



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

METAGENOMA ASOCIADO A ÁREAS HOSPITALARIAS:
IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CAUSANTES DE
INFECCIONES NOSOCOMIALES Y GENES DE RESISTENCIA
A ANTIMICROBIANOS EN PACIENTES DE TERAPIA
INTENSIVA

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Carolina Garciglia Mercado

La Paz, Baja California Sur, febrero de 2020.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 20 horas del día 4 del Mes de Febrero del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Metagenoma asociado a áreas hospitalarias: Identificación de bacterias causantes de infecciones nosocomiales y genes de resistencia a antimicrobianos en pacientes de terapia intensiva”


Presentada por el alumno:

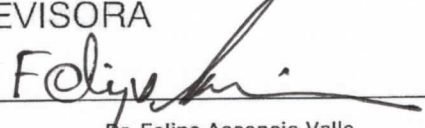
Carolina Garciglia Mercado

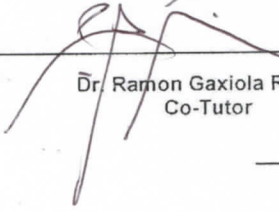
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

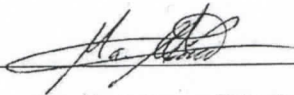
LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Gracia Gomez Anduro
Director/Co-Director de Tesis


Dr. Felipe Ascencio Valle
Co-Director/Co-Tutor


Dr. Ramon Gaxiola Robles
Co-Tutor


Dr. Jesus Silva Sanchez
Co-Tutor


Dra. Maria Teresa Estrada Garcia
Co-Tutor


Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Comité Tutorial

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Co-Directora de Tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director de Tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Dr. Ramón Gaxiola Robles
Co-tutor de Tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Dr. Jesús Silva Sánchez
Co-tutor de Tesis
Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas.

Dra. María Teresa Estrada García
Co-tutor de Tesis
Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico
Nacional.

Comité Revisor de Tesis

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dr. Ramón Gaxiola Robles
Dr. Jesús Silva Sánchez
Dra. María Teresa Estrada García

Jurado de Examen de Grado

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dr. Ramón Gaxiola Robles
Dr. Jesús Silva Sánchez
Dra. María Teresa Estrada García


Suplentes


Dr. Dariel Tovar Ramírez
Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Resumen

Las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), están relacionadas con una elevada morbilidad, mortalidad y un gasto económico importante debido a la sobre estancia hospitalaria que éstas generan. Además, el uso generalizado e indiscriminado de antimicrobianos en el tratamiento de estas infecciones promueve la selección y permanencia de cepas multidrogo resistentes (MDR) que eventualmente pueden emerger o distribuirse en las unidades hospitalarias. El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad de la comunidad bacteriana en el área hospitalaria, así como identificar las bacterias causantes de infecciones nosocomiales en pacientes de las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN), y cuidados intensivos adultos (UCI), apoyado en el desarrollo, estandarización y validación de una técnica de diagnóstico rápido. Para ello, se realizó la validación analítica y clínica de 15 pruebas diagnósticas basadas en la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP, por sus siglas en inglés) con 192 cultivos aislados a partir de muestras biológicas de pacientes con infecciones nosocomiales en UCIN y UCI, del HGZ1 IMSS de B.C.S. Se desarrollaron, estandarización y validaron cuatro pruebas para la identificación de: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, así como 11 pruebas para identificar los genes involucrados en el mecanismo de resistencia a antimicrobianos; Clase A β -lactamasas (ESBL): bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{KPC} , clase B β -lactamasas: bla_{IMP} , bla_{VIM} , bla_{NDM} , Clase D β -lactamasas: $bla_{OXA-23-like}$, $bla_{OXA-24-like}$, $bla_{OXA-51-like}$, $bla_{OXA-58-like}$ y $mecA$ de *S. aureus* resistente a meticilina. Encontrando que la sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) de las pruebas diagnósticas es del 100%, en comparación con el equipo automatizado Vitek 2 y la técnica de PCR punto final. Además, se determinó que la extensa resistencia a β -lactámicos en UCI es causada por la producción de β -lactamasas de amplio espectro (ESBL) mediada principalmente por bla_{TEM} y bla_{SHV} en *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. De esta manera, la aplicación de las técnicas de diagnóstico representan una alternativa para su uso rutinario en las instituciones de salud, favoreciendo el acertado y oportuno diagnóstico de las infecciones nosocomiales. Como medida preventiva de la propagación de estos patógenos en el ambiente hospitalario, se realizó la detección prospectiva de potenciales patógenos en el aire mediante secuenciación del gen 16S del RNA ribosomal a partir de ocho muestras ambientales colectadas de cinco áreas del HGZ1 IMSS de BCS. La diversidad de la comunidad bacteriana en el área hospitalaria se encontró dominada principalmente por bacterias asociadas a la flora humana (*Cutibacterium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Paracoccus*, y *Pseudomonas*), sugiriendo que los humanos participan como los vectores más importantes para la transferencia de las bacterias en el ambiente. Las áreas comunes de UCI y UCIN presentaron una notable riqueza y diversidad bacteriana en comparación con el resto de las áreas hospitalarias, lo que sugiere que podrían estar fungiendo como reservorios. Resaltando la necesidad de un estricto cumplimiento de las pautas de higiene del personal, así como un monitoreo a largo plazo de potenciales patógenos en el ambiente hospitalario, como medidas preventivas para reducir las infecciones nosocomiales.

Palabras claves: Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud, Multidrogo Resistentes, LAMP, ESBL.



Vo. Bo. Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Co-Director de tesis

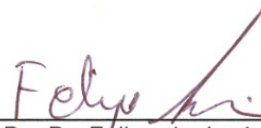

Vo. Bo. Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director de tesis

Abstract

Healthcare-associated infections (HAI) are a significant cause of morbidity, mortality and an important economic burden due to the length of hospital stay. Also, the widespread and indiscriminate use of antimicrobials in the treatment of these infections promotes the selection and permanence of antimicrobial drug resistance (MDR) that may eventually emerge and spread in the hospital units. The objective of this work was to analyze the diversity of bacterial communities in the hospital facility, as well as to identify the bacteria that cause nosocomial infections in patients of the neonatal intensive care units (NICU), and adult intensive care units (ICU), supported by the development, standardization, and validation of rapid diagnostic assays. For this purpose, the analytical and clinical validation of 15 diagnostic assays based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was performed with 192 cultures isolated from biological samples of patients with HAI infections in NICU and ICU, of the B.C.S. HGZ1 IMSS. Four assays were developed, optimized and evaluated for the identification of *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*, as well as 11 tests to identify the genes involved in the mechanism of antimicrobial resistance; Class A β -lactamases (ESBL): *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{KPC}, class B β -lactamases: *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, Class D β -lactamases: *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} and *mecA* of methicillin-resistant *S. aureus*. The LAMP assays showed a higher detection rate and robust diagnosis performance in comparison to conventional PCR and Vitek 2, with clinical sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of 100%. Furthermore, our findings support that the extensive resistance to β -lactams in ICU is caused by the production of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) mediated primarily by *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} in *A. baumannii*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. The developed LAMP assays are powerful tools that can be useful in local clinics and hospital facilities where costs and equipment limitations are imperative. As a preventive measure of the spread of these pathogens in the hospital environment, prospective detection of potential pathogens in the air was performed by sequencing the 16S gene of the ribosomal RNA from eight environmental samples collected from five areas of the B.C.S. HGZ1 IMSS. The diversity of the bacterial community in the hospital area was mainly dominated by bacteria associated with human flora (*Cutibacterium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Paracoccus*, and *Pseudomonas*), suggesting that humans are the most important vectors for the transfer of these bacteria in the environment. The common areas of ICU and NICU presented a remarkable bacterial richness and diversity compared to the rest of the hospital areas, suggesting that they could be functioning as reservoirs. Highlighting the need for strict compliance with staff hygiene guidelines and long-term monitoring of potential pathogens in the hospital environment as preventive measures to reduce this risk for Healthcare-associated infections.

Keywords: 16S rRNA metagenomics, Healthcare-associated infection, antimicrobial drug resistance, loop-mediated isothermal amplification.


Vo. Bo. Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Co-Director de tesis


Vo. Bo. Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director de tesis

Dedicatoria

A mi Familia

Agradecimientos

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (277171) que permitió el desarrollo de esta investigación.

Al centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por permitirme realizar mis estudios de posgrado nivel Doctorado. En especial al personal administrativo y de posgrado, por su amabilidad, disposición y las facilidades que me brindaron durante este proceso.

Al Hospital General de Zona 1 IMSS de B.C.S., su personal administrativo y técnico, por permitirme desarrollar esta investigación en sus instalaciones, con todas las facilidades requeridas.

A la coordinación de Investigación en Salud del IMSS, por facilitarme el apoyo como Becario en Investigación, durante la totalidad del desarrollo de este proyecto (Folio: 2017-89). A Dra. Silvia Palomo Piñón, Coordinador Médico de Programas para la Formación de Investigadores y a Dra. Andrea Álvarez Villaseñor Coordinador Auxiliar Médico en Investigación en Salud, por su apoyo y seguimiento para la obtención y renovación de este estímulo.

A mi mentora, Dra. Gracia Gómez Anduro, que me dio la oportunidad de seguir mis sueños, plasmar mis ideas y me enseñó a creer en mí. Gracias por su interminable guía, apoyo, paciencia y valiosos consejos. A mi Co-Director, Dr. Felipe Ascencio Valle, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por siempre estar en disposición de apoyarme y aconsejarme.

A mi asesor, Dr. Ramón Gaxiola Robles, por apoyarme durante todo el proceso para la exitosa realización de este proyecto, enseñarme un nuevo lenguaje y presentarme con el mundo de la salud, el cual siempre había sido una aspiración. Gracias por sus incansables consejos y por abrirme las puertas.

A mis asesores, Dr. Jesús Silva Sánchez y Dra. María Teresa Estrada García, que a pesar de la distancia siempre estuvieron en la mejor disposición de apoyar la realización de este proyecto. Gracias por sus valiosos consejos.

Al laboratorio de Patogénesis Microbiana, por las facilidades prestadas y su personal técnico responsable (Dra. Martha Reyes y M.C. Victor Moyron).

Al laboratorio de Biología Molecular de Plantas y su técnico responsable, cDr. Julio Hernández, gracias por ser mi maestro, aconsejarme, apoyarme y siempre estar en la mejor disposición de vernos crecer y desarrollarnos como profesionales y como seres humanos.

A las técnicas del laboratorio químico del IMSS. QBP. Verónica Silva y Q. Elvira Meléndez, gracias por permitirme desarrollar esta investigación en sus instalaciones, no hubiera sido posible sin su apoyo, disposición y amabilidad.

Al técnico M.C. Delia Rojas, del laboratorio de Genética Molecular, por las innumerables ocasiones que me recibió con las puertas abiertas y me brindo apoyo y consejo.

A mis compañeros de laboratorio, Héctor, Miriam, Anais, Asdrúbal, Kika, Crystal, Mario y Betty que más que compañeros se convirtieron en mi familia, por llorar y reír conmigo, por escucharme.

Finalmente, a las mujeres de mi vida, Mamá, Mary, Pauly, Cristy y Sofi por ser mi pilar y demostrarme cada día que no hay obstáculos que no podamos vencer. A mi Papá por apoyarme, creer en mí y motivarme a ser mejor persona y profesionista. A mi Fer por ser mi compañero en esta aventura, enseñarme toda la paleta de colores y a reírme de la vida. Los amo.

