i> Agar Base</b>	<i>E. faecium</i>	vancomicina	4
		ciprofloxacina	2
<b>Rapid HiEnterococci Agar</b>	<i>S. aureus</i>	oxacilina	4
		vancomicina	4
		gentamicina	8
		ciprofloxacina	2
<b>HiCrome™ ECC Agar</b>	<i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i>	cefotaxima	2
		ceftazidima	8
		imipenem	2
		gentamicina	8
		ciprofloxacina	2
<b>HiCrome <i>Acinetobacter</i> Agar Base</b>	<i>A. baumannii</i>	cefotaxima	2
		ceftazidima	8
		imipenem	2
		gentamicina	8
		ciprofloxacina	2

#### **10.3.4. Siembra en cromos-agares**

A partir de la dilución (1:10) de cada muestra, se tomaron 50 µl que fueron inoculados en los cromos-agares con las diferentes concentraciones de antimicrobianos, mediante la técnica de estría abierta o espatulado. Una vez sembradas fueron incubadas a 37°C por 18-24 horas. Posterior al periodo de incubación se seleccionó de cada medio cromogénico una colonia presuntiva de cada género del grupo *ESKAPE* para la muestra de agua residual y agua tratada, basado en el color de la colonia como se indica en el cuadro 2. Cada colonia seleccionada fue resembrada e incubada a 37°C por 18-24 horas, con la finalidad de tener cultivos puros de cada género del grupo *ESKAPE* identificado presuntivamente.

#### **10.3.5. Conservación de las cepas**

Las cepas aisladas de la muestra de agua residual y tratada que fueron identificadas presuntivamente por cromosagar, fueron conservadas con el marcador de resistencia respectivo en crioviales con 2 ml con caldo Luria Bertani y glicerol al 90% a -80°C. Cada vial fue rotulado con el género presuntivo, fecha y código del hospital.

### **10.4. Identificación de género y especie**

#### **10.4.1. Sistema de identificación API® BioMérieux<sup>MR</sup>**

Es un sistema estandarizado y miniaturizadas de múltiples pruebas de substratos bioquímicos para la identificación bacteriana. Aunque tienen el mismo fundamento, difieren en el número, tipo de pruebas que permite realizar. Las pruebas de los substratos deshidratados indican la presencia o ausencia de una enzima, de un grupo de enzimas o de una vía metabólica completa en uno o más microorganismos. Los microtubos se inocularon con una suspensión bacteriana ajustada al 0.5 del estándar de McFarland equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml en solución salina. Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, espontáneos o bien provocados mediante la adición de reactivos. Las lecturas de estas reacciones se

realizaron con la ayuda de la tabla de lectura y la identificación se obtuvo con la ayuda del software de identificación API web®.

#### **10.4.1.1. API® 20Strep**

La prueba *API® 20Strep*, es un sistema estandarizado para la identificación de la mayoría de los *Streptococcus* sp. y *Enterococcus* sp. La galería incluye 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados para la detección de actividades enzimáticas o de fermentación de azúcares (Anexo 1).

#### **10.4.1.2. API® 20Staph**

La prueba *API® Staph*, es un sistema estandarizado de identificación de los géneros *Staphylococcus* sp. *Micrococcus* sp. y *Kocuria* sp. La galería incluye 20 microtubos que contiene sustratos deshidratados (Anexo 2).

#### **10.4.1.3. API® 20E**

La prueba *API® 20E*, es un sistema estandarizado de múltiples pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de la familia Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram-negativos. La prueba consta de 21 pruebas bioquímicas miniaturizadas en una galería reactiva que posee 20 microtubos con sustratos deshidratados (Anexo 3).

#### **10.4.1.4. API® 20NE**

La prueba *API® 20NE*, es un sistema estandarizado para la identificación de los bacilos Gram-negativos no enterobacterias y no fastidiosos (*Pseudomonas* sp. *Acinetobacter* sp. *Flavobacterium* sp. *Moraxella* sp. *Vibrio* sp. *Aeromonas* sp. etc.), que incluye pruebas estandarizadas y miniaturizadas (Anexo 4).

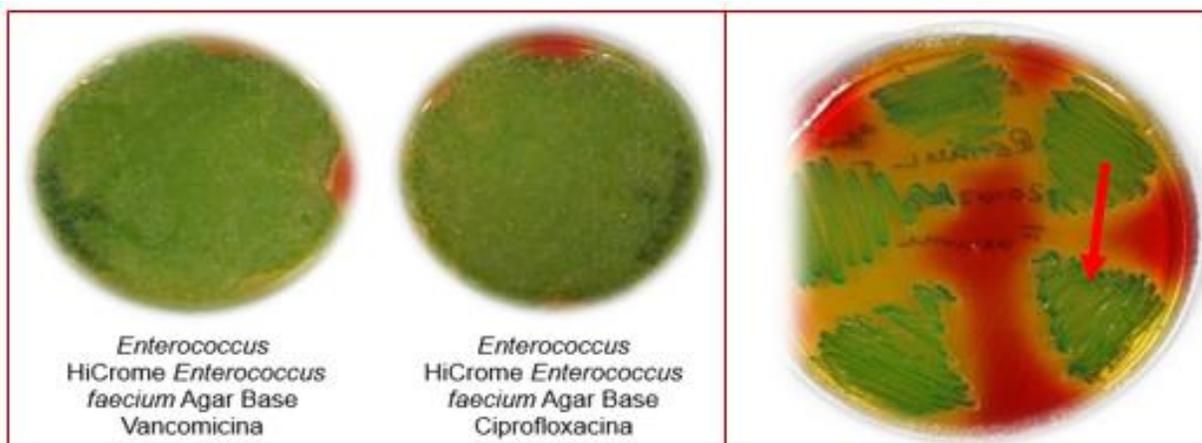
## 11. RESULTADOS

### 11.1. Identificación presuntiva de bacterias *ESKAPE* en aguas residuales

La siembra de las muestras de agua residual y tratada en medios cromogénicos, permitió aislar e identificar presuntivamente bacterias de los géneros: *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella* y *Acinetobacter*. Los resultados se describen a continuación para cada género.

#### 11.1.1. *Enterococcus faecium*

De la muestra de agua residual sembrada en *HiCrome Enterococcus faecium* Agar Base con vancomicina y ciprofloxacina, se aislaron presuntivamente bacterias del género *Enterococcus* que tuvieron desarrollo en presencia de los antibióticos probados (Figura 7).



**Figura 7.** Crecimiento presuntivo de *Enterococcus* sp. proveniente de las muestras de agua residual. La flecha roja indica el crecimiento positivo de esta especie.

#### 11.1.2. *Staphylococcus* sp.

De la muestra de agua residual sembrada en *Rapid HiEnterococci* con oxacilina, vancomicina, gentamicina y ciprofloxacina, se aislaron presuntivamente bacterias del

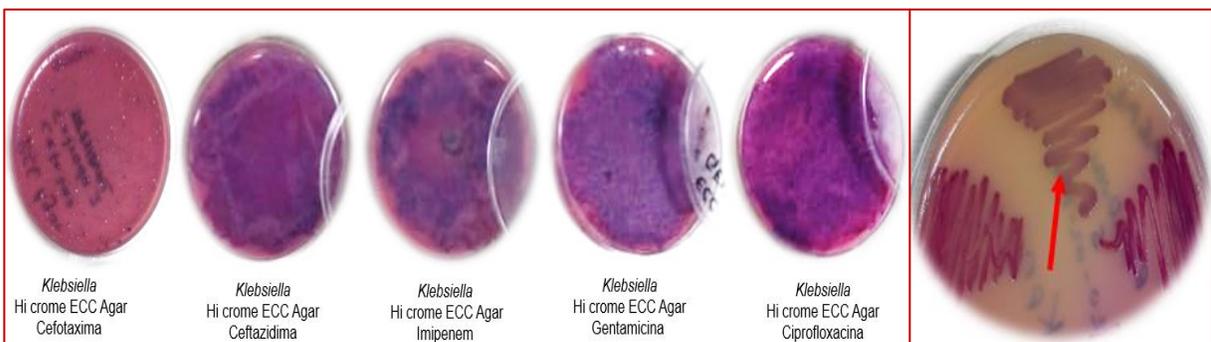
género *Staphylococcus*, que tuvieron desarrollo en presencia de los antibióticos probados (Figura 8).



**Figura 8.** Crecimiento presuntivo de *Staphylococcus* sp. proveniente de la muestra de agua residual. La flecha roja indica el crecimiento positivo de esta especie.

### 11.1.3. *Klebsiella* sp.

De la muestra de agua residual sembrada en *HiCrome*<sup>TM</sup> *ECC Agar* con: cefotaxima, ceftazidima, imipenem, gentamicina y ciprofloxacina, se aislaron presuntivamente bacterias del género *Klebsiella*, que tuvieron desarrollo en presencia de los antibióticos probados (Figura 9).



**Figura 9.** Crecimiento presuntivo de *Klebsiella* sp. proveniente de la muestra de agua residual. La flecha roja indica el crecimiento positivo de esta especie.