Contenido

Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Infecciones nosocomiales	4
2.1.1 Vías de transmisión	6
2.2 Patógenos causantes de infecciones nosocomiales	8
2.3 Resistencia a antimicrobianos	12
2.4 Detección de patógenos	16
2.5 Metagenómica	18
2.5.1 Aplicación clínica	20
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivos particulares	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Cultivos bacteriológicos	23
6.2 Extracción de ADN	23
6.3 Primers para LAMP y condiciones de amplificación	24
6.4 Validación de la técnica rápida de detección.	25
6.4.1. Sensibilidad y especificidad	26
6.4.1.1 Analítica	26
6.4.1.2 Clínica	26
6.5 Metagenómica del ambiente hospitalario	27
6.5.1. Análisis bioinformático y estadístico	28

7. RESULTADOS	29
7.1 Cultivos bacteriológicos.....	29
7.2 Cepas control	32
7.3 Estandarización de amplificación por PCR punto final	32
7.4 Diseño de primers	33
7.5 Estandarización de LAMP para bacterias patógenas	35
7.6. Estandarización de LAMP para genes de resistencia.....	36
7.7 Sensibilidad y especificidad analítica.....	40
7.8. Sensibilidad y especificidad clínica	49
7.9 Metagenómica del ambiente hospitalario.....	53
7.9.1 Extracción de ADN de muestras ambientales	53
7.9.2 Evaluación de la comunidad bacteriana	54
7.9.3 Estructura de la comunidad bacteriana	55
7.9.4 Diversidad bacteriana	60
7.9.5 Network basada en el índice de Jaccard	61
7.9.6 Análisis de coordenadas principales (PCoA).....	62
8. DISCUSIÓN	63
8.1 Patrón de resistencia a antimicrobianos.....	63
8.2 Desarrollo, estandarización y validación de la técnica de diagnóstico rápido.....	65
8.3 Metagenómica del ambiente hospitalario.....	69
8.3.1 Estructura de la comunidad bacteriana	70
8.3.2 Diversidad bacteriana	72
8.3.3 Relaciones entre los perfiles de la comunidad bacteriana	73
9. CONCLUSIONES	74
10. LITERATURA CITADA	76

Lista de figuras

Figura 1. Cultivos bacteriológicos aislados en UCI y UCIN.....	30
Figura 2. Cultivos bacteriológicos MDR de <i>A. baumannii</i> (A), <i>S. aureus</i> (B), <i>K. pneumoniae</i> (C) y <i>P. aeruginosa</i> (D) aislados de UCI y UCIN.....	31
Figura 3. Amplificación por PCR punto final.	33
Figura 4. Amplificación por medio de LAMP de bacterias patógenas.	36
Figura 5. Amplificación por medio de LAMP de <i>bla</i> _{OXA-23-like} , <i>bla</i> _{OXA-24-like} , <i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-58-like} , <i>bla</i> _{VIM} y <i>bla</i> _{IMP}	38
Figura 6. Amplificación por medio de LAMP de <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{SHV} y <i>bla</i> _{TEM}	39
Figura 7. Evaluación de la sensibilidad analítica de LAMP para identificar <i>A. baumannii</i>	41
Figura 8. Evaluación de la sensibilidad analítica de LAMP para identificar <i>S. aureus</i>	43
Figura 9. Evaluación de la sensibilidad analítica de LAMP para identificar <i>K. pneumoniae</i>	45
Figura 10. Evaluación de la sensibilidad analítica de LAMP para identificar <i>P. aeruginosa</i>	47
Figura 11. Curvas de rarefacción de las muestras ambientales.....	54
Figura 12. Abundancia relativa a nivel de phyla.....	57
Figura 13. Abundancia relativa a nivel de familia.....	58
Figura 14. Abundancia relativa a nivel de género.....	59
Figura 15. Alfa diversidad utilizando los índices de Chao1 y Shannon.....	60
Figura 16. Igraph network basada en el índice de Jaccard.....	61
Figura 17. Analisis PCoA basado en la distancia de Bray Curtis de los OTUs.....	62

Lista de tablas

Tabla I. Principales vías de transmisión de las infecciones nosocomiales	6
Tabla II. Principales mecanismos de resistencia antimicrobiana.	15
Tabla III. Genes seleccionados para detección por LAMP.	24
Tabla IV. Genes involucrados en el mecanismo de resistencia a antimicrobianos seleccionados para detección por LAMP.	25
Tabla V. Primers para detección por PCR punto final.	26
Tabla VI. Áreas estudiadas dentro del hospital.	28
Tabla VII. Mezcla de reacción de PCR punto final para estandarización de amplificación.	32
Tabla VIII. Primers diseñados para la identificación de <i>A. baumannii</i> y <i>K. pneumoniae</i> por LAMP.	34
Tabla IX. Mezcla de reacción de LAMP para bacterias patógenas.	35
Tabla X. Mezcla de reacción de LAMP para genes de resistencia.	37
Tabla XI. Evaluación de la especificidad analítica de LAMP para identificar <i>A. baumannii</i>	42
Tabla XII. Evaluación de la especificidad analítica de LAMP para identificar <i>S. aureus</i>	44
Tabla XIII. Evaluación de la especificidad analítica de LAMP para identificar <i>K. pneumoniae</i>	46
Tabla XIV. Evaluación de la especificidad analítica de LAMP para identificar <i>P. aeruginosa</i>	48
Tabla XV. Evaluación de Vitek 2, PCR y LAMP para identificar bacterias patógenas.	50
Tabla XVI. Evaluación de PCR y LAMP para identificar genes de resistencia a antimicrobianos en <i>A. baumannii</i>	51
Tabla XVII. Evaluación de PCR y LAMP para identificar genes de resistencia a antimicrobianos en <i>S. aureus</i>	51
Tabla XVIII. Evaluación de PCR y LAMP para identificar genes de resistencia a antimicrobianos en <i>K. pneumoniae</i>	52
Tabla XIX. Evaluación de PCR y LAMP para identificar genes de resistencia a antimicrobianos en <i>P. aeruginosa</i>	52
Tabla XX. Concentración y calidad de las muestras ambientales.	53

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones nosocomiales o IAAS (Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud) ocasionan más de la cuarta parte de las muertes en el mundo (Yang y Rothman 2004; WHO, 2013). Estas infecciones son particularmente graves en las unidades de cuidados intensivos (UCI) en donde los pacientes son más susceptibles a la colonización y los microorganismos patógenos son comúnmente más resistentes a los agentes antimicrobianos en comparación con otros ambientes. En estas áreas confinadas, las infecciones del tracto respiratorio inferior y del torrente sanguíneo son las más letales, siendo las infecciones del tracto urinario las más comunes. Las infecciones causadas por bacterias Gram-negativas poseen características que son de particular interés, debido a que estos microorganismos son altamente eficientes para regular o adquirir genes que codifican para mecanismos de resistencia a antimicrobianos, especialmente en la presencia de presión selectiva (Llaca-Díaz *et al.*, 2012). Además, los patógenos nosocomiales más problemáticos, pueden sobrevivir y persistir en las superficies bióticas o abióticas por largos periodos de tiempo, lo que podría explicar su supervivencia en UCI (Poza *et al.*, 2012).

La creciente presencia de bacterias multidrogo resistentes (MDR) es un problema multifacético que afecta el manejo de las infecciones nosocomiales. En la mayoría de los casos, la presencia de una bacteria MDR como agente causal de una infección, puede demorar el tratamiento de los agentes antimicrobianos adecuados, conduciendo a importantes consecuencias clínicas en infecciones de gravedad (Piskin *et al.*, 2012). De esta manera, mientras más rápido sean obtenidos los resultados de las pruebas diagnósticas del patógeno, así como de su perfil de resistencia a antimicrobianos, más rápido se realizará el adecuado tratamiento del paciente.

En los últimos años se han desarrollado técnicas de diagnóstico molecular basadas en la amplificación de ácidos nucleicos. La técnica de LAMP (amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, por sus siglas en inglés) detecta una secuencia de ADN con sensibilidad y especificidad mayor a la de un PCR anidado, con la ventaja de amplificarse a temperatura constante en corto tiempo y con menor sensibilidad a sustancias inhibitorias presentes en muestras biológicas (Mori y Notomi, 2009). Ofreciendo ventajas sobre los métodos convencionales, mediante la estandarización y automatización del diagnóstico, permitiendo la diferenciación entre especies y la detección de resistencia a antimicrobianos. LAMP ya ha sido utilizada exitosamente para la detección de bacterias y virus como; *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, especies del genero *Legionella*, virus de la influenza tipo A, virus de la influenza H5, virus del papiloma humano, entre otros (Mori *et al.*, 2013).

Una de las mayores dificultades en la prevención de las infecciones nosocomiales es comprender las fuentes de los agentes infecciosos y sus potenciales rutas de transmisión en el ambiente hospitalario (Tang *et al.*, 2015). Tradicionalmente, se han utilizado métodos basados en cultivos para identificar la mayoría de los agentes infecciosos después de la infección, sin embargo, en los últimos años, los avances en las tecnologías de secuenciación han permitido a los investigadores la capacidad de secuenciar comunidades microbianas enteras de forma masiva (Posa *et al.*, 2012). La aplicación de la metagenómica en el contexto clínico añade información valiosa en el estudio del microbioma hospitalario y su efecto en los pacientes. En este sentido, la detección prospectiva de potenciales patógenos en el aire, podría ser una medida complementaria en un enfoque integral para reducir las infecciones nosocomiales.

2. ANTECEDENTES

Una infección se define como el ingreso y multiplicación de microorganismos patógenos, como bacterias, virus, parásitos u hongos en un huésped que puede propagarse directa o indirectamente de una persona a otra ocasionando diversas reacciones adversas. Si a consecuencia de la infección el huésped sufre algún daño o lesión en sus tejidos se produce una enfermedad infecciosa (De la Rosa *et al.*, 2011; Romero 2007; Yang *et al.*, 2004). Los mecanismos principales por los que los microorganismos ejercen su acción nociva son el mecanismo invasor; invasión con lesión tisular, el mecanismo toxígeno; acciones de toxinas específicas producidas por algunas bacterias y el mecanismo inmunopatológico; la respuesta inmunitaria del huésped frente a la infección (Signore, 2013).

El conjunto de eventos que se presentan en las enfermedades infecciosas, mediante el cual se establece una dinámica entre el huésped y un microorganismo en el medio ambiente se conoce como cadena de infección. Esta cadena se forma por una *puerta de entrada* que es el sitio por donde el patógeno ingresa al huésped, como son las vías respiratorias superiores, las mucosas corporales, las heridas, etc. En base a la vulnerabilidad del paciente se pueden clasificar como patógenos oportunistas a aquellos microorganismos de escasa virulencia que aparecen en hospederos con mecanismos de defensa alterados, inmunocomprometidos o que no poseen la inmunidad específica suficiente para combatir un agente infeccioso determinado, o en contraste, en patógenos primarios a aquellos microorganismos que son capaces de producir una enfermedad en hospederos previamente sanos. Una vez que el patógeno se ha diseminado y establecido, busca una *puerta de salida* para infectar otros huéspedes como son las vías respiratorias superiores, mucosas corporales, tracto urinario, gastrointestinal, reproductor etc. La *vía de transmisión* es el medio que utiliza el patógeno para ir de un huésped o reservorio infectado hasta una entrada apropiada. La transmisión puede ser *directa* cuándo la infección se presenta por

medio de secreciones respiratorias al toser o estornudar y secreciones corporales de huésped a huésped o *indirecta* cuando es mediada por vectores como insectos, artrópodos o roedores, objetos contaminados o durante traumatismo o herida quirúrgica (De la Rosa *et al.*, 2011; Romero 2007).

2.1 Infecciones nosocomiales

Las infecciones nosocomiales o IAAS (Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud) se definen como cualquier enfermedad microbiológica clínicamente reconocible que afecta al paciente como consecuencia de su admisión o concurrencia a un hospital, o al personal del hospital como consecuencia de su trabajo, con independencia de si los síntomas aparecen durante la permanencia de la persona afectada en el hospital o después de su egreso (Garner, *et al.*, 1988; Malagon-Londoño 1999; Inweregbu *et al.*, 2005). Para determinar si una infección es nosocomial o adquirida en la comunidad, es importante considerar el periodo de incubación normal de la infección específica, por lo que aquellas infecciones en que el periodo de incubación se presente durante el tiempo de hospitalización, deberán ser consideradas como intrahospitalarias.