#### 11.1.4. *Acinetobacter* sp.

De la muestra de agua residual sembrada en *HiCrome Acinetobacter Agar Base* con cefotaxima, ceftazidima, imipenem, gentamicina y ciprofloxacina, se aislaron presuntamente bacterias del género *Acinetobacter* que tuvieron desarrollo en presencia de los antibióticos probados (Figura 10).

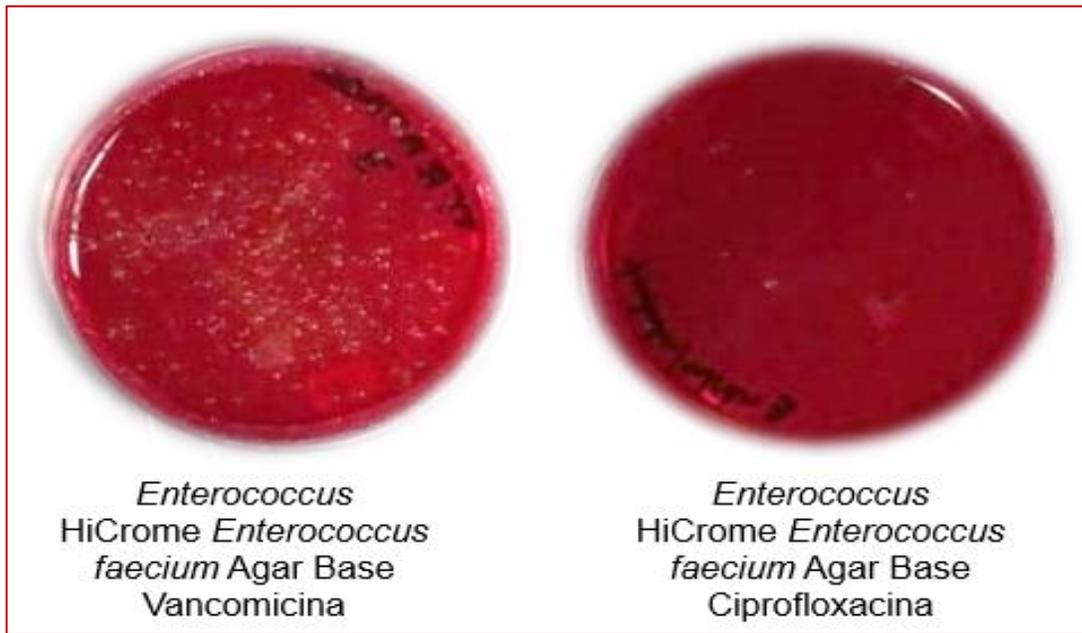


**Figura 10.** Crecimiento presuntivo de *Acinetobacter* sp. proveniente de la muestra de agua residual. La flecha roja indica el crecimiento positivo de esta especie.

#### 11.2. Identificación presuntiva de bacterias *ESKAPE* en agua tratada

##### 11.2.1. *Enterococcus* sp.

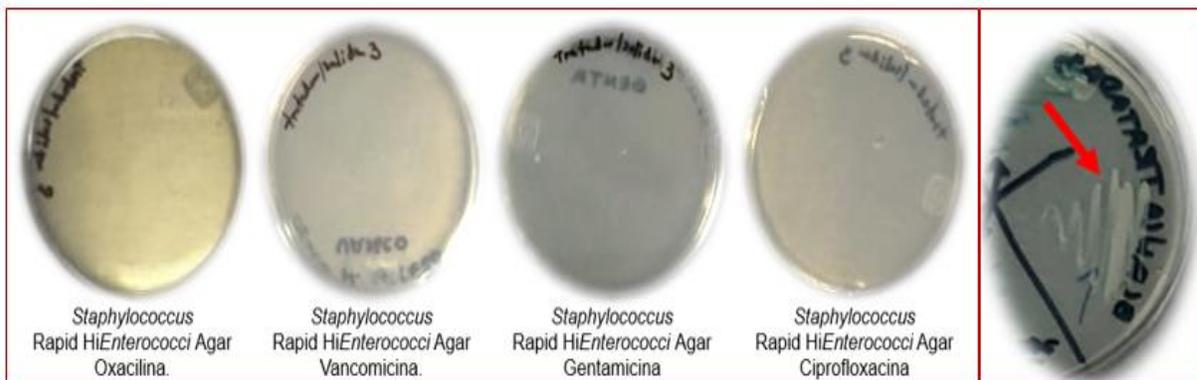
En la muestra de agua tratada sembrada en *HiCrome Enterococcus faecium Agar Base* con vancomicina y ciprofloxacina, no hubo desarrollo del género *Enterococcus* (Figura 11).



**Figura 11.** Siembra de agua tratada en *HiCrome Enterococcus faecium Agar Base*. En esta siembra de agua tratada no hubo desarrollo del género *Enterococcus*.

### 11.2.2. *Staphylococcus* sp.

De la muestra de agua tratada sembrada en *Rapid HiEnterococci* con oxacilina, vancomicina, gentamicina y ciprofloxacina, se aislaron presuntamente bacterias del género *Staphylococcus* que tuvieron desarrollo en presencia de los antibióticos probados, excepto en gentamicina (Figura 12).



**Figura 12.** Crecimiento presuntivo de *Staphylococcus* sp. proveniente de la muestra de agua tratada. La flecha roja indica el crecimiento positivo de esta especie.

### 11.2.3. *Klebsiella* sp.

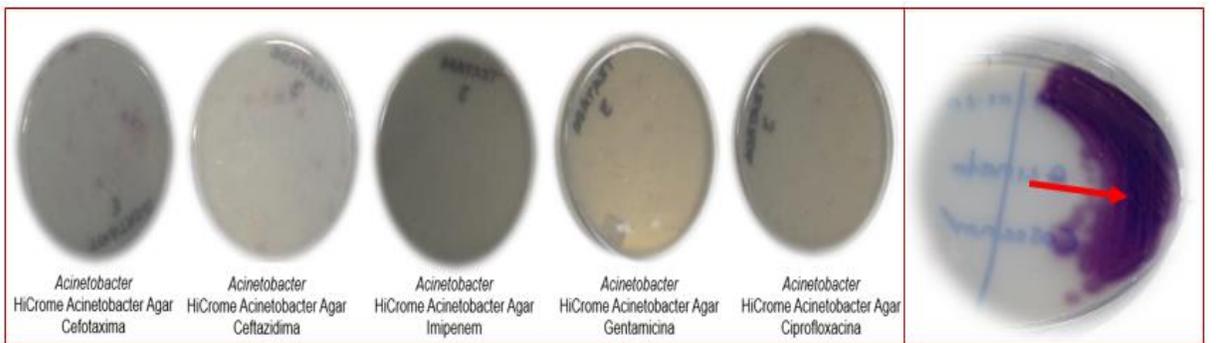
De la muestra de agua tratada sembrada en *HiCrome*<sup>™</sup> ECC Agar con: cefotaxima, ceftazidima, imipenem, gentamicina y ciprofloxacina, se aislaron presuntivamente bacterias del género *Klebsiella* que tuvieron desarrollo en presencia de los antibióticos probados (Figura 13).



**Figura 13.** Crecimiento presuntivo de *Klebsiella* sp. proveniente de la muestra de agua tratada. La flecha roja indica el crecimiento positivo de esta especie.

### 11.2.4. *Acinetobacter* sp.

De la muestra de agua tratada que fue sembrada en *HiCrome Acinetobacter* Agar Base con cefotaxima, ceftazidima, imipenem, gentamicina y ciprofloxacina, se aislaron presuntivamente bacterias del género *Acinetobacter* que tuvieron desarrollo en presencia de los antibióticos probados (Figura 14).



**Figura 14.** Crecimiento presuntivo de *Acinetobacter* sp. proveniente de la muestra de agua tratada. La flecha roja indica el crecimiento positivo de esta especie.

De las muestras de agua residual y tratada sembradas en *HiCrome™ ECC Agar* con los antibióticos respectivos, no se observaron colonias presuntivas de *Pseudomonas* y *Enterobacter*. Los resultados del crecimiento presuntivo de las bacterias del grupo *ESKAPE* en presencia de antibiótico, de las muestras de agua residual y tratada se resumen en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Géneros bacterianos presuntivos del grupo *ESKAPE* aislados de las muestras de agua residual y tratada.

Antibiótico	Agua residual						Agua tratada					
	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>K</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>En</i>	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>K</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>En</i>
Oxacilina		Rojo						Rojo				
Cefotaxima			Rojo	Rojo		Verde			Rojo	Rojo		Verde
Ceftazidima			Rojo	Rojo	Verde	Verde			Rojo	Rojo	Verde	Verde
Imipenem			Rojo	Rojo	Verde	Verde			Rojo	Rojo	Verde	Verde
Vancomicina	Rojo	Rojo					Verde	Rojo				
Gentamicina		Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde		Verde	Rojo	Rojo	Verde	Verde
Ciprofloxacina	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde

**Rojo:** Con crecimiento. **Verde:** Sin crecimiento. **Blanco:** Antibiótico no probado (*E*) *Enterococcus* sp. (*S*) *Staphylococcus* sp. (*K*) *Klebsiella* sp. (*A*) *Acinetobacter* sp. (*P*) *Pseudomonas* sp. (*En*) *Enterobacter* sp.