El desarrollo de la infección clínica en los hospitales depende principalmente de los microorganismos, el paciente y su susceptibilidad, el medio ambiente y el tratamiento. Como se había mencionado anteriormente, las infecciones oportunistas ocurren en pacientes con alteraciones en las defensas y por lo general son causadas por agentes que no provocan enfermedad en individuos sanos; muchas de estas infecciones son ocasionadas por microorganismo de la flora del paciente y con frecuencia resultan inevitables, por estar relacionadas con defectos en las barreras mucosas y otras defensas del huésped y no con riesgos ambientales que pueden prevenirse (Vincent, 2003; Malagon-Londoño 1999). Las infecciones más comunes como la neumonía y sepsis, generalmente se presentan

como consecuencia de intervenciones quirúrgicas, por el uso de aparatos de ventilación, aparatos intravasculares o catéteres en las unidades de terapia intensiva (Horan *et al.*, 1993; Rosenthal *et al.*, 2004; Leblebicioglu *et al.*, 2005).

Estas infecciones están asociadas con una elevada morbilidad, mortalidad y un gasto económico importante debido al mayor tiempo de hospitalización. En 2010 fueron consideradas como la sexta causa de muerte en Estados Unidos y Europa (Peleg y Hooper 2010), y para el año 2013 se estimaron entre 10-15 millones de infecciones anuales con una prevalencia de 1.4 millones de pacientes que corresponde al 5-10% de hospitalizaciones, con un costo total de 30 Billones de dólares por año, que en promedio corresponde a 2 mil dólares por día, por paciente infectado (CENAVECE 2013).

De acuerdo con la Red Hospitalaria De Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) en México, para el año 2012 el perfil estadístico de infecciones nosocomiales fue una tasa del 6.4 por cada 100 egresos hospitalarios, con un total de 54,446 infecciones registradas en 326 hospitales. Donde se observó la presencia de microorganismos Gram-negativos en las infecciones, como: *Pseudomonas aeruginosa* (16%) *Escherichia coli* (14%), *Klebsiella pneumoniae* (8%), *Enterobacter spp.* (6%) y microorganismos Gram-positivos: *Staphylococcus aureus* (12%), *Staphylococcus epidermis* (10%), con 25,321 cultivos (CENAVECE, 2013).

Otro problema importante que se presenta en las infecciones hospitalarias, es la resistencia a antimicrobianos. El uso generalizado de los antimicrobianos para el tratamiento o profilaxis es la principal determinante de la resistencia, promoviendo la selección y permanencia de cepas multidrogo resistentes (MDR) que eventualmente pueden emerger o distribuirse en las unidades hospitalarias (WHO 2002; Eriksen *et al.*, 2005).

2.1.1 Vías de transmisión

En la Tabla 1. se describen las principales vías de transmisión de las infecciones nosocomiales. La transmisión por contacto es la forma más frecuente de transmisión, y puede ser por contacto directo entre superficies corporales, o indirecto con la participación de un objeto inanimado. La transmisión por contacto y por gota ocurre únicamente a corta distancia y por tanto, pueden ser prevenidas con la aplicación de un sistema preventivo de higiene. Así mismo, la transmisión por vehículo y por vector, aunque ocurren a largas distancias podrían ser controladas considerando las mismas precauciones. La transmisión por vía aérea puede mantenerse en el ambiente por largos periodos de tiempo y viajar largas distancias, dificultando su control por los regímenes de higiene hospitalarios. Por lo tanto, el adecuado manejo de la transmisión por aire se convierte en un punto crítico después de que se hayan seguido otros regímenes de higiene (Instituto Nacional de Pediatría, 2010; Lai *et al.*, 2015).

Tabla I. Principales vías de transmisión de las infecciones nosocomiales (Modificado de Lai *et al.*, 2015).

Vía	Descripción
Transmisión por contacto	El modo de transmisión más importante y frecuente es por contacto directo.
Transmisión por gota	La transmisión ocurre cuando gotas conteniendo microorganismos del paciente infectado son propulsadas a una corta distancia por el aire y depositadas en el cuerpo del hospedero. Las gotas son generadas al toser, estornudar, hablar y durante ciertos procedimientos (succión, endoscopias, cirugía). Este tipo de transmisión ocurre por la diseminación de núcleos de gotas (partículas de menos de 5µm) que contienen microorganismos y permanecen suspendidas en el aire por largos periodos, o por partículas de polvo con agentes infecciosos. Los microorganismos transportados de esta manera, pueden diseminarse muy ampliamente por corrientes de aire y pueden ser inhalados por pacientes susceptibles dentro del mismo cuarto o a largas distancias. Por lo tanto, se requiere un manejo especial del aire y ventilación para prevenir este tipo de transmisión.
Transmisión por vía aérea	
Transmisión por vehículo	Los microorganismos se transmiten al hospedero mediante objetos contaminados como alimentos, agua, medicamentos, instrumentos y equipos.
Transmisión por vector	Los microorganismos se transmiten mediante vectores como mosquitos, moscas, ratas, y otros animales.

El ambiente hospitalario es una mezcla de pacientes enfermos, infectados e inmunocomprometidos compartiendo el mismo edificio, por ello, se han realizado consideraciones de diseño como diferentes estrategias de ventilación para cada una de las áreas y el mantenimiento de sistemas de ventilación para limitar la propagación de las infecciones. Sin embargo, aunque estos sistemas se encuentran implementados, la transmisión por vía aérea sigue ocurriendo y es el objeto de muchos grupos de investigación.

Las infecciones nosocomiales transmisibles por vía aérea son atribuidas a dos categorías de microorganismos: patógenos infecciosos y microorganismos oportunistas ambientales. Estos últimos, afectan a los pacientes que se encuentran inmunocomprometidos y a los empleados de las áreas hospitalarias, aunque no es tan virulenta como la primera categoría. Dichas categorías requieren atención y monitoreo de rutina ya que, si son ignoradas, podrían convertirse en problemas letales. De esta manera, el control de las infecciones transmitidas por vía aérea está directamente relacionado con el diseño del sistema de ventilación, los regímenes de limpieza y los eventos adversos en las áreas hospitalarias (Eames *et al.*, 2009; Griffith *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2015).

Históricamente, la ventilación natural se veía como beneficiosa en las áreas hospitalarias y eran contempladas en el diseño del hospital. Con la llegada de los grandes edificios y la ventilación artificial, se desarrollaron salas con presión negativa para alojar pacientes con infecciones fáciles de transmitir por vía aérea. La propagación de la tuberculosis en pacientes con VIH fue un ejemplo dramático del problema que representan las habitaciones aisladas. Para asegurar una dilución suficiente de la carga bacteriana alrededor de un paciente infectado, el aire de la habitación debe ser cambiado de 10-12 veces cada hora. Los cambios de aire reales en las salas con presión negativa suelen estar por debajo de este nivel debido a la falta de mantenimiento de los sistemas de ventilación. En general los cambios de aire en las salas hospitalarias pueden ser 8 por hora, pero más

frecuentemente entre 4 y 6 por hora, o en ocasiones completamente ausentes en áreas comunes. En estas circunstancias se podrían desarrollar altos niveles de contaminación por aerosol (Eames *et al.*, 2009).

S. aureus resistente a meticilina (MRSA) puede sobrevivir en superficies o escamas de la piel por hasta 80 días y las esporas de *C. difficile* pueden perdurar aún más. MRSA puede ser transmitida en el aire a partir de las vías respiratorias, pero comúnmente se adhiere a las escamas de la piel. La distancia de desplazamiento depende del tamaño de las escamas de la piel, las más grandes caen al piso con una altura de entre 1-2 metros, las más pequeñas pueden viajar a través de toda la sala del hospital. Se cree que las esporas de *C. difficile* se propagan en el aire y pueden encontrarse cerca del paciente infectado con el microorganismo, sin embargo, al contrario de MRSA rara vez han podido aislarse a partir de muestras de aire (Roberts *et al.* 2008).

2.2 Patógenos causantes de infecciones nosocomiales

La resistencia a antimicrobianos entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas ha ido aumentando en los últimos años. La presencia de patógenos multidrogo resistentes (MDR) se ha convertido en motivo de preocupación con respecto a las infecciones nosocomiales (Llaca-Díaz *et al.*, 2012). Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido la resistencia a los antimicrobianos como uno de los tres problemas de salud humana más importantes (Bassetti, *et al.*, 2011). Los patógenos MDR más comunes y problemáticos se han agrupado bajo el acrónimo “ESKAPE”, que significa *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp* (Rice, 2008). En este estudio nos enfocaremos en los patógenos con mayor incidencia en el área de estudio.

A. baumannii es un importante patógeno oportunista que causa una variedad de infecciones nosocomiales asociadas con una morbilidad y mortalidad significativas, representando una grave amenaza para los pacientes en unidades de cuidados intensivos (UCI) (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2018). El éxito de los aislamientos de *A. baumannii* se debe en gran parte a su capacidad para adquirir rápidamente resistencia a las terapias de agentes antimicrobianos y su capacidad para persistir en ambientes abióticos o desinfectados. De esta manera, este patógeno puede causar fácilmente brotes de infecciones nosocomiales (Guo y Li, 2019). *A. baumannii* se ha asociado a casos graves de infecciones nosocomiales de las vías respiratorias en pacientes críticamente enfermos, la cual ya ha pasado a formar parte de la microflora hospitalaria llegando a ser aislada en equipos de ventilación (Sevillano y Gallego, 2011). En un estudio europeo, *Acinetobacter spp.* fue la octava causa más común de neumonía nosocomial (Fluit *et al.*, 2011). Las infecciones nosocomiales ocasionadas por este género de bacterias se destacan por su alta resistencia a antimicrobianos incluyendo β -lactamasas y carbapenems de amplio espectro. Alrededor del 63% de *Acinetobacter spp.* se consideran resistentes al menos a tres clases de antimicrobianos. Aproximadamente el 2% de las infecciones nosocomiales reportadas por la Red Nacional de Seguridad Sanitaria son causadas por este género de bacterias, pero la proporción es mayor entre los pacientes en estado crítico y que se encuentran bajo ventilación mecánica (alrededor del 7%) (Breviario para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de infecciones nosocomiales, IMSS 2014).

El patógeno Gram-positivo más comúnmente aislado de UCI es *S. aureus*, particularmente *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA), con una incidencia y prevalencia que continua incrementándose rápidamente en muchas regiones del mundo (Llaca-Díaz *et al.*, 2012). La tasa de mortalidad asociada con infecciones invasivas de MRSA es estimada en aproximadamente 20% (Klevens *et al.*, 2007). Además, las infecciones del torrente sanguíneo ocasionadas por este patógeno

están asociadas con una alta tasa de mortalidad y una prolongada estancia hospitalaria (Kraker *et al.*, 2011). Debido a que *S. aureus* habita en las mucosas y la piel, puede penetrar en el torrente sanguíneo a través de heridas quirúrgicas ocasionando sepsis, además de otras enfermedades graves como osteomielitis, meningitis, endocarditis y neumonía. Estudios recientes demostraron que *S. aureus* es el microorganismo que causa el mayor número de infecciones en pacientes hospitalizados (Lopez *et al.*, 2009; Arbolaez 2012; Arbolaez *et al.*, 2016). Se ha estimado que las infecciones nosocomiales causadas por *S. aureus* incrementan los costos por atención hospitalaria hasta por 30,000 dolares por paciente (Noskin *et al.*, 2005), además de una sobre estancia hospitalaria de 10 a 20 días (Mannien *et al.*, 2011).