### 11.3. Resultados de la identificación por sistema API®

Los aislamientos de las bacterias del grupo *ESKAPE* aisladas presuntivamente de agua residual y tratada fueron identificadas a través del sistema API® los resultados se resumen en el (Cuadro 5). No todos los aislamientos recuperados del muestreo de las aguas residual o tratada pudieron ser identificados con API (estos se indican con un guion).

**Cuadro 5.** Resultados de identificación por el sistema API®.

<b>Tipo de muestra</b>	<b>Genero presuntivo por cromoagar</b>	<b>Sistema API utilizado</b>	<b>Resultado obtenido (API®)</b>
Agua residual	<i>Enterococcus</i> sp.	API® 20Estrep	–
	<i>Staphylococcus</i> sp.	API® 20Staph	<i>Staphylococcus</i> sp.
	<i>Klebsiella</i> sp.	API® 20E	–
	<i>Acinetobacter</i> sp.	API® 20NE	–
Agua tratada	<i>Staphylococcus</i> sp.	API® 20Staph	<i>Staphylococcus</i> sp.
	<i>Klebsiella</i> sp.	API® 20E	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Acinetobacter</i> sp.	API® 20NE	–

## 12. DISCUSIÓN

El uso de aguas residuales tratadas puede ser un factor importante para la diseminación de bacterias resistentes a los antimicrobianos hacia el ambiente. Las aguas residuales tratadas del HRAEI son utilizadas para servicios sanitarios y riego de áreas verdes en el hospital y a pesar de que la PTARs del HRAEI tiene distintos procesos de tratamiento, algunas bacterias que pertenecen al grupo *ESKAPE* fueron identificadas en las aguas residuales y aguas residuales tratadas; identificándose presuntivamente por cromó-agares los géneros: *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Klebsiella* sp. y *Acinetobacter* sp.; estos resultados son concordantes con los encontrados en el trabajo de (Obayiuwana *et al.*, 2018) donde se observó en muestras de aguas residuales el crecimiento de: *Acinetobacter* sp. n= 25, *Enterobacter* sp. n=20, *K. pneumoniae* n=14, *Enterobacter hormaechei* n=6, *Pseudomonas* sp. n=6 y *Staphylococcus* sp. n=6). De igual forma (Lamba *et al.*, 2017) reportó en PTARs hospitalaria presencia de: *K. pneumoniae* (26%), *A. baumannii* (11%), *E. cloacae* (6%), *E. aerogenes* (1%); en otro estudio realizado por (Sakkas *et al.*, 2019) se observó la presencia de bacterias de importancia clínica provenientes de aguas residuales, destacando el crecimiento de *K. pneumoniae* (n=24), *P. aeruginosa* (n=9), *Enterococcus* sp. (n=7), *S. aureus* (n=6) y otros (n=24). En el estudio realizado por (Che *et al.*, 2019) aislaron *A. baumannii* (6.6%), *K. pneumoniae* (5.5%), *P. aeruginosa* (3.3%), *E. faecium* (2.6%) y otros (82%), en el afluente y efluente en tres plantas de tratamiento muestreadas, todos estos estudios muestran la presencia de aislamientos del grupo *ESKAPE* similar a lo encontrado en este trabajo.

Los resultados obtenidos en este estudio ponen en evidencia que una cantidad importante de bacterias de importancia clínica se están liberando al ambiente hidrológico con la posibilidad de llegar a los espacios antropogénicos. Algunos estudios han demostrado la eficacia de las PTARs para eliminar o disminuir la carga bacteriana, por ejemplo en el trabajo de (Manohar *et al.*, 2017) solo se aislaron cepas de *P. aeruginosa* 15/101. Los resultados de (Lira *et al.*, 2020) apoyan que los taxones como firmicutes (8.48%), proteobacteria (68.47%) y gamma-proteobacteria (25.09%)

fueron aislados en los afluentes y disminuyeron a 2.43%, 51.55% y 10.5% respectivamente en los efluentes finales, destacando una disminución de la abundancia bacteriana. En un estudio realizado por (Narciso-da-Rocha *et al.*, 2018) concluyeron que el tratamiento secundario y el tratamiento con UV promovió notorias variaciones en la comunidad bacteriana y reducción de proteobacterias (Lüddeke *et al.*, 2015) observó una mayor eliminación de *Enterococcus* sp. y *Staphylococcus* sp. en la salida de aguas residuales con tratamientos de ozonización en combinación con diferentes técnicas de filtrado. La implementación o tipo de tratamiento que se aplique en las PTARs es de suma importancia para la disminución de la carga bacteriana.

Los mecanismos de resistencia a los diferentes antimicrobianos es un factor importante para la supervivencia de bacterias resistentes a antibióticos a su paso por las PTAR, como se mostró en los resultados en este estudio se aislaron presuntivamente por cromo-agar diferentes géneros bacterianos con fenotipos de resistencia a diferentes antimicrobianos. En un estudio realizado por (Hrenovic *et al.*, 2016) tomaron muestras de agua residual proveniente de hospitales, industrias y aguas pluviales, observando la presencia de *A. baumannii*, de las cuales 21 cepas fueron resistentes a carbapenémicos, ciprofloxacina y gentamicina, los dos aislamientos aislados de agua residual y agua tratada fueron resistentes a imipenem, gentamicina y ciprofloxacina. En otro estudio realizado por (Sakkas *et al.*, 2019) analizando los perfiles de resistencia de bacterias aisladas de aguas residuales hospitalarias encontraron a *K. pneumoniae* (n=24) resistentes a tobramicina y ceftriazona, el 95.8% fueron resistentes a ceftazidima y trimetoprim/sulfametoxazol; *P. aeruginosa* (n=9) todas resistentes a tobramicina y a meropenem, 88.8% resistentes a amikacina, gentamicina, ciprofloxacina e imipenem; *Enterococcus* sp. (n=7) el 85.5% fueron resistentes a ampicilina y el 71.4% a linezolid, eritromicina, ciprofloxacina y tetraciclina; *S. aureus* (n=6) fueron resistentes a penicilina, eritromicina y ciprofloxacina. En otro estudio más reciente realizado por (Savin *et al.*, 2020) en el cual analizó las bacteria del grupo *ESKAPE* en PTARs identificaron enterobacterias resistentes a carbapenémicos, *E. faecium* resistente a vancomicina y *S. aureus* resistente a meticilina en las plantas de tratamiento de aguas municipales.; Este

estudio llego a la conclusión de que las PTAR municipales parecen no eliminar las bacterias del grupo *ESKAPE*, provocando a una descarga importante de estos géneros en las aguas superficiales ocasionando la propagación al ambiente.

### 13. CONCLUSIONES

- En este estudio se aislaron bacterias de importancia clínica; en el afluente de la PTAR se aislaron cuatro bacterias y en el efluente de la PTAR fueron aisladas tres bacterias del grupo *ESKAPE*, cabe destacar que estas bacterias aisladas en la PTAR están clasificadas por la OMS en prioridad crítica y alta.
- En la muestra de agua residual se detectó la presencia de bacterias del grupo *ESKAPE* con fenotipos de resistencia a distintos antimicrobianos. *E. faecium* resistente a vancomicina y ciprofloxacina, *S. aureus* resistente a oxacilina, vancomicina, gentamicina y ciprofloxacina, *K. pneumoniae* y *A. baumannii* resistentes a cefotaxima ceftazidima, imipenem, gentamicina y ciprofloxacina.
- En la muestra de agua tratada se detectó la presencia de *S. aureus* resistente a oxacilina, vancomicina y ciprofloxacina, *K. pneumoniae* y *A. baumannii* resistentes a cefotaxima ceftazidima, imipenem, gentamicina y ciprofloxacina.
- La presencia de bacterias del grupo *ESKAPE* en el efluente de la PTAR analizada, pone de manifiesto la capacidad que estas bacterias tienen para evadir los diferentes sistemas de tratamiento de esta PTAR.

### 14. PERSPECTIVAS

- Continuar monitoreando la presencia de bacterias de importancia clínica (*ESKAPE*) en las PTARs hospitalarias.
- Realizar estudios comparativos entre PTARs hospitalarias y comunitarias.
- Continuar la vigilancia de la resistencia antimicrobiana en el ambiente de las aguas residuales.

- Realizar investigaciones enfocadas al análisis de concentraciones de antimicrobianos en las aguas residuales, este análisis podría indicar si las trazas de los antimicrobianos ejercen presión de selección sobre las bacterias de importancia clínica.
- Conocer los mecanismos de resistencia en bacterias como las del grupo *ESKAPE*, mediante técnicas fenotípicas o genotípicas es imprescindible para un mejor manejo y control de la resistencia a los antibióticos.
- Con los resultados que se obtuvieron en este estudio, la aplicación de la técnica de Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) sería de utilidad, para valorar el origen de cada una de las bacterias del grupo *ESKAPE* presentes en las aguas residuales.
- El muestreo en diferentes áreas del HRAEI incluyendo áreas de servicios sanitarios, áreas de jardinería y aguas residuales y el empleo de la técnica PFGE, esto conduce a una conclusión; de si existe un riesgo para la salud publica el estar en contacto en las diferentes áreas del hospital.

## **15. LIMITACIONES DEL TRABAJO**

- Una de las limitaciones de este trabajo fue el muestreo en una sola PTAR.
- La falta de confirmación de los géneros y especies bacterianas identificadas presuntivamente por cromo-agares.
- La falta de confirmación de la susceptibilidad antimicrobiana por microdilución en placa o sistema automatizado.
- La suspensión del trabajo experimental debido a la pandemia de SARS-CoV2.

## 14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca MS, M. B. (2007). Contaminación del agua. *Revista Biocenosis*, 20(1–2), 137–139.
- Andersson, M. I., & MacGowan, A. P. (2003). Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 1–11.
- Arias-Flores, R., Rosado-Quiab, U., Vargas-Valerio, A., & Grajales-Muñiz, C. (2016). Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 54(1), 20–24.
- Barman Balfour, J. A., & Figgitt, D. P. (2001). Telithromycin. *Drugs*, 61(6), 815–829.
- Belloso, W. H. (2009). Historia de los antibióticos. *Revista Del Hospital Italiano de Buenos Aires.*, 29(2), 102–111.
- Bengtsson-Palme, J., Hammarén, R., Pal, C., Östman, M., Björlenius, B., Flach, C. F., Fick, J., Kristiansson, E., Tysklind, M., & Larsson, D. G. J. (2016). Elucidating selection processes for antibiotic resistance in sewage treatment plants using metagenomics. *Science of the Total Environment*, 572(12), 1–16.
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M. N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., & Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 310–317.
- Bouki, C., Venieri, D., & Diamadopoulos, E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91(5), 1–9.
- Bryan, L. E., & Kwan, S. (1983). Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 23(6), 835–845.
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52.

- Candel, F., Matesanz, M., & Barberán, J. (2019). Nuevas perspectivas para la reevaluación de la fosfomicina: aplicabilidad en la práctica clínica actual. *Revista Española de Quimioterapia*, 32(1), 1–7.
- Cavaco, L. M., Frimodt-Møller, N., Hasman, H., Guardabassi, L., Nielsen, L., & Aarestrup, F. M. (2008). Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microbial Drug Resistance*, 14(2), 163–169.
- Chávez-Jacobo, V. M., Hernández-Ramírez, K. C., Romo-Rodríguez, P., Pérez-Gallardo, R. V., Campos-García, J., Gutiérrez-Corona, J. F., García-Merinos, J. P., Meza-Carmen, V., Silva-Sánchez, J., & Ramírez-Díaz, M. I. (2018). CrpP is a novel ciprofloxacin-modifying enzyme encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6), 1–11.
- Che, Y., Xia, Y., Liu, L., Li, A. D., Yang, Y., & Zhang, T. (2019). Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by nanopore metagenomic sequencing. *Microbiome*, 7(44), 1–13.
- Chellat, M. F., Raguž, L., & Riedl, R. (2016). Targeting Antibiotic Resistance. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(23), 6600–6626.
- CLSI. (2019). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In *Clinical and Laboratory Standards Institute* (M–100, 29t, Vol. 39).
- Cohen, S. N., Chang, A. C., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8), 2110–2114.
- CONAGUA. (2015). Introducción al Tratamiento de Aguas Residuales Municipales. In *Manual de agua potable, alcantarillado y saneamiento*.
- Coyne, S., Courvalin, P., & Périchon, B. (2011). Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3), 947–953.
- Craig, W. A. (1998). Pharmacokinetic/Pharmacodynamic parameters: Rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical Infectious Diseases*, 26(1), 1–10.

- Da Silva, M. F., Tiago, I., Veríssimo, A., Boaventura, R. A., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2006). Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, *55*(2), 322–329.
- Delgadillo, M., & Condori, L. (2010). Planta de tratamiento de aguas residuales con macrófitas para comunidades cercanas al Lago Titicaca. *Revista Boliviano de Ciencias*, *7*(21), 63–66.
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J., & Zhao, X. (2008). Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(2), 385–392.
- El-Mahallawy, H. A., Hassan, S. S., El-Wakil, M., & Moneer, M. M. (2016). Bacteremia due to ESKAPE pathogens: An emerging problem in cancer patients. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, *28*(3), 157–162.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2018). Healthcare-associated infections in intensive care units - Annual Epidemiological Report for 2016. In *Annual Epidemiological Report*.
- Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., & Vila, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial Biotechnology*, *2*(1), 40–61.
- Falagas, M. E., Giannopoulou, K. P., Kokolakis, G. N., & Rafailidis, P. I. (2008). Fosfomycin: Use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. *Clinical Infectious Diseases*, *46*(7), 1069–1077.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of penicillium, with special reference to their use in silation of H. influenzae. *British Journal of Experimental Pathology*, *10*(3), 226–236.
- Froelich-Ammon, S. J., & Osheroff, N. (1995). Topoisomerase poisons: Harnessing the dark side of enzyme mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(37), 21429–21432.
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Sanchez-Francia, D., Franco-Cendejas, R., Arroyo-Escalante, S., Velázquez-Acosta, C., Rojas-Larios, F., Quintanilla, L. J., Maldonado-Anicacio, J. Y., Martínez-Miranda, R., Ostos-Cantú, H. L., Gomez-Choel, A., Jaime-Sanchez, J. L., Avilés-Benítez, L. K., Camacho-Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico.

- Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS ONE*, 14(3), 1–13.
- Gastelo Acosta, R., & Maguiña Vargas, C. (2018). Mecanismos de resistencia bacteriana. *Diagnóstico*, 57(2), 82–86.
- Gensini, G. F., Conti, A. A., & Lippi, D. (2007). The contributions of Paul Ehrlich to infectious disease. *Journal of Infection*, 54(3), 221–224.
- Gray, N. F. (2010). *Water; Technology; An introduction for Environmental Scientists and Engineers* (3ra Ed.).
- Gutiérrez Muñoz, J., Morayta Ramírez Corona, A., Elena Martínez Bustamante, M., de Jesús Coria Lorenzo, J., Armenta Gallegos, L., Ramón Ayala Franco, J., Manuel Bernal Granillo, S., José Flores Zaleta, F., Elías García Pérez, F., Alfonso Monjardín Rochín, J., Martínez Fuentes, G., Hugo Gutiérrez Muñoz, V., & Antonio Suárez Cuenca, J. (2017). Infectología Pediátrica Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 30(2), 68–75.
- Guzman, M., Guzman, F., Salazar, E., Albarado, L., Rodulfo, H., & De Donato, M. (2016). Identificación de genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos en cepas intrahospitalarias de *Klebsiella pneumoniae*. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 36(1), 10–15.
- Hancock, R. E. W., Farmer, S. W., Li, Z., & Poole, K. (1991). Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(7), 1309–1314.
- Hawkey, P. M. (1998). The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *British Medical Journal*, 317(7159), 657–660.
- Hiasa, H., Shea, M. E., Richardson, C. M., & Gwynn, M. N. (2003). *Staphylococcus aureus* gyrase-quinolone-DNA ternary complexes fail to arrest replication fork progression in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8861–8868.
- Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354(1), 12–31.

- Hreiz, R., Roche, N., Benyahia, B., & Latifi, M. A. (2015). Multi-objective optimal control of small-size wastewater treatment plants. *Chemical Engineering Research and Design*, *102*, 345–353.
- Hrenovic, J., Goic-Barisic, I., Kazazic, S., Kovacic, A., Ganjto, M., & Tonkic, M. (2016). Carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in a municipal wastewater treatment plant, Croatia, 2014. *Eurosurveillance*, *21*(15), 1–10.
- Huang, K., Tang, J., Zhang, X. X., Xu, K., & Ren, H. (2014). A comprehensive insight into tetracycline resistant bacteria and antibiotic resistance genes in activated sludge using next-generation sequencing. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(6), 10083–10100.
- Jack, D. L., Yang, N. M., & H. Saier, M. (2001). The drug/metabolite transporter superfamily. *European Journal of Biochemistry*, *268*(13), 3620–3639.
- Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1991). More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *35*(9), 1697–1704.
- Jagadevi, Saipriya, B., Shubha, D., Sudhindra, K., Sumantha, A., & Madhuri, K. (2018). Clinical Importance of Emerging ESKAPE Pathogens and Antimicrobial Susceptibility Profile from a Tertiary Care Centre. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *7*(05), 2881–2891.
- Kalaiselvi, K., Mangayarkarasi, V., Balakrishnan, D., & Chitrалека, V. (2016). Survival of antibacterial resistance microbes in hospital-generated recycled wastewater. *Journal of Water and Health*, *14*(6), 942–949.
- Kanafani, Z. A., & Corey, G. R. (2007). Daptomycin: a rapidly bactericidal lipopeptide for the treatment of Gram-positive infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *5*(2), 177–184.
- Karkman, A., Do, T. T., Walsh, F., & Virta, M. P. J. (2018). Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends in Microbiology*, *26*(3), 1–9.
- Karkman, A., Johnson, T. A., Lyra, C., Stedtfeld, R. D., Tamminen, M., Tiedje, J. M., & Virta, M. (2016). High-throughput quantification of antibiotic resistance genes from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, *92*(3), 1–7.