K. pneumoniae es otro importante patógeno nosocomial miembro del grupo “ESKAPE” que se está extendiendo rápidamente en los hospitales de todo el mundo, principalmente debido a la presencia de cepas MDR. Las infecciones causadas por este patógeno son difíciles de erradicar, ya que *K. pneumoniae* posee genes de resistencia para la mayoría de los agentes antimicrobianos (Onori *et al.*, 2015). Este patógeno es responsable de aproximadamente el 15% de las infecciones por bacterias Gram-negativas en UCI (Lockhart *et al.*, 2007), afectando principalmente a pacientes inmunocomprometidos. En los últimos años la amenaza representada por *K. pneumoniae* ha aumentado notablemente con la aparición de cepas resistentes a carbapenems y su diseminación mundial. Las infecciones causadas por estas cepas poseen limitadas opciones para su tratamiento y están asociadas a tasas de mortalidad superiores al 50% (Ben-David *et al.*, 2012). Al igual que *A. baumannii*, también es propenso a causar brotes en el área hospitalaria, debido a que su capacidad de resistencia a múltiples antimicrobianos le ofrece una ventaja selectiva inherente, que le permite persistir tanto en la flora de los pacientes hospitalizados como en el entorno hospitalario (Asensio *et al.*, 2000). Además, *K. pneumoniae* tiene la capacidad de colonizar silenciosamente a los pacientes o el personal de la atención de la salud, al

establecerse en el tracto gastrointestinal sin causar ningún signo de infección. De esta manera, los pacientes pueden ser portadores asintomáticos durante largos periodos de tiempo, dificultando su detección para el control y contención de futuros brotes. También se ha reportado que puede sobrevivir durante varias horas en las manos del personal de la atención de la salud, lo que probablemente facilita su diseminación y transmisión (Snitkin *et al.*, 2012).

Por último, *P. aeruginosa* representa un importante problema de salud a nivel mundial en donde el tratamiento de infecciones causadas por aislamientos MDR continúa siendo un desafío. El éxito de estas infecciones está relacionado con una interacción compleja entre la patogenicidad, epidemia y la resistencia a antimicrobianos y, más recientemente, una regulación y asociación entre los mecanismos de resistencia y virulencia (De Oliveira Santos *et al.*, 2019). *P. aeruginosa* es causa común de infecciones nosocomiales como sepsis, infecciones de herida quirúrgica y neumonías. Se estima que 51,000 infecciones se deben a esta bacteria de forma anual en Estados Unidos y más de 6,000 son MDR, con alrededor de 400 muertes al año. Algunas cepas (13%) se han encontrado resistentes a la mayoría de los antimicrobianos como aminoglucósidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas y carbapenems. Aproximadamente el 8% de todas las infecciones nosocomiales reportadas a la CDC (Center for Disease Control and Prevention, en Estados Unidos) por la red nacional de seguridad sanitaria son causadas por este patógeno (Breviario para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de infecciones nosocomiales, IMSS 2014).

2.3 Resistencia a antimicrobianos

La extensa resistencia antimicrobiana es una de las mayores amenazas actuales para la salud pública. Se estima que las muertes anuales debidas a la resistencia a antimicrobianos alcanzarán los 10 millones al año para el año 2050 (Shin y Park, 2019). En las últimas décadas, el tratamiento de las enfermedades infecciosas se ha complicado debido a la habilidad de las bacterias de desarrollar resistencia a diversos agentes antimicrobianos. La resistencia a antimicrobianos es un fenómeno biológico natural ocasionado por las mutaciones y la gran capacidad de las bacterias de transferir su material genético, existiendo una clara correlación entre el uso de antimicrobianos y la resistencia bacteriana, ya que el uso excesivo de antimicrobianos ocasiona que las cepas con mutaciones que les confieren resistencia, sobrevivan, matando aquellas cepas susceptibles y de esta manera permitiendo a las nuevas cepas de bacterias resistentes sobrevivir y desarrollarse (Tenover *et al.*, 2006; Mosquito *et al.*, 2011).

Las bacterias pueden adquirir resistencia por medio de la transferencia vertical u horizontal de genes. La transferencia vertical se refiere a la resistencia adquirida, desarrollada por mutaciones y selección cromosómica que ocurre durante la reproducción. Por otro lado, la transferencia horizontal de genes es la adquisición de nuevo material genético por bacterias susceptibles a partir de cepas de bacterias resistentes, y puede ocurrir entre cepas de bacterias de la misma especie o entre diferentes especies y géneros (Kumar y Varela 2013).

Los mecanismos de intercambio genético son la conjugación, transformación y transducción, donde los transposones facilitan la incorporación de múltiples genes resistentes en el genoma o plásmidos del huésped. Durante el proceso de conjugación, una bacteria Gram-negativa transfiere genes resistentes mediante plásmidos a una bacteria adyacente, por medio de una estructura proteica especializada denominada pilus que une a los dos microorganismos. La

transformación es el proceso mediante el cual una bacteria susceptible adquiere e incorpora segmentos de ADN a partir de otra bacteria que ha liberado su ADN al ambiente debido a lisis celular. Durante la transducción, los genes de resistencia son transferidos de una bacteria a otra mediante bacteriófagos (McManus 1997; Tenover *et al.*, 2006).

Los principales mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias son: La alteración de la proteína de unión en donde el antibiótico se une mediante la modificación o eliminación del sitio de unión; La síntesis de enzimas que inactivan el antibiótico mediante degradación o alteración; La reducción de la permeabilidad de la membrana para la entrada del antibiótico mediante la alteración de canales protéicos de la membrana externa, y; promoviendo la síntesis de bombas de expulsión que expulsan el antibiótico de la bacteria (Tabla I) (Tenover *et al.*, 2006; Mosquito *et al.*, 2011).

Algunos ejemplos del mecanismo de resistencia por alteración del sitio de unión incluyen las modificaciones en la ADN girasa, blanco de las quinolonas, las ARN polimerasas, blanco de la rifampicina, el ribosoma procariota, blanco de tetraciclina y otros inhibidores de la síntesis protéica y los blancos de antimicrobianos como las sulfonamidas. Un ejemplo clásico de las modificaciones en las moléculas blanco de los antimicrobianos es el mecanismo del *Staphylococcus* que altera de diversas formas la proteína de unión de la penicilina (PBP) que es el blanco de unión de los antimicrobianos β -lactámicos. *Staphylococcus aureus* se vuelve resistente a estos antimicrobianos por la mutación o la adquisición de nuevas PBP reduciendo la afinidad a la penicilina.

Otro ejemplo incluye la sustitución de aminoácidos en la región que determina la resistencia a las quinolonas (QRDR) de la ADN girasa y topoisomerasa IV, resultando en una menor eficiencia de unión de las quinolonas. Este mecanismo

es el responsable de la ampliamente distribuida resistencia a quinolonas en las Enterobacterias (Fabrega 2009; Mosquito *et al.*, 2011).

El mecanismo de inactivación del antibiótico por medio de enzimas se realiza por hidrólisis enzimática, transferencia de grupos funcionales o procesos redox (Davies 1994). Uno de los mecanismos más estudiados es la producción de β -lactamasas que hidrolizan el anillo β -lactámico de las penicilinas. Los genes que codifican las β -lactamasas (*bla*) se encuentran en el cromosoma o en los plásmidos, siendo las β -lactamasas TEM-1 las primeras en ser descubiertas en el plásmido de una cepa de *Escherichia coli*. Después se descubrieron otras β -lactamasas mediadas por plásmidos como SHV-1 (sitio activo variable de sulfidriilo, por sus siglas en inglés) y las CTX-M enzimas degradadoras de cefotaximas. Las enzimas TEM, SHV y CTX evolucionaron para hidrolizar una amplia variedad de cefalosporinas de amplio espectro, por lo cual se les ha llamado β -lactamasas de amplio espectro o ESBL (Livermore 1995; Kumar y Varela 2013).

Por medio del mecanismo de reducción de la permeabilidad se crea otro fenotipo de bacterias resistentes debido a la imposibilidad del antibiótico de entrar a la célula donde se encuentran los sitios blanco para su activación. Un mecanismo que resulta en la reducción de la permeabilidad en las bacterias son los lipopolisacáridos (LPS) de la pared celular, las bacterias que albergan fracciones de LPSs muestran resistencia a los macrólidos: eritromicina, roxitromicina, claritromicina y azitromicina en bacterias Gram-negativas como algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *V. cholerae* y *S. entérica* (Delcour 2009).

Finalmente, uno de los mecanismos más comunes es el eflujo activo de los antimicrobianos desde el interior de las células bacterianas. Las bacterias resistentes albergan bombas de eflujo impulsadas por energía que expulsan los antimicrobianos reduciendo de esa manera las concentraciones intracelulares a niveles muy bajos de inhibición o a una inhibición nula. Existen muchos tipos de

bombas de eflujo, el primer tipo son las de transporte activo primario, que usa la hidrólisis de ATP para activar las bombas de las células mientras que el segundo tipo, llamas de transporte activo secundario, usa un gradiente de iones para el eflujo (Kumar y Schweizer 2005).

Generalmente los antimicrobianos son clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción. Existen cuatro principales mecanismos, la interferencia con la síntesis de la pared celular, inhibición de la síntesis protéica, interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos y la inhibición de rutas metabólicas (Tabla I) (Neu 1992).

Tabla II. Principales mecanismos de resistencia antimicrobiana. (Modificado de Tenover *et al.*, 2006 y Mosquito *et al.*, 2011).

Familia de Antimicrobianos	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia	Genes implicados en el mecanismo de resistencia
Macrolidos	Actúan en la subunidad ribosomal 50S, inhibiendo la síntesis de proteínas.	Metilasas y bombas de expulsión activa	Metilasas codificadas por los genes <i>erm (A, B y C)</i> o <i>ermTR</i> Bombas de expulsión activa codificadas por el gen <i>mefA</i>
Quinolonas	Inhibe la acción de las topoisomerasas y de la ADN girasa bacterianas	Mutaciones puntuales en la enzima blanco del antibiótico Sistemas de expulsión Presencia de genes plasmídicos de resistencia antibiótica	Mutaciones a nivel de <i>gyrA</i> y <i>parC</i> , <i>AcrAB-like</i> y familia de genes <i>qnr (A, B, C, D y S)</i>
B-lactámicos	Interfiere en la síntesis del peptidoglicano.	B-lactamasas: enzimas que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo β -lactámico, inactivando de esta manera el antibiótico	Genes que codifican β -lactamasas: <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{OXA}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> y <i>bla_{GES}</i>
Trimetoprim-sulfametoxazol	Inhibe la síntesis de las enzimas: dihidropteroatosintasa (sulfametoxazol) y dihidrofolatoreductasa (trimetoprim).	Presencia de genes que codifican formas mutantes de la enzima blanco	Genes <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , y <i>dfrD</i> .
Tetraciclinas	Se unen al ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis de proteínas	Presencia de bombas de eflujo específicas para tetraciclinas	Genes <i>tet</i> que codifican sistemas de eflujo
Aminoglucosidos	Actúan en la subunidad ribosomal 30S, inhibiendo la síntesis de proteínas.	Presencia de enzimas modificadoras: acetilación, adenilación, y fosforilación.	Genes <i>aac</i> , <i>ant</i> y <i>aph</i>

2.4 Detección de patógenos

Actualmente la identificación y detección de microorganismos patógenos en los laboratorios de análisis clínicos hospitalarios y privados, está basada en metodologías microbiológicas y microscópicas clásicas, en algunos casos con la ayuda de equipos de diagnóstico, para realizar pruebas bioquímicas donde se llega a la identificación de los microorganismos a nivel de especie. Sin embargo, dichas técnicas presentan numerosas desventajas, como el tiempo necesario de incubación de los cultivos para determinar un diagnóstico acertado del agente causal de las enfermedades infecciosas, ocasionando en muchos casos un tratamiento empírico del paciente con diversos antimicrobianos fomentando la resistencia a los mismos.