- Karlowsky, J. A., Hoban, D. J., Hacke, M. A., Lob, S. H., & Sahm, D. F. (2017). Antimicrobial susceptibility of gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Asia-Pacific countries: SMART 2013-2015. *Journal of Medical Microbiology*, 66(1), 61–69.
- Karlowsky, J. A., Hoban, D. J., Hackel, M. A., Lob, S. H., & Sahm, D. F. (2017). Resistance among Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Latin American countries: SMART 2013–2015. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21(3), 343–348.
- Khaled, D. W., & Abdullah, B. A. (2018). Antibiotic resistant infection of the bacterial group ESKAPE. *Scientific Journal of Medical Research*, 2(8), 166–171.
- Khodursky, A. B., & Cozzarelli, N. R. (1998). The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), 27668–27677.
- Lamba, M., Graham, D. W., & Ahammad, S. Z. (2017). Hospital Wastewater Releases of Carbapenem-Resistance Pathogens and Genes in Urban India. *Environmental Science and Technology*, 51(23), 13906–13912.
- Leo, E., Gould, K. A., Pan, X. S., Capranico, G., Sanderson, M. R., Palumbo, M., & Fisher, L. M. (2005). Novel symmetric and asymmetric DNA scission determinants for *Streptococcus pneumoniae* topoisomerase IV and gyrase are clustered at the DNA breakage site. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 14252–14263.
- Li, J., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Milne, R. W., Coulthard, K., Rayner, C. R., & Paterson, D. L. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(9), 589–601.
- Lira, F., Vaz-Moreira, I., Tamames, J., Manaia, C. M., & Martínez, J. L. (2020). Metagenomic analysis of an urban resistome before and after wastewater treatment. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9.

- Llaca-Díaz, J. M., Mendoza-Olazarán, S., Camacho-Ortiz, A., Flores, S., & Garza-González, E. (2013). One-year surveillance of escape pathogens in an intensive care unit of monterrey, Mexico. *Chemotherapy*, *58*(6), 475–481.
- Lüddecke, F., Heß, S., Gallert, C., Winter, J., Güde, H., & Löffler, H. (2015). Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water Research*, *69*, 243–251.
- M<sup>a</sup> García-Hernández, A., García-Vázquez, E., Hernández-Torres, A., Ruiz, J., Yagüe, G., Herrero, J. A., & Gómez, J. (2011). Bacteraemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significacion clinica y perspectivas actuales. *Revista Española de Quimioterapia*, *24*(2), 57–66.
- Macgowan, A. P., & Bowker, K. E. (1997). Pharmacodynamics of antimicrobial agents and rationale for their dosing. *Journal of Chemotherapy*, *9*(1), 64–73.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). Brock. Biología de los microorganismos. In *Pearson Educacion* (14a Edición).
- Mandell G, Bennett J, D. R. (2000). Principles and Practice of Infectious Diseases - 7th Edition. In *Churchill Livingstone* (7th Edition).
- Manohar, P., Mahalakshmi, D., Aishwarya, R., & Ramesh, N. (2017). Antibiotic resistance characteristics of multi-drug resistant gram-negative bacteria isolated from sewage treatment plants and transferability studies. *Biomedicine (India)*, *37*(4), 545–550.
- Masters, P. A., O'Bryan, T. A., Zurlo, J., Miller, D. Q., & Joshi, N. (2003). Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. *Archives of Internal Medicine*, *163*(4), 402–410.
- Menéndez, C., & Garcia, J. (2013). Plantas de tratamiento de aguas residuales. Filtros percoladores. In *ResearchGate*.
- Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C. S., Manaia, C. M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., & Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Research*, *47*(3), 957–995.
- Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., & Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *43*(4), 727–737.

- Morrissey, I., Hoshino, K., Sato, K., Yoshida, A., Hayakawa, I., Bures, M. G., & Shen, L. L. (1996). Mechanism of differential activities of ofloxacin enantiomers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(8), 1775–1784.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2014). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4), 648–656.
- Muurinen, J., Stedtfeld, R., Karkman, A., Pärnänen, K., Tiedje, J., & Virta, M. (2017). Influence of manure application on the environmental resistome under finnish agricultural practice with restricted antibiotic use. *Environmental Science and Technology*, 51(11), 5989–5999.
- Muziasari, W. I., Pärnänen, K., Johnson, T. A., Lyra, C., Karkman, A., Stedtfeld, R. D., Tamminen, M., Tiedje, J. M., & Virta, M. (2016). Aquaculture changes the profile of antibiotic resistance and mobile genetic element associated genes in baltic sea sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4), 1–7.
- Narciso-da-Rocha, C., Rocha, J., Vaz-Moreira, I., Lira, F., Tamames, J., Henriques, I., Martinez, J. L., & Manaia, C. M. (2018). Bacterial lineages putatively associated with the dissemination of antibiotic resistance genes in a full-scale urban wastewater treatment plant. *Environment International*, 118, 179–188.
- Navidinia, M., Goudarzi, M., Rameshe, S. M., Farajollahi, Z., Asl, P. E., Khosravi, S. Z., & Mounesi, M. R. (2017). Molecular characterization of resistance genes in MDR-ESKAPE pathogens. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(2), 779–792.
- Nilius, A. (2002). Ketolides: the future of the macrolides? *Current Opinion in Pharmacology*, 2(5), 493–500.
- O' Neill, J. (2014). Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. In *Health and Wealth Nations*.
- Obayiuwana, A., Ogunjobi, A., Yang, M., & Ibekwe, M. (2018). Characterization of bacterial communities and their antibiotic resistance profiles in wastewaters obtained from pharmaceutical facilities in lagos and Ogun states, Nigeria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(7), 1–14.
- Ogrady F, Lambert P, Finch RG, G. D. (1997). *Antibióticos y quimioterapia - 9a edición*.

- OMS. (2014). Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. In *Organización Mundial de La Salud*.
- OMS. (2016). WHO | Global action plan on AMR. In *Organización Mundial de La Salud*. World Health Organization.
- OMS. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. In *Organización Mundial de la Salud*. World Health Organization.
- Opazo C, A., Mella M, S., Domínguez Y, M., Bello T, H., & González R, G. (2009). Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos. In *Revista Chilena de Infectología* (Vol. 26, Issue 6, pp. 499–503).
- Orta Arrazcaeta, L. (2002). Contaminación de las aguas por plaguicidas químicos. *Fitosanidad*, 6(3), 55–62.
- Palomo, A. O. (2014). *Resistencia a los glucopéptidos en Enterococcus*.
- Pancoast, S. J. (1988). Aminoglycoside antibiotics in clinical use. *Medical Clinics of North America*, 72(3), 581–612.
- Pärnänen, K. M. M., Narciso-Da-Rocha, C., Kneis, D., Berendonk, T. U., Cacace, D., Do, T. T., Elpers, C., Fatta-Kassinos, D., Henriques, I., Jaeger, T., Karkman, A., Martinez, J. L., Michael, S. G., Michael-Kordatou, I., O’Sullivan, K., Rodriguez-Mozaz, S., Schwartz, T., Sheng, H., Sørum, H., Manaia, C. M. (2019). Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Science Advances*, 5(3), 1–10.
- Pedreira, W., Anzalone, L., Álvez, M., & Cafferatta, A. (2003). Fosfomicina trometamol: una opción terapéutica válida en infecciones urinarias bajas. *Revista Médica Del Uruguay*, 19(2), 107–116.
- Peleg, A. Y., Adams, J., & Paterson, D. L. (2007). Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), 2065–2069.
- Perez, C. (2012). *Diseno y calculo del tratamiento secundario mediante aireacion prolongada de Edaru*.
- Perovic, O., Ismail, H., Van Schalkwyk, E., Lowman, W., Prentice, E., Senekal, M., & Govind, C. N. (2018). Antimicrobial resistance surveillance in the South African

- private sector report for 2016. *Southern African Journal of Infectious Diseases*, 33(4), 114–117.
- Pigrau, C., & Almirante, B. (2009). Oxazolidinones, glycopeptides and cyclic lipopeptides. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(4), 236–246.
- Plan Universitario para el Control de Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) UNAM. (2018). Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana México 2018. *Plan Universitario de Control de La Resistencia Antimicrobiana*, 1–28.
- Ramsamy, Y., Essack, S. Y., Sartorius, B., Patel, M., & Mlisana, K. P. (2018). Antibiotic resistance trends of ESKAPE pathogens in Kwazulu-Natal, South Africa: A five-year retrospective analysis. *African Journal of Laboratory Medicine*, 7(2), 1–8.
- Retsema, J., & Fu, W. (2001). Macrolides: structures and microbial targets. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18(1), 3–10.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., Michael, I., & Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of the Total Environment*, 447(1), 345–360.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Hye Park, C., Bush, K., & Hooper, D. C. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12(1), 83–88.
- Rodríguez-Martínez, J. M. (2005). Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(1), 25–31.
- Ruddaraju, L. K., Pammi, S. V. N., Guntuku, G. sankar, Padavala, V. S., & Kolapalli, V. R. M. (2020). A review on anti-bacterials to combat resistance: From ancient era of plants and metals to present and future perspectives of green nano technological combinations. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 42–59.
- Sakkas, H., Bozidis, P., Ilia, A., Mpekoulis, G., & Papadopoulou, C. (2019). Antimicrobial resistance in bacterial pathogens and detection of carbapenemases in klebsiella pneumoniae isolates from hospital wastewater. *Antibiotics*, 8(85), 1–12.