Ante la creciente disponibilidad de los genomas de patógenos infecciosos en las bases de datos, numerosos genes pueden ser utilizados como secuencias blanco para su detección e identificación, ofreciendo ventajas sobre los métodos convencionales, mediante la estandarización y automatización del diagnóstico, permitiendo la diferenciación entre especies y la detección de resistencia a antimicrobianos.

En los últimos años se han desarrollado técnicas de diagnóstico molecular basadas en la amplificación de ácidos nucleicos. La técnica de LAMP (amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, por sus siglas en inglés) detecta una secuencia de ADN con alta sensibilidad y mayor especificidad bajo condiciones isotérmicas (Mori y Notomi, 2009). Utiliza una polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra, junto con dos primers internos (FIP, BIP) y primers externos (F3, B3) que reconocen ocho regiones diferentes en una secuencia de ADN. La amplificación ocurre únicamente cuando las seis regiones son correctamente reconocidas por los primers haciendo a la técnica altamente

específica. Los primers del Loop (LF, LB) son adicionales para alinear las estructuras del loop en los amplicones de LAMP, acelerando la sensibilidad de la reacción. Estas características permiten reducir significativamente el tiempo requerido para la generación de resultados (menos de una hora) a una temperatura constante, en un solo paso, con un resultado visible fácil de interpretar, en comparación con la amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual requiere equipos especializados para la reacción (termociclador) y visualización de resultados (cámaras de electroforesis y fotodocumentador).

Además, LAMP ha demostrado una menor sensibilidad a sustancias inhibitorias presentes en muestras biológicas (Kaneko *et al.*, 2007), y ya ha sido utilizada exitosamente para la detección de bacterias y virus como; *Salmonella*, *Legionella*, *Listeria*, *Escherichiacoli*, *Campylobacter*, *Cryptosporidiumoocysts*, *Vibrio cholerae*, norovirus, influenza, virus de la rubeola, virus del papiloma humano, virus de las paperas, entre otros. También ha sido utilizada para identificar genes involucrados en el mecanismo de resistencia a antimicrobianos como: *mecA* en *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *KPC* en *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas (Koide *et al.*, 2010; Nakano *et al.*, 2015).

Estas características pueden contribuir significativamente en la reducción del tiempo y costos requeridos para el procesamiento de muestras y el acertado diagnóstico de microorganismos patógenos. Así mismo, la posibilidad de diferenciar especies disminuirá el desarrollo de la resistencia a antimicrobianos debido a que la identificación de las cepas resistentes permitirá una intervención farmacológica precisa.

2.5 Metagenómica

Una de las principales dificultades para prevenir las infecciones nosocomiales es comprender las fuentes de los agentes infecciosos y sus vías de transmisión. Aunque los métodos tradicionales basados en cultivos se utilizan para identificar diversos agentes infecciosos después de la infección, no es factible detectarlos a priori utilizando técnicas basadas en cultivos. Las bacterias infecciosas pueden provenir de diversas fuentes; como los individuos en el hospital, ya sean los mismos pacientes, los trabajadores de la atención de la salud, las superficies, equipos e instrumentación, etc., e incluso si fuera posible cultivar muestras de todas estas fuentes, el cultivo puede fallar si no se conocen las condiciones de crecimiento o si las muestras no son manejadas correctamente (Hewitt *et al.*, 2013).

Para superar las dificultades y limitaciones asociadas con estos métodos de cultivo, se han desarrollado métodos independientes del cultivo basados en la amplificación y secuenciación de metagenomas bacterianos para identificar miles de bacterias diferentes en una sola muestra con secuenciación de ADN de alto rendimiento, en donde cientos de muestras pueden analizarse simultáneamente (Tringe *et al.*, 2008; Schmieder y Edwards, 2012; Tang *et al.*, 2015).

Este nuevo método cultivo-independiente emergió con el desarrollo de las tecnologías de Secuenciación de Nueva Generación (NGS; Next Generation Sequencing). Este tipo de secuenciadores típicamente producen millones de lecturas cortas (secuencias de 50 a 500 pb), que prácticamente permiten recuperar las secuencias de todos los genes presentes en la muestra, aunque de manera desorganizada (Ruppé *et al.*, 2015). Una vez realizada la secuenciación, se necesita aplicar conocimientos bioinformáticos para reconstruir y reordenar las secuencias originales, mediante un proceso que se conoce como ensamblaje. Una vez que las lecturas se encuentran ensambladas en *contigs* se puede determinar

información relevante como la identificación taxonómica de las especies presentes (Hasman *et al.*, 2014; Ruppé *et al.*, 2015).

Las dos aproximaciones más comúnmente utilizadas en estudios de metagenómica son los amplicones del 16S del RNA ribosomal y la metagenómica funcional o “*Whole-metagenome shotgun*” (Jovel *et al.*, 2016). La amplificación por PCR y secuenciación del gen 16S del RNA ribosomal, es el enfoque molecular más comúnmente utilizado para explorar la diversidad microbiana, al contener regiones conservadas restringidas a bacterias y arqueas. Mediante esta metodología se han descubierto nuevos microorganismos sin condiciones de crecimiento conocidas, cambiando dramáticamente el entendimiento de la diversidad microbiana global (Kelley y Gilbert, 2013). Por otro lado, la metagenómica por *shotgun* se refiere a la secuenciación ilimitada de los genomas de todos los microorganismos presentes en una muestra, proporcionando clasificación taxonómica y funcional de las secuencias, así como la posibilidad del descubrimiento de nuevos genes bacterianos y genomas (Franzosa *et al.*, 2015).

La capacidad metabólica de la comunidad se puede inferir o interpretar a partir de librerías de 16S o librerías *shotgun*, respectivamente. El enfoque de genes marcadores como el gen 16S se basa en la correlación entre los árboles filogenéticos y los *clusters* de genes compartidos entre los taxa. Mientras que la metagenómica funcional, proporciona una evaluación de los atributos funcionales de la comunidad, aunque los resultados dependen de la profundidad de la secuenciación (Jovel *et al.*, 2016).

2.5.1 Aplicación clínica

Los microorganismos patógenos pueden propagarse grandes distancias por la vía aérea, y permanecer viables, aumentando la posibilidad de infecciones remotas sin contacto directo con la fuente de infección. La detección prospectiva de potenciales patógenos en el aire podría ser una medida complementaria en un enfoque integral para reducir las infecciones nosocomiales (Beggs *et al.*, 2014). En este sentido, la aplicación de la metagenómica en el contexto clínico añade información valiosa en el estudio del microbioma hospitalario y su efecto en los pacientes (King *et al.*, 2016). Representando una gran oportunidad ya que no existen límites en el número de especies que pueden ser consideradas.

Aunque los métodos de secuenciación de ADN no pueden verificar la viabilidad de ciertos microorganismos, pueden determinar los patrones típicos y las fuentes de la diversidad microbiana. Diversos estudios han demostrado que los patógenos causantes de infecciones nosocomiales pueden persistir en las superficies hospitalarias en estado viable durante meses, siendo las habitaciones contaminadas un factor de riesgo significativo de infección (Kramer *et al.*, 2006). Recientemente, se ha demostrado que los pacientes expuestos a un ambiente contaminado tienen más probabilidades de contraer patógenos nosocomiales, y que las mejoras en la limpieza pueden reducir las tasas de infección de ciertos patógenos (Hewitt *et al.*, 2013).

Diversos estudios se han centrado en la diversidad bacteriana en ambientes hospitalarios utilizando los amplicones del gen 16S del RNA ribosomal. La primera investigación enfocada en describir la diversidad bacteriana en un ambiente hospitalario fue el de Poza *et al.*, (2012). Mediante pirosecuenciación 454, secuenciaron muestras de superficies inanimadas procedentes de UCI y las compararon con áreas abiertas dentro del hospital, encontrando que existe una menor diversidad dentro de UCI debido a la presión selectiva causada por la

resistencia antimicrobiana. Posteriormente, Oberauner *et al.*, (2013) también utilizó pirosecuenciación para investigar el microbioma de superficies inanimadas de UCI comparándolo con las técnicas tradicionales de cultivo, concluyendo que solo se logró identificar de 2.5% de la diversidad bacteriana total. También Hewitt *et al.*, (2013) investigó la diversidad bacteriana en dos UCI neonatales a partir de muestras de superficies inanimadas, encontrando una composición similar a otros estudios reportados para edificios y muestras de aire, con la notable excepción que el ambiente hospitalario estaba en su mayoría compuesto por Enterobacteriaceae. Finalmente, Tang *et al.* (2015) determinó la diversidad del ambiente hospitalario inanimado en un centro de tratamiento de enfermedades respiratorias en Taiwan. Encontrando una elevada diversidad de la comunidad bacteriana para bacterias que se encuentran estrechamente relacionadas con la flora humana, demostrando una posible vía de transmisión de los patógenos de los pacientes a su entorno. Estas investigaciones demuestran la potencial aplicación de las tecnologías de secuenciación de nueva generación para la identificación y el seguimiento de la diversidad bacteriana en entornos hospitalarios.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta presencia de infecciones nosocomiales en pacientes susceptibles como los de edad pediátrica y adultos en terapia intensiva, se hace necesario determinar la diversidad de la comunidad bacteriana y los genes responsables de la resistencia antimicrobiana en el área hospitalaria, para la predicción de la futura evolución de la resistencia a antimicrobianos; así como el desarrollo de herramientas diagnósticas rápidas, específicas y sensibles en base a detección de ADN bacteriano para contender con dichas enfermedades.

4. HIPÓTESIS

La determinación del metagenoma asociado a áreas hospitalarias y la identificación de las bacterias causantes de infecciones nosocomiales en pacientes de terapia intensiva, permitirán identificar la diversidad de la comunidad bacteriana y los genes responsables de la resistencia antimicrobiana en un hospital General del Sector Salud.

5. OBJETIVOS

Determinar la diversidad de la comunidad bacteriana en el área hospitalaria, así como identificar las bacterias causantes de infecciones nosocomiales en pacientes de las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN), y cuidados intensivos adultos (UCI), apoyado en el desarrollo, estandarización y validación de una técnica rápida de detección de ADN bacteriano.

5.1 Objetivos particulares

- Desarrollar, estandarizar y validar analíticamente una técnica de diagnóstico rápido, eficaz y sensible para la identificación de: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter Baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Pseudomonas aeruginosa*, y sus genes de resistencia a antimicrobianos.
- Validar clínicamente la técnica de diagnóstico rápido para la identificación de: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter Baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, y sus genes de resistencia a antimicrobianos, en pacientes de las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN), y cuidados intensivos adultos (UCI) en un hospital General del Sector Salud.

- Determinar la diversidad de la comunidad bacteriana en un hospital General del Sector Salud.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivos bacteriológicos

Para la recolección de cultivos bacteriológicos de las áreas de UCIN y UCI del Hospital General de Zona 1 IMSS de B.C.S. y el desarrollo de la investigación, se obtuvo la aprobación (mayo 2016) del proyecto sometido a la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS con el número de registro R-2016-785-047. Donde se especifican los procedimientos para cumplir con los requerimientos y las normas vigentes de acuerdo al comité de bioseguridad y ética.

6.2 Extracción de ADN

El ADN genómico de las cepas control y de los cultivos bacteriológicos, fue extraído mediante precipitación con fenol-cloroformo-isoamil (Modificado de Sambrook and Russell, 2001). De forma breve, se agregó buffer de extracción (Triton 100X 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM Tris HCL 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM) a la biomasa resultante de 24 hrs de incubación en medio líquido, para proceder a la disrupción celular mediante FastPrep a una velocidad de 5-6 m/s por 60 segundos. Posteriormente se agregó proteinasa K a esta suspensión permaneciendo a 60°C por 1 hr. Las muestras fueron centrifugadas a 15000 rpm, el sobrenadante fue mezclado con de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (PCI 25:24:1), y centrifugado a 15000 rpm. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se adicionó isopropanol a -20°C, las muestras se almacenaron a -20°C toda la noche. Los tubos fueron centrifugados a 11000 rpm y el pellet fue resuspendido en agua Miliq estéril mediante incubación a 60°C por 1 hr. Se agregaron 5 µl de RNAsa y se

incubaron a 37°C por 1 hr. Se agregaron 200 µl de cloroformo:alcohol isoamilico (CIA 24:1) y se centrifugo a 11000 rpm. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo, se adicionó acetato de amonio 7.5 mM y dos volúmenes de etanol al 100%, y se almacenaron a -20°C por 1 hr. Finalmente las muestras se centrifugaron a 11000 rpm, la pastilla de ADN fue lavada dos veces con etanol al 70% y resuspendida en agua MilliQ estéril. Por último, se cuantificó la concentración de ADN mediante el uso de un espectrofotómetro (NanoDrop ND-100).

6.3 Primers para LAMP y condiciones de amplificación.

Se seleccionaron los primers para la amplificación de regiones conservadas en *S. aureus* y *P. aeruginosa*, siguiendo las especificaciones de los autores. Se realizó el diseño de los primers para la detección de *A. baumannii* y *K. pneumoniae*, así como para la detección de los genes involucrados en la resistencia a antimicrobianos (Tabla III y IV).

Tabla III. Genes seleccionados para detección por LAMP.

Microorganismo	Gen	Referencia
<i>A. baumannii</i>	<i>bla</i> _{OXA-51-like}	Este estudio
<i>S. aureus</i>	<i>femA</i>	Xu <i>et al.</i> , 2011
<i>P. aeruginosa</i>	<i>oprI</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2011
<i>K. pneumoniae</i>	<i>mdh</i>	Este estudio

Tabla IV. Genes involucrados en el mecanismo de resistencia a antimicrobianos seleccionados para detección por LAMP.

Genes de resistencia	Referencia
Clase A β-lactamasas (ESBL)	
<i>bla</i> _{TEM}	Este estudio
<i>bla</i> _{SHV}	
<i>bla</i> _{KPC}	
Clase B β-lactamasas	
<i>bla</i> _{IMP}	Este estudio
<i>bla</i> _{VIM}	
<i>bla</i> _{NDM}	
Clase D β-lactamasas	
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	Este estudio
<i>bla</i> _{OXA-24-like}	
<i>bla</i> _{OXA-58-like}	
MRSA	
<i>mecA</i>	Este estudio

6.4 Validación de la técnica rápida de detección.

En el área de bacteriología del laboratorio clínico del HGZ1 IMSS, se realizó el diagnóstico microbiológico y bioquímico de los cultivos bacteriológicos por medio del equipo automatizado Vitek 2, a partir de muestras biológicas de los pacientes. En CIBNOR se montaron las técnicas de diagnóstico rápido por LAMP para la identificación de las bacterias patógenas y sus genes de resistencia a antimicrobianos, así mismo, se estandarizaron las condiciones para diagnóstico por medio de PCR punto final de las bacterias patógenas (Tabla V). Los productos amplificados se analizarán por secuenciación y la secuencia será comparada con cada uno de los genes específicos reportados.

Tabla V. Primers para detección por PCR punto final.

Microorganismo	Gen	Numero de acceso	Referencia	Tamaño amplicón (pb)
<i>A. baumannii</i>	<i>bla</i> _{OXA-51-like}	KC914881	Turton, <i>et al.</i> , 2006	353
<i>S. aureus</i>	Sau3AI fragment	AF033191	Strommenger, <i>et al.</i> , 2003	107
<i>P. aeruginosa</i>	<i>ecfX</i>	DQ996551	Lavenir, <i>et al.</i> , 2007	528
<i>K. pneumoniae</i>	<i>mdh</i>	AM051124	Sun, <i>et al.</i> , 2008	364

6.4.1. Sensibilidad y especificidad

Los resultados obtenidos por las técnicas tradicionales de diagnóstico y PCR, serán comparados con aquellos obtenidos con la herramienta de diagnóstico molecular propuesta basada en la técnica de LAMP.

6.4.1.1 Analítica

Para establecer el límite de detección se realizaron diluciones seriadas del ADN genómico control con una concentración inicial de 100.0 ng•μL⁻¹. La especificidad a nivel de género y de especie de LAMP fue evaluada con un número determinado de cepas de referencia y otras especies distintas a la bacteria patógena analizada.

6.4.1.2 Clínica

La sensibilidad y especificidad clínica de la técnica de LAMP para la detección de las bacterias patógenas estudiadas así como sus genes de resistencia, fue

evaluada tomando como estándar los métodos de cultivo tradicionales y la técnica de PCR punto final. Para ello se realizó una tabla de contingencia 2x2 donde se calcularon los Intervalos de confianza (IC) al 95%. La sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Positivo (VPP) y el Valor Predictivo Negativo (VPN) de la técnica de diagnóstico rápido por LAMP fueron calculadas de la siguiente manera:

Sensibilidad= (número de verdaderos positivos) / (número de verdaderos positivos + número de falsos negativos), Especificidad= (número de verdaderos negativos) / (número de verdaderos negativos + número de falsos positivos), VPP= (número de verdaderos positivos) / (número de verdaderos positivos + número de falsos positivos) y VPN= (número de verdaderos negativos) / (número de verdaderos negativos + falsos negativos) (Riegelman & Hirsch 1992; Sackett et al., 1998).

Con los datos obtenidos, se realizó una prueba de chi-cuadrada mediante el software estadístico Minitab® (Minitab 18, Minitab Inc. State College, PA, USA), y se estableció significancia estadística cuando el valor fue $P < 0.05$.

6.5 Metagenómica del ambiente hospitalario

Se colectaron muestras ambientales en áreas problemáticas y representativas del Hospital General de Zona 1 IMSS en B.C.S (Tabla VI). Para ello, se colocaron 8 soportes con filtros Millipore de 0.22 μm en las unidades de manejo del aire acondicionado integral del hospital, los cuales fueron recolectados después de 21 días y almacenados a -80°C hasta el momento de su preparación.

Los 8 filtros fueron divididos en tres partes iguales y procesados como replicas, además se incluyó un filtro estéril como control negativo, dando un total de 25 muestras. Las muestras fueron colocadas en tubos estériles de 15 mL donde fueron lavados con 1 mL de buffer de fosfatos (pH 7.4) con 0.05 de Tween 80. Después de vortexear intensamente los tubos por una hora, se recuperó la solución y centrifugó por 10 min a 13 rpm en tubos de 1.5 mL (Be *et al.*, 2015).

La extracción de ADN se realizó con el kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN) (Jiang *et al.*, 2015). Posteriormente, el ADN extraído fue amplificado utilizando el kit REPLI-g Single Cell (QIAGEN) por 16 horas a 30°C. Las amplificaciones fueron purificadas utilizando columnas del kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) (Be *et al.*, 2015). Finalmente, las muestras fueron enviadas a la empresa GENEWIZ para la preparación de librerías pareadas y secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S del RNA ribosomal por la plataforma de Illumina MiSeq.

Tabla VI. Áreas estudiadas dentro del hospital.

Areas
UCIN área común
UCIN área aislada
UCI área común
UCI área aislada
Cuneros
Hospitalización pasillo
Hospitalización
Urgencias

6.5.1. Análisis bioinformático y estadístico

Para el análisis bioinformático se utilizó el servidor Biobacter del laboratorio de Genómica Microbiana del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. de Mazatlán (Bruno Gómez Gil & Abraham Guerrero). Para la limpieza de las lecturas se utilizó el script pair-end_cleaner v1.0.4, el cual elimina con CUTADAPT v1.16 bases de baja calidad (< Q30), N's y remueve secuencias pareadas cortas (<140 bases). Posterior a esta limpieza, ambas secuencias pareadas se ensamblaron con PEAR 0.9.8, con una longitud mínima de ensamblaje de 440 pb y una longitud máxima de 480 pb para la región V3-V4 del gen 16S del RNA ribosomal.

Las lecturas resultantes fueron analizadas para eliminar secuencias quiméricas utilizando el script Chimera_detector v1.4.2, comparando las secuencias con la base de datos de Silva 132 mediante vsearch. Finalmente se utilizó el script Metagenomic Sequence Classifier v1.8.1 para clusterización y clasificación de las secuencias representativas de cada cluster con vsearch, determinación de la diversidad de la comunidad bacteriana y asignación taxonómica.

El paquete Phyloseq v1.22.3 en R v3.6.2 fue utilizado para la manipulación de los datos y construcción de gráficos. Para determinar similitudes se realizaron gráficos de ordenación mediante análisis de coordenadas principales (PCoA).

7. RESULTADOS

7.1 Cultivos bacteriológicos

Durante un periodo de 12 meses, se obtuvieron 192 cultivos bacteriológicos; 40 cultivos de *S. aureus*, 31 cultivos de *A. baumannii*, 75 cultivos de *P. aeruginosa* y 46 cultivos de *K. pneumoniae*, a partir de muestras biológicas de pacientes con infecciones nosocomiales en UCI y UCIN del HGZ1 IMSS de B.C.S., de acuerdo al código de ética, manteniendo estricto control de la información del paciente.

El mayor número de cultivos aislados en UCI fue de *P. aeruginosa* (55), seguido por *S. aureus* (32) y *A. baumannii* y *K. pneumoniae* ambos con 27 cultivos. En UCIN, *P. aeruginosa* también presentó el mayor número de cultivos (20), seguido por *K. pneumoniae* (19), *S. aureus* (8) y *A. baumannii* (4) (Figura 1).

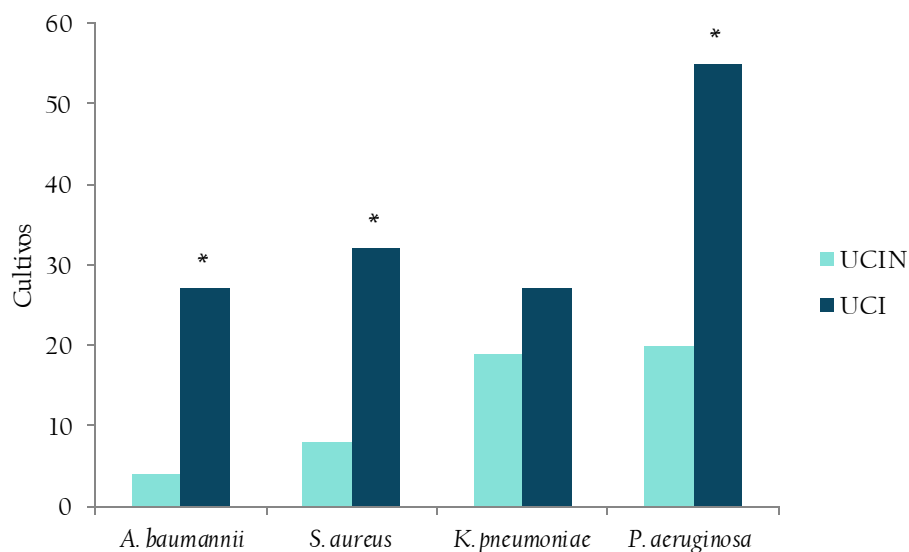


Figura 1. Cultivos bacteriológicos aislados en UCI y UCIN. Se aplicó la prueba de chi-cuadrada, con un valor de significancia estadística $P < 0.05$.