- Sauermann, R., Rothenburger, M., Graninger, W., & Joukhadar, C. (2008). Daptomycin: A review 4 years after first approval. *Pharmacology*, *81*(2), 79–91.
- Savin, M., Bierbaum, G., Hammerl, J. A., Heinemann, C., Parcina, M., Sib, E., Voigt, A., & Kreyenschmidt, J. (2020). Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, *727*, 138788-.
- Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Principales grupos de antibióticos. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, *2*, 631–647.
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., & Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews*, *57*(1), 138–163.
- Shlaes, D. M. (2006). An update on tetracyclines. *Current Opinion in Investigational Drugs*, *7*(2), 167–171.
- Silva, D. M., Menezes, E. M. N., Silva, E. V., & Lamounier, T. A. C. (2017). Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of ESKAPE pathogens from the Federal District, Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, *53*(4), 240–245.
- Spigelman, M. K. (2007). New tuberculosis therapeutics: A growing pipeline. *Journal of Infectious Diseases*, *196*(1), S28–S34.
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *27*(2), 116–129.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, *34*(5), S3–S10.
- Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar, R., & Barrientos Díaz, L. (2017). Implicancias estructurales y fisiológicas de la célula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiótica. *International Journal of Morphology*, *35*(4), 1214–1223.
- Velázquez-Acosta, C., Cornejo-Juárez, P., & Volkow-Fernández, P. (2018). Cepas ESKAPE multidrogorresistentes aisladas en hemocultivos de pacientes con cáncer. *Salud Publica de Mexico*, *60*(2), 151–157.

- Vicente, D., & Pérez-Trallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(2), 122–130.
- Vila, J., Martí, S., & Sánchez-Céspedes, J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1210–1215.
- Yang, Y., Li, B., Zou, S., Fang, H. H. P., & Zhang, T. (2014). Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach. *Water Research*, 62, 97–106.
- Zhang, J., Zhao, C., Chen, H., Li, H., Wang, Q., Wang, Z., Zhang, F., & Wang, H. (2018). A multicenter epidemiology study on the risk factors and clinical outcomes of nosocomial intra-abdominal infections in China: Results from the chinese antimicrobial resistance surveillance of Nosocomial infections (CARES) 2007–2016. *Infection and Drug Resistance*, 11, 2311–2319.

## 15. ANEXOS

### ANEXO 1. BIOQUÍMICAS Y PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN CON EL SISTEMA API® 20ESTREP

#### Pruebas bioquímicas

- *Prueba de Piruvato sódico (VP)*: permite observar si el microorganismo fermenta la glucosa por la vía butanodiólica. Si es así, se forma un producto intermedio acetil metil carbinol (acetoina) que forma un complejo de color rojizo con el  $\alpha$ -naftol.
- *Prueba de Acido hipúrico (HIP)*: determinar la capacidad enzimática de un microorganismo para hidrolizar el hípurato de sodio (ácido hipúrico) para obtener como producto final ácido benzoico y glicina por la acción de la enzima hípurato hidrolasa.
- *Prueba de Esculina citrato de hierro (ESC)*: Determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar el glucósido esculina a esculetina, se basa en la hidrólisis de la ligadura beta de la esculina a esculetina por una beta-glucosidasa constitutiva (la enzima esculinasa), la cual libera la molécula de glucosa. La esculetina reacciona con una sal de hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) para formar un complejo fenólico de color gris, marrón o negro. El citrato férrico es un indicador de la hidrólisis de la esculina y produce la formación de esculetina.
- *Prueba de Ácido piroglutámico- $\beta$ -naftilamida (PYRA)*: detectar la presencia de la enzima L-pirrolidonil arilamidasa (PYR); el sustrato L-pirrolidonil- $\beta$ -naftilamina es hidrolizado por la enzima L-piroglutamil aminopeptidasa a L-pirrolidona y  $\beta$ -naftilamina libre esta enzima reacciona con el reactivo ZIM A y ZIM B para dar un resultado de incoloro, naranja muy pálido o naranja.
- *Prueba de 6-bromo-2-naftil- $\alpha$ D-galactopiranosida ( $\alpha$ GAL)*: se utiliza para detectar la enzima  $\alpha$ -galactosidasa ( $\alpha$ -GAL) que hidroliza  $\alpha$ -galactósidos en monosacáridos mediante la ruptura de enlaces glucosídicos.
- *Prueba de Ácido-naftol-ASBI-glucurónico ( $\beta$ GUR)*: se utiliza para detectar la presencia de la enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa.
- *Prueba de 2-naftil- $\beta$ D-galactopiranosida ( $\beta$ GAL)*: se utiliza para detectar la enzima  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -GAL) que hidroliza de  $\beta$ -galactósidos en monosacáridos mediante la ruptura de un enlace glucosídicos. Los  $\beta$ -galactósidos incluyen carbohidratos que contienen donde el enlace glucosídico se encuentra por encima de la molécula galactosa.
- *Prueba de 2-naftil fosfato (PAL)*: la fosfatasa acida (FAC) cataliza en medio ácido la hidrólisis del  $\beta$ -naftil fosfato, es te sustrato reacciona con la sal de diazonio formando un cromógeno, el pentanodiol acelera la reacción al actuar como aceptor del fosfato.
- *Prueba de L-leucina- $\beta$ -naftilamida (LAP)*: se utiliza para la detección de la enzima leucina aminopeptidasa (LAP).

- *Prueba de L-arginina (ADH)*: La enzima arginina-dihidrolasa comprueba si las bacterias utilizan la arginina como fuente de carbono y energía para su crecimiento, convirtiendo la arginina en ornitina, amoníaco y dióxido de carbono produciendo un aumento de pH y un cambio de color del azul bromotimol de verde a azul.
- *Prueba de D-ribosa (RIB), L-arabinosa (ARA), D-manitol (MAN), D-sorbitol (SOR), D-lactosa (LAC), D-trehalosa (TRE), Inulina (INU), D-rafinosa (RAF)*, La fermentación es un proceso metabólico anaerobio de oxidación-reducción, en el cual un sustrato orgánico actúa como aceptor final de hidrogeno (aceptor de electrones) en lugar de oxígeno, la fermentación de sustratos orgánicos como los hidratos de carbono da por resultado productos finales reducidos y oxidados que son detectados por el indicador rojo de fenol que cambia a color amarillo.
- *Prueba de Almidón (2) (AMD)*: determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar el almidón por medios enzimáticos, por ejemplo, la enzima  $\alpha$ -amilasa cataliza la hidrólisis entre las uniones  $\alpha$ -1-4-glucosídicas y  $\alpha$ -1-6-glucosídicas del almidón.
- *Glicógeno (GLYG)*: determinar la capacidad de un microorganismo de oxidar el ácido glucónico, única fuente de carbono, en los compuestos reductores 2-cetogluconato.

### **Preparación del inóculo**

Para realizar la identificación de género y especie de los aislamientos puros (*Enterococcus*), se sembraron en TSA y se incubaron durante 18 a 24 horas a 35°C. A partir de este cultivo se realizó una suspensión bacteriana al 0.5 de la escala de McFarland equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml, 120  $\mu$ l de suspensión bacteriana ajustada se colocaron en cada microtubo de las galerías de API® 20Estrep, para las pruebas ADH, RIB, ARA, MAN, SOR, LAC, TRE, INU, RAF, AMD y GLYG se rellenó la cúpula con aceite de parafina para obtener una atmósfera anaerobia, finalmente las galerías fueron cerradas y se incubaron en aerobiosis durante 4-4.5 horas para una primera lectura y durante 18- 24 horas a 36°C para una segunda lectura.