En cuanto a los cultivos multidrogo resistentes (MDR) (Figura 2), *A. baumannii* presentó la mayor incidencia con 64.5%, seguido por *P. aeruginosa* con 61.3%, *K. pneumoniae* con 60.8% y *S. aureus* con 12.5%. *A. baumannii* MDR fue registrado únicamente en UCI, donde incluso se presentaron cuatro cultivos extensamente resistentes (XDR) (Figura 2A), de acuerdo a la propuesta de expertos para el estándar provisional de definiciones de resistencia adquirida declarados por Magiorakos *et al.*, (2011). *S. aureus* resistente a meticilina se presentó en UCI y UCIN, observando diferencias estadísticamente significativas entre ambas áreas para resistencia a fluoroquinolonas y lincosamidas (Figura 2B).

K. pneumoniae MDR presentó diferencias significativas entre UCI y UCIN para la resistencia a fluoroquinolonas e inhibidores de la ruta de folato (Figura 2C). *P. aeruginosa* MDR fue observada con diferencias significativas entre ambas áreas para todos los agentes antimicrobianos con excepción de monobactámicos (Figura 2D). En el Anexo I se describe la información de sensibilidad a antimicrobianos para cada uno de los cultivos mencionados.

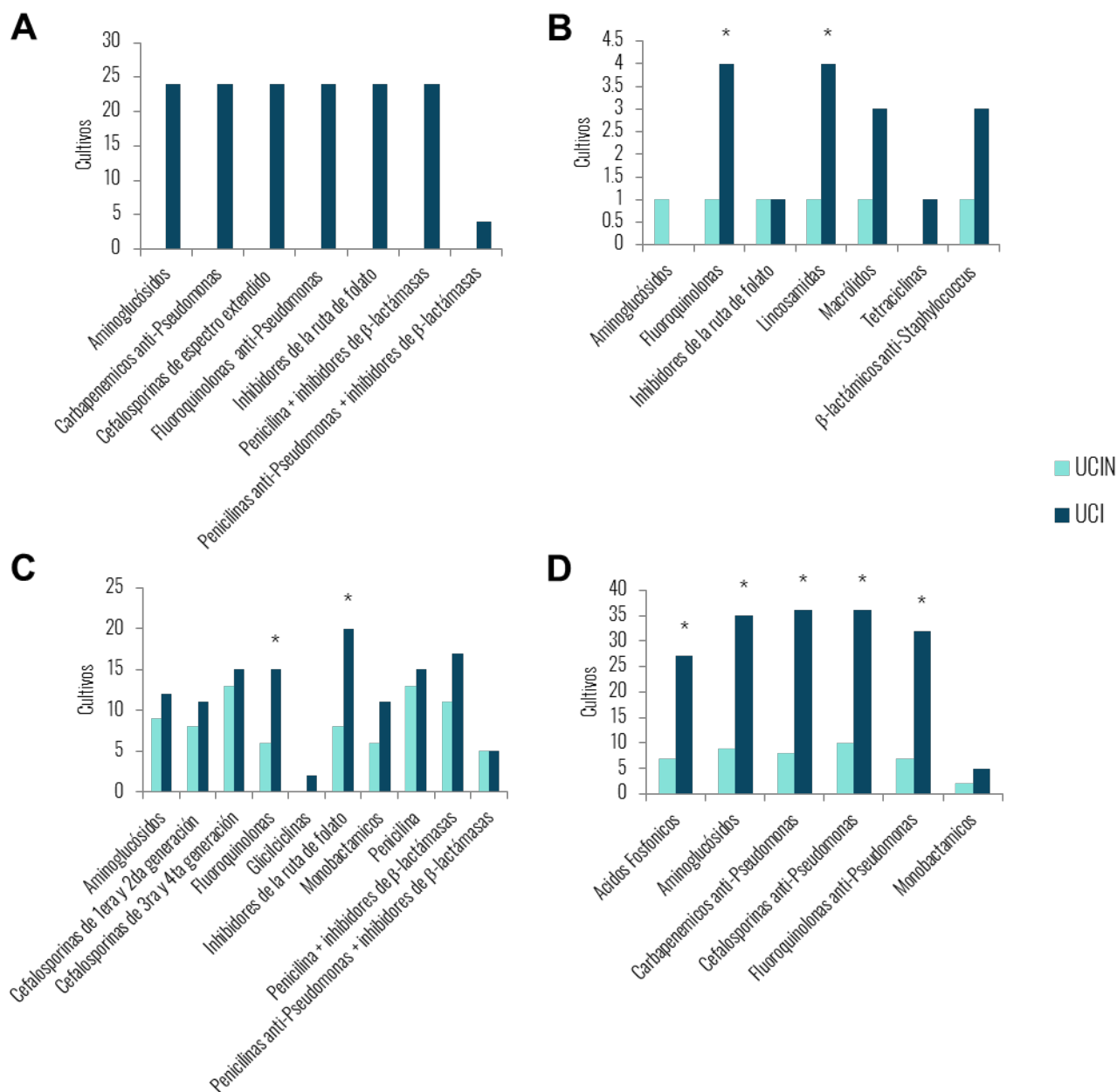


Figura 2. Cultivos bacteriológicos MDR de *A. baumannii* (A), *S. aureus* (B), *K. pneumoniae* (C) y *P. aeruginosa* (D) aislados de UCI y UCIN. Se aplicó la prueba de chi-cuadrada, con un valor de significancia estadística $P < 0.05$.

7.2 Cepas control

Se adquirieron cepas como control positivo de *S. aureus* ATCC 11632 donada por el Instituto Tecnológico de Sonora, *A. baumannii* y *K. pneumoniae* donadas por HGZ1 IMSS de BCS y *P.aeruginosa* ATCC 27853 donada por INSP-CISEI. Así mismo, INSP-CISEI donó cepas de referencia que expresan diferentes mecanismos de resistencia; *A. baumannii* 9001, *A. baumannii* 8400, *A. baumannii* 7811, *P. aeruginosa* 4899 and *P. aeruginosa* 6102, que producen OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like, IMP y VIM respectivamente.

7.3 Estandarización de amplificación por PCR punto final

Se establecieron las condiciones de amplificación de PCR punto final para *S.aureus* ATCC 11632, *A. baumannii*, *K.pneumoniae* y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Las reacciones individuales se prepararon de acuerdo a la Tabla VII. En la Figura 2 se muestran productos de PCR con los tamaños de amplicón esperados.

Tabla VII. Mezcla de reacción de PCR punto final para estandarización de amplificación.

Reactivo	Concentración	Volumen μ l
H2O MQ	Volumen final 25 μ l	17.94
Buffer GoTaq	5x	2.5
MgCl ₂	25 mM	1.5
dNTP's	10 mM	1
Primers	10 μ M	1
Taq polimerasa	8 unidades/ μ l	0.06
Templado	100 ng/ μ l	1

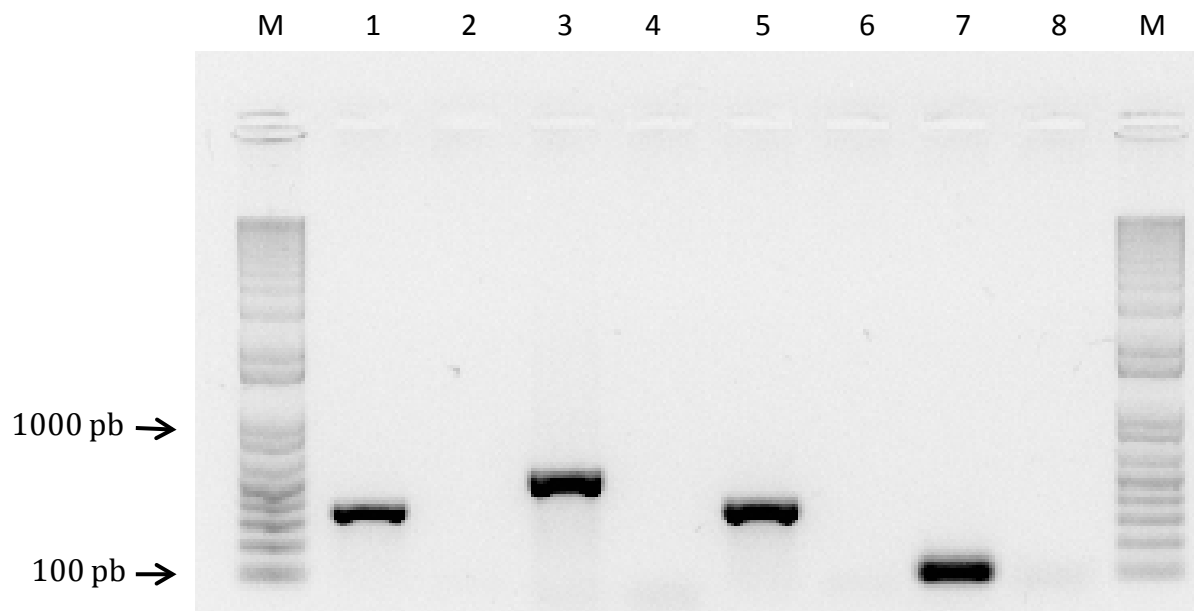


Figura 3. Amplificación por PCR punto final. Gel de agarosa al 1% con los productos de PCR. En donde, M: es el marcador de peso molecular de 1 kb plus, 1: *A. baumannii* (353 pb), 2: ddH₂O, 3: *Pseudomonas aeruginosa* (528 pb), 4: ddH₂O, 5: *K. pneumoniae* (364 pb), 6: ddH₂O, 7: *S. aureus* (107 pb), 8: ddH₂O.

7.4 Diseño de primers

Se realizó el diseño de primers para la identificación por LAMP de *A. baumannii* y *K. pneumoniae*, mediante el programa PrimerExplorer V5 (<https://primerexplorer.jp/e/>). Se diseñaron 6 primers incluyendo primers internos (FIP y BIP), externos (F3 y B3) y del *loop* (LF y LB), que reconocen 8 regiones distintas en los genes intrínsecos *bla*_{OXA-51-like} y *mdh*, en *A. baumannii* y *K. pneumoniae* respectivamente (Tabla VIII).

Así mismo, se diseñaron los primers para la identificación de los genes involucrados en los mecanismos de resistencia a antimicrobianos para *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Se diseñaron los primers para las Clase D β-lactamasas: *bla*OXA-23 (GenBank: AJ132105.1), *bla*OXA-24 (GenBank: AJ239129.2), *bla*OXA-51 (GenBank:

AJ309734.2), y blaOXA-58 (GenBank: AY665723.1). Para *K. pneumoniae* carbapenemasas (KPC), Metalo- β -lactamasas (MBL): Imipenemasas (IMP), Verona integrón Metalo- β -lactamasa (VIM) y New Delhi Metalo- β -lactamasa (NDM), y las β -lactamasas de amplio espectro Sulfhídrido variable (SHV) y Temoneira (TEM), se realizaron alineamientos múltiples mediante Clustal con la finalidad de identificar regiones conservadas en las secuencias más actualizadas de la base de datos: Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database construida por NCBI. (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>). También se realizó el diseño de los primers para la identificación del gen *mecA* en *S. aureus* el cual le confiere resistencia a meticilina. Así mismo, se diseñaron primers para la identificación del gen *mcr-1* (GenBank: KP347127.1) que confiere resistencia a colistina (Anexo II).

Tabla VIII. Primers diseñados para la identificación de *A. baumannii* y *K. pneumoniae* por LAMP.