### **Lectura de la prueba**

Después de cuatro horas de incubación se agregaron los siguientes reactivos en las siguientes pruebas bioquímicas: para la prueba VP; se agregó 1 gota de VP1 y VP2, para la prueba HIP; se agregaron 2 gotas de NIN, para la prueba PYRA,  $\alpha$ GAL,  $\beta$ GUR,  $\beta$ GAL, PAL y LAP; se agregó 1 gota de ZYM A ZYM B y se esperó 10 minutos para leer todas las reacciones

## **Interpretación de la prueba**

La identificación se obtiene a partir del perfil numérico: Determinación del perfil numérico: en la hoja de resultados, las pruebas están separadas en grupos de 3 y se asigna para cada uno un valor 1, 2 o 4. Sumando en el interior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas, se obtienen 7 cifras que constituyen el perfil numérico. La identificación se realizó con ayuda del software de identificación api web. Se introdujo manualmente mediante el teclado el perfil numérico de 7 cifras, lo que resultó al analizar con el software de identificación fue el resultado final de identificación que asignó el nombre científico de la bacteria, esto dependió de la lectura numérica que se obtuvo de las galerías de API® 20Estrep.

## ANEXO 2. BIOQUÍMICAS Y PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN CON EL SISTEMA API® 20STAPH MEDIUM

### Pruebas bioquímicas

- *Fermentación de: D-glucosa (GLU), D-fructosa (FRU), D-manosa (MNE), maltosa (MAL), lactosa (LAC), D-trehalosa (TRE), D-manitol (MAN), xilitol (XLT), D-melibiosa (MEL), D-rafinosa (RAF), D-xilosa (XYL), y D-sacarosa (SAC) Metil-D-glucósido (MDG):* La fermentación es un proceso metabólico anaerobio de oxidación-reducción, en el cual un sustrato orgánico actúa como aceptor final de hidrogeno (aceptor de electrones) en lugar de oxígeno, la fermentación de sustratos orgánicos como los hidratos de carbono da por resultado productos finales reducidos y oxidados que son detectados por el indicador rojo de fenol que cambia a color amarillo.
- *Prueba de Nitrato de potasio (NIT):* Con esta prueba se investiga la capacidad de las bacterias para reducir los nitratos convirtiéndolo en nitritos o en nitrógeno, esta prueba acredita la presencia de la enzima nitrato reductasa y nitrito reductasa.
- *Prueba de  $\beta$ -naftil fosfato (PAL):* la fosfatasa acida (FAC) cataliza en medio acido la hidrolisis del  $\beta$ -naftil fosfato, es te sustrato reacciona con la sal de diazonio formando un cromógeno, el pentanodiol acelera la reacción al actuar como aceptor del fosfato.
- *Prueba de L-Arginina (ADH):* se trata de detectar la hidrolisis de la arginina mediante la enzima de arginina dehidrolasa para transformar este aminoácido en L-citrulina, con la liberación de amoniaco.
- *Prueba de Urea (URE):* La ureasa es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos. Por su acción desdobra la urea, liberando 2 moléculas de amoniaco, se emplea un indicador de pH el rojo fenol, con color amarillo en medio ácido y rosado en medio alcalino.

### Preparación del inculo

Para realizar la identificación de género y especie de los aislamientos puros, estos se sembraron en Agar Soya Trypticaseina (TSA) y se incubaron durante 18 a 24 horas a 35°C. A partir de este cultivo se realizó una suspensión bacteriana al 0.5 de la escala de McFarland equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml, 120  $\mu$ l de suspensión bacteriana ajustada se colocaron en cada microtubo de las galerías de API® Staph, para las pruebas ADH y URE se rellenó la cúpula con aceite de parafina para obtener una atmosfera anaerobia, finalmente las galerías fueron cerradas y se incubaron durante 18-24 horas a 36°C.

## **Lectura de la prueba**

Después de la incubación de las galerías, las reacciones se consiguen al agregar 1 gota de cada uno de los reactivos y a continuación se interpretan todas las reacciones conforme a la tabla de identificación: Para la prueba VP; se agregó 1 gota de reactivo VP1 y VP2, y se esperó 10 minutos. Un color violeta-rosáceo indicó una reacción positiva y un color rosa pálido o rosa claro indicó una reacción negativa. Para la prueba NIT; se agregó 1 gota de reactivo NIT 1 y NIT 2, y se esperó 10 minutos. Un color rojo indicó una reacción positiva. Para la prueba PAL; se agregó 1 gota de reactivo ZYM A y ZYM B, y se esperó 10 minutos. Un color violeta indicó una reacción positiva.

## **Interpretación de la prueba**

La identificación se obtiene a partir del perfil numérico:

Determinación del perfil numérico: en la hoja de resultados, las pruebas están separadas en grupos de 3 y se asigna para cada uno un valor 1, 2 o 4. Sumando en el interior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas, se obtienen 7 cifras que constituyen el perfil numérico. La identificación se realizó con ayuda del software de identificación api web. Se introdujo manualmente mediante el teclado el perfil numérico de 7 cifras, lo que resultó al analizar con el software de identificación fue el resultado final de identificación que asignó el nombre científico de la bacteria, esto dependió de la lectura numérica que se obtuvo de las galerías de API® Staph.

## ANEXO 3. BIOQUÍMICAS Y PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN DE GÉNERO Y ESPECIE CON EL SISTEMA API® 20E

### Pruebas bioquímicas

- *Prueba de beta-galactosidasa (ONPG)*: el componente activo es el 2-nitro-fenil-βD-galactopiranosido, se trata de un sustrato colorimétrico utilizado para detectar si la bacteria es capaz de producir la actividad de la enzima β-galactosidasa. Cuando la enzima está presente, se hidroliza la molécula de ONPG y se libera galactosa y orto-nitrofenol que en medio alcalino produce una coloración amarilla, vehículo indispensable de las enterobacterias para la degradación inicial de lactosa.
- *Prueba de arginina deshidrolasa (ADH)*: la enzima arginina-dihidrolasa comprueba si las bacterias utilizan la arginina como fuente de carbono y energía para su crecimiento, convirtiendo la arginina en ornitina, amoníaco y dióxido de carbono produciendo un aumento de pH y un cambio de color del azul bromotimol de verde a azul.
- *Prueba de lisina descarboxilasa (LDC)*: la prueba se basa en la capacidad de formar la diamina cadaverina y dióxido de carbono por la descarboxilación y desaminación del aminoácido lisina en presencia de la enzima lisina descarboxilasa.
- *Prueba de ornitina descarboxilasa (ODC)*: la enzima ornitina descarboxilasa cataliza la descarboxilación del aminoácido ornitina (producto del ciclo de la urea) atacando el extremo carboxilo de los aminoácidos para formar diamina putrescina y dióxido de carbono, diamina implicada en la síntesis de DNA.
- *Prueba de citocromo (CIT)*: Esta prueba sirve para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos de amoníaco como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización en el medio.
- *Prueba de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S)*: la actividad de las bacterias sobre aminoácidos que contienen azufre, frecuentemente produce la liberación de ácido sulfhídrico. El medio Kliger contiene como hidratos de carbono la glucosa y la lactosa.
- *Prueba de ureasa (URE)*: determina la capacidad de un microorganismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa.
- *Prueba de triptófano desaminasa (TDA)*: detecta la presencia de triptófano desaminasa mediante el aminoácido triptófano como sustrato y se forma ácido indolpiruvato a partir de triptófano, que genera un color marrón en presencia de iones férricos.
- *Prueba de indol (IND)*: mediante esta prueba se detecta la liberación de indol. La liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante la enzima triptofanasa.

- *Prueba de Voges-Proskauer (VP)*: permite observar si el microorganismo fermenta la glucosa por la vía butanodiólica. Si es así, se forma un producto intermedio acetilmetil carbinol (acetoína) que forma un complejo de color rojizo con el  $\alpha$ -naftol.
- *Prueba de gelatinasa (GEL)*: mediante la producción de las enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) se prueba el hidrolisis de gelatina, para ver la capacidad de las bacterias de hidrolizar la gelatina a aminoácidos y péptidos.
- *Prueba de glucosa (GLU)*: las bacterias anaerobias y aerobias facultativas a menudo fermentan carbohidratos a ácidos orgánicos y gas ( $H_2$  y  $CO_2$ ).
- *Prueba de manitol (MAN)*: detecta si el microorganismo es capaz de fermentar manitol y liberar productos ácidos detectados por el rojo de metilo.
- *Prueba de inositol (INO)*: demuestra si existe fermentación de inositol, sustrato orgánico no perteneciente a los hidratos de carbono.
- *Prueba de sorbitol (SOR)*: determina la fermentación de sorbitol, un azúcar que utilizan las bacterias para obtener energía y hacer posible todos sus procesos metabólicos.
- *Prueba de ramnosa (RHA)*: prueba que identifica la ramnosa, un hidrato de carbono proveniente de la manosa que utilizan algunas enterobacterias para producir energía.
- *Prueba de sacarosa (SAC)*: identifica la fermentación de la sacarosa en glucosa y fructosa. Se incluye dentro de los hidratos de carbono que utilizan algunas enterobacterias para sus procesos metabólicos.
- *Prueba de melobiosa (MEL)*: determina la fermentación de melobiosa, hidrato de carbono utilizado por algunas enterobacterias para la producción de energía.
- *Prueba de amigdalina (AMY)*: demuestra si existe fermentación de la amigdalina, un azúcar compuesto por dos moléculas de glucosa, uno de benzaldehído y otra de cianuro. Las bacterias que fermentan la amigdalina la utilizan como vitamina para su crecimiento y multiplicación.
- *Prueba de arabinosa (ARA)*: prueba que contiene L-arabinosa. Detecta si el organismo que se quiere identificar tiene la capacidad de fermentar y/o oxidar este hidrato de carbono, para utilizarlo como fuente nutritiva en su metabolismo.

### Preparación del inóculo

Para realizar la identificación de género y especie de los aislamientos identificados presuntivamente por coromoagar, estos se sembraron en Agar MacConkey (MC) y se incubaron durante 18 a 24 horas a  $35^\circ C$ . A partir de este cultivo se realizó una suspensión bacteriana al 0.5 de la escala de McFarland equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml en solución salina. 120  $\mu$ l de suspensión bacteriana ajustada se colocaron en cada pozo de las galerías de API® 20E. Para las pruebas CIT, VP, y GEL se colocó inóculo en el tubo y la cúpula, para las demás pruebas de la galería, se colocó inóculo únicamente los tubos (no las capsulas), para las pruebas ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE se colocó aceite de parafina para obtener una

atmósfera anaerobia, las galerías de API® 20E fueron cerradas y se incubaron durante 18-24 horas a 35°C.

### **Lectura de la prueba**

Después de la incubación de las galerías se agregó los reactivos correspondientes a cada prueba bioquímica para ser interpretados: para la prueba TDA: se agregó 1 gota de reactivo TDA, un color marrón-rojizo indica una reacción positiva. Para la prueba IND: se agregó 1 gota del reactivo IND. Un color rosado que se difumina en toda la cúpula indica una reacción positiva. Para la prueba VP: se agregó una gota de los reactivos VP1 y VP2, un color rosa o rojo indica una reacción positiva.

### **Interpretación de la prueba**

La identificación se obtiene a partir del perfil numérico:

Determinación del perfil numérico: En la hoja de resultados, las pruebas están separadas en grupos de tres y se indica para cada uno un valor de 1, 2 o 4. Como la galería API® 20E contiene 20 pruebas bioquímicas, sumando al interior de cada grupo los valores que corresponden a reacciones positivas, se obtuvo un perfil numérico de 7 cifras. A la reacción de oxidasa, que constituye la prueba número 21 se le asignó el valor 4, cuando resulto positiva. La identificación se realizó con ayuda del software de identificación api web. Se introdujo manualmente mediante el teclado el perfil numérico de 7 cifras, lo que resulto al analizar con el software de identificación fue el resultado final de identificación que asignó el nombre científico de la bacteria, esto dependió de la lectura numérica que se obtuvo de las galerías de API® 20E.

## ANEXO 4. BIOQUÍMICAS Y PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN CON EL SISTEMA API® 20NE

### Pruebas bioquímicas

- *Prueba de nitrato potásico (NO<sub>3</sub>):* Determinar la capacidad de un microorganismo de reducir el nitrógeno en nitritos o en nitrógeno libre. Generalmente tiene lugar en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato, el oxígeno sirve como un aceptor de hidrógeno y los productos finales de la reducción son nitrito, amoníaco, nitrógeno molecular, óxido nítrico, óxido nitroso, el producto dependerá de la especie bacteriana. Si el producto final es gas nitrógeno u óxido nitroso se denomina desnitrificación.
- *Prueba de L-triptófano (TRP):* Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar el indol de la molécula del triptófano. Diversas enzimas intracelulares que intervienen en este proceso reciben el nombre de triptofanasa lo que indica un sistema completo de enzimas vinculadas con la producción del indol.
- *Prueba de L-arginina (ADH):* La enzima arginina-dihidrolasa comprueba si las bacterias utilizan la arginina como fuente de carbono y energía para su crecimiento, convirtiendo la arginina en ornitina, amoníaco y dióxido de carbono produciendo un aumento de pH y un cambio de color del azul bromotimol de verde a azul.
- *Prueba de esculina citrato férrico (ESC):* Determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar el glucósido esculina a esculetina, se basa en la hidrólisis de la ligadura beta de la esculina a esculetina por una beta-glucosidasa constitutiva (la enzima esculinasa), la cual libera la molécula de glucosa. La esculetina reacciona con una sal de hierro (Fe<sup>3+</sup>) para formar un complejo fenólico de color gris, marrón o negro. El citrato férrico es un indicador de la hidrólisis de la esculina y produce la formación de esculetina.
- *Prueba de gelatina (GEL):* Determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolíticas (gelatinasas) que licúan/hidrolizan la gelatina o muestran cambios característicos debido a los productos de degradación. En donde la gelatina es hidrolizada por la gelatinasa en sus aminoácidos constitutivos, con pérdida de sus características gelificantes.
- *Prueba de 4-nitrofenil-β-D-galactopiranosidasa (PNPG):* demostrar la presencia o la ausencia de la enzima beta-galactosidasa mediante el uso del compuesto orgánico p-nitrofenil-β-D-galactósido.
- *Prueba de D-glucosa (GLU), L-arabinosa (ARA), D-manosa (MNE), D-manitol (MAN), N-acetilglucosamina (NAG) y D-maltosa (MAL):* La fermentación es un proceso metabólico anaerobio de oxidación-reducción, en el cual un sustrato orgánico actúa como aceptor final de hidrógeno (aceptor de electrones) en lugar de oxígeno, la fermentación de sustratos orgánicos como los

hidratos de carbono da por resultado productos finales reducidos y oxidados que son detectados por el indicador rojo de fenol que cambia a color amarillo.

- *Prueba de gluconato potásico (GNT)*: determinar la capacidad de un organismo de oxidar el ácido glucónico, su única fuente de carbono, en compuestos reductores 2-cetogluconato. El sustrato gluconato de potasio, es una sal potásica del ácido glucónico. Cuando la glucosa es metabolizada por oxidación en ácido glucónico no se produce la fosforilación inicial y solamente aquellos organismos capaces de metabolismo oxidativo pueden utilizar el gluconato de potasio como su única fuente de carbono.
- *Prueba de citrato trisódico (CIT)*: el principio de la prueba de citrato trisódico es determinar la capacidad de un microorganismo para utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono para metabolismo y crecimiento con alcalinidad resultante.
- *Prueba de ácido fenilacético (PAC)*: La fenilalanina es desaminada a ácido fenilpirúvico, el que luego es reducido a ácido fenilacético mediante incubación. Este último puede ser reconvertido en fenilalanina, con lo que el ciclo vuelve a repetirse.
- *Prueba de oxidasa (OX)*: la prueba de oxidasa se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa intracelular. La reacción de oxidasa se debe a un sistema de citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como un aceptor de electrones en la fase terminal del sistema de transferencia de electrones.

### **Preparación del inóculo**

Para realizar la identificación de género y especie de los aislamientos puros (*Acinetobacter*), se sembraron en TSA y se incubaron durante 18 a 24 horas a 35°C. A partir de este cultivo se realizó una suspensión bacteriana al 0.5 de la escala de McFarland equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml, 120 µl de suspensión bacteriana ajustada se colocaron en cada microtubo de las galerías de API® NE, para las pruebas GLU, ADH, URE se rellenó la cúpula con aceite de parafina para obtener una atmosfera anaerobia, finalmente las galerías fueron cerradas y se incubaron durante 18-24 horas a 36°C.

### **Lectura de la prueba**

Después de la incubación de las galerías, las reacciones se consiguen al agregar 1 gota de cada uno de los reactivos y a continuación se interpretan todas las reacciones conforme a la tabla de identificación: para la prueba NO<sub>3</sub>; se agregó una gota del reactivo NIT 1 y NIT 2 en la cúpula, pasando 5 minutos, un color rojo nos indicó una reacción positiva. Para la prueba TRP se agregó una gota de GAMES, la difusión en toda la cúpula de un color rosa nos indicó una reacción positiva.

## **Interpretación de la prueba**

La identificación se obtiene a partir del perfil numérico:

Determinación del perfil numérico: en la hoja de resultados, las pruebas están separadas en grupos de 3 y se asigna para cada uno un valor 1,2 o 4. Sumando en el interior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas, se obtienen 7 cifras que constituyen el perfil numérico. La reacción de oxidasa, que constituye el ensayo número 21, se le asigna el valor de 4 cuando resulte positiva. La identificación se realizó con ayuda del software de identificación api web. Se introdujo manualmente mediante el teclado el perfil numérico de 7 cifras, lo que resulto al analizar con el software de identificación fue el resultado final de identificación que asignó el nombre científico de la bacteria, esto dependió de la lectura numérica que se obtuvo de las galerías de API® NE.