Primer	5'pos	3'pos	Tamaño (pb)	Tm	Secuencia
<i>Acinetobacter baumannii</i>					
F3	237	256	20	54.70	TTCGACCTTCAAATGCTTA
B3	410	429	20	55.13	GAGTTCAAGTCCAATACGAC
FIP			38		GCCCGTCCCCTTAAATACT- CTTTGATCGGCCTTGAGC
BIP			45		AGGCTATTCCCAGAATGGGAAAAG- AGCTAAATCTTGATAAACCGG
F2	260	277	18	57.57	CTTTGATCGGCCTTGAGC
F1c	300	319	20	59.02	GCCCGTCCCCTTAAATACT
B2	388	408	21	55.26	AGCTAAATCTTGATAAACCGG
B1c	325	348	24	62.60	AGGCTATTCCCAGAATGGGAAAAG
LF	278	297	20	61.5	TGTGGTGGTTGCCTTATGGT
LB	363	384	22	62.93	CGATGCTATGAAAGCTTCCGCT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
F3	311	328	18	60.34	AAGCCGGCGTGTACGATA

B3	495	512	18	60.71	TCGGCCACTTCCTGATCG
FIP			42		AGCTCCGCCACAAAGGTATTGG- AAACAAACTGTTTCGGCGTGA
BIP			41		GGTCAATCGGCAACCGAGGTG- CTGCGACAGTAAAGGCAGAA
F2	330	349	20	60.44	AAACAAACTGTTTCGGCGTGA
F1c	371	392	22	64.98	AGCTCCGCCACAAAGGTATTGG
B2	455	474	20	59.73	CTGCGACAGTAAAGGCAGAA
B1c	397	417	21	65.43	GGTCAATCGGCAACCGAGGTG
LF	353	370	18	61.44	AGCGGATGATGTCCAGCG
LB	423	440	18	61.42	CCCGGTTATTGGCGGTCA

7.5 Estandarización de LAMP para bacterias patógenas

Se estandarizó la técnica de LAMP para las bacterias: *A. baumannii*, *S. aureus* ATCC 11632, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Tabla IX). Se obtuvo el patrón de bandeo característico de la amplificación resultante de ocho regiones específicas para cada uno de los genes y se observó un cambio de color con 1,000X SYBR Green indicando una reacción positiva (Figura 4).

Tabla IX. Mezcla de reacción de LAMP para bacterias patógenas.

Reactivo	Concentración	S. <i>aureus</i>	A. <i>baumannii</i>	K. <i>pneumoniae</i>	P. <i>aeruginosa</i>
H2O MQ	Volumen final 25 µl	8	8	8	9
Termopol	10X	2.5	2.5	2.5	2.5
MgSO4	100 mM	1.5	1.5	1.5	1.5
dNTP's	10 mM	3	4	3	4
FIP	40 µM	1	1	2	1
BIP	40 µM	1	1	2	1
F3	5 µM	1	1	2	1
B3	5 µM	1	1	2	1
LF	20 µM	1	1	2	1
LB	20 µM	1	1	2	1
BST	8 unidades/µl	1	1	1	1
polimerasa					

Templado	100 ng/μl	2	1	1	1
Betaina	5 M	1	1	1	-
SYBR Green	1,000X	2	1	1	1

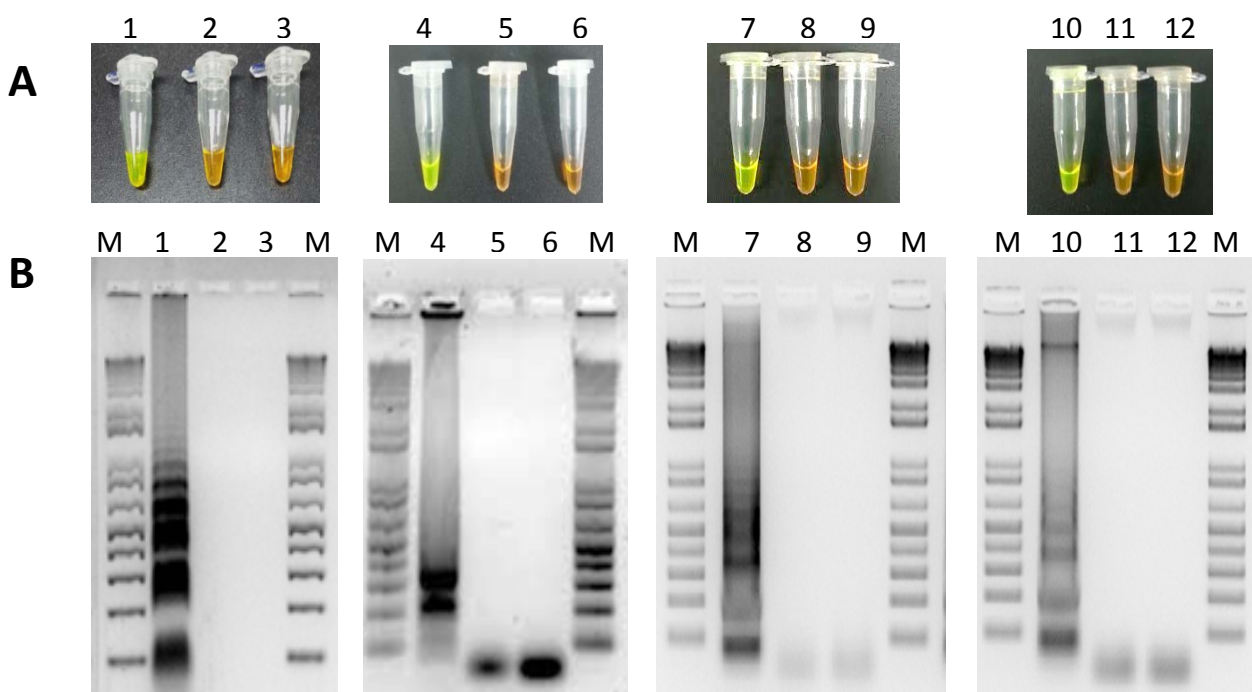


Figura 4. Amplificación por medio de LAMP de bacterias patógenas. **A.** Productos de LAMP detectados con 1,000X SYBR Green I. **B.** Productos de LAMP detectados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed. Dónde: M: marcador de peso molecular 1 Kb plus. Tubo y carril 1: *A. baumannii*, tubo y carril 2: control negativo (ADNg *Salmonella* sp.), tubo y carril 3: ddH₂O, tubo y carril 4: *S. aureus*, tubo y carril 5: control negativo (ADNg *Salmonella* sp.), tubo y carril 6: ddH₂O, tubo y carril 7: *K. pneumoniae*, tubo y carril 8: control negativo (ADNg *Salmonella* sp.), tubo y carril 9: ddH₂O, tubo y carril 10: *P. aeruginosa*, tubo y carril 11: control negativo (ADNg *Salmonella* sp.), tubo y carril 12: ddH₂O.

7.6. Estandarización de LAMP para genes de resistencia

Se realizó la estandarización de LAMP para la detección de los genes involucrados en el mecanismo de resistencia de *A. baumannii*, *S. aureus*, *K.*

pneumoniae y *P. aeruginosa*; Clase A β -lactamasas (ESBL): *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{KPC}, Clase B β -lactamasas; *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, Clase D β -lactamasas; *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} y *mecA* de MRSA (Tabla X) (Figura 5 y 6).

Tabla X. Mezcla de reacción de LAMP para genes de resistencia.

Reactivo	Concentración	<i>bla</i> _{OXA-23-like}	<i>bla</i> _{OXA-24-like}	<i>bla</i> _{OXA-58-like}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{IMP}
H2O MQ	Volumen final 25 μ l	7	6	7	7	5
Termopol	10X	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
MgSO4	100 mM	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
dNTP's	10 mM	3	3	3	3	3
FIP	40 μ M	1	1	1	1	1
BIP	40 μ M	1	1	1	1	1
F3	5 μ M	1	1	1	1	1
B3	5 μ M	1	1	1	1	1
LF	20 μ M	1	1	1	1	1
LB	20 μ M	1	1	1	1	1
BST polimerasa	8 unidades/ μ l	1	1	1	1	1
Templado	100 ng/ μ l	1	1	2	1	2
Betaina	5 M	1	2	-	1	2
SYBR Green	1,000X	1	1	1	1	1

Reactivo	Concentración	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>mecA</i>
Termopol	10X	2.5	2.5	2.5	2.5	6
MgSO4	100 mM	1.5	1.5	1.5	1.5	2.5
dNTP's	10 mM	4	4	4	4	1.5
FIP	40 μ M	1	1	1	1	3
BIP	40 μ M	1	1	1	1	1
F3	5 μ M	1	1	1	1	1
B3	5 μ M	1	1	1	1	1
LF	20 μ M	-	1	1	1	1
LB	20 μ M	1	1	1	1	1
BST polimerasa	8 unidades/ μ l	1	1	1	1	1
Templado	100 ng/ μ l	1	1	1	1	1
Betaina	5 M	1	1	1	1	1
SYBR Green	1,000X	1	1	1	1	2

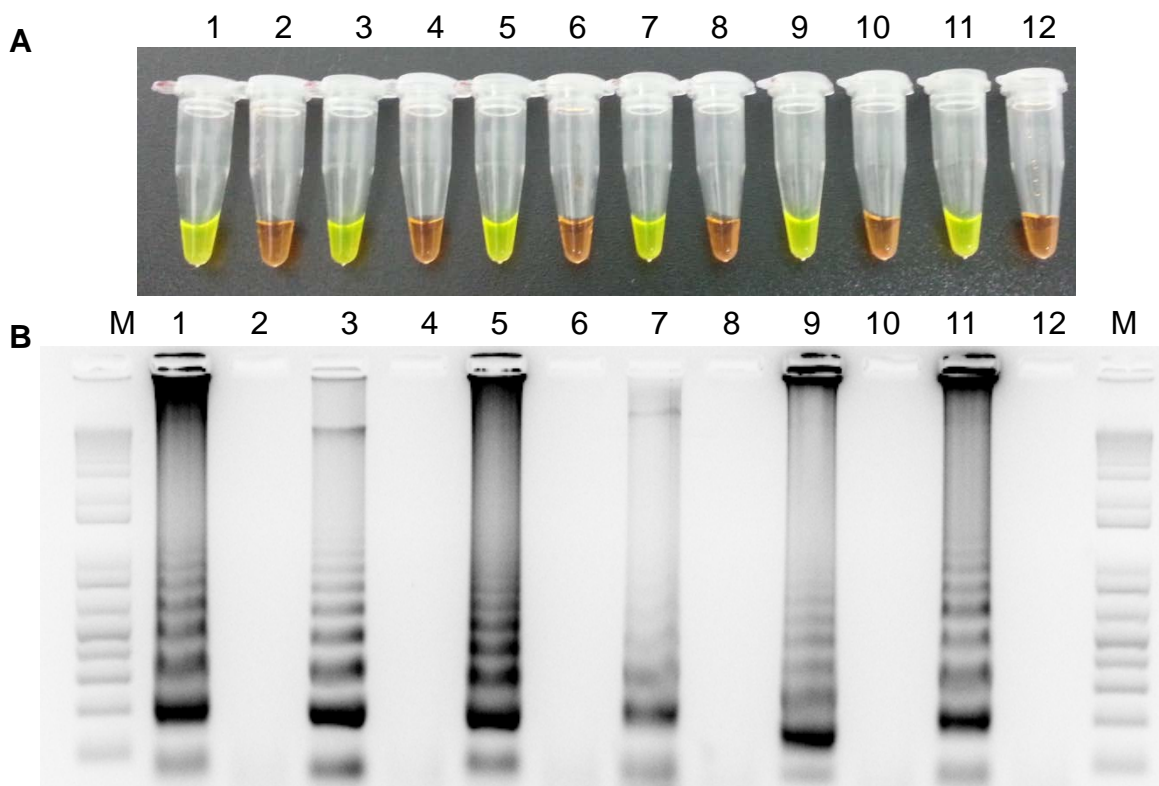


Figura 5. Amplificación por medio de LAMP de *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{VIM} y *bla*_{IMP}. **A.** Productos de LAMP detectados con 1,000X SYBR Green I. **B.** Productos de LAMP detectados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed. Dónde: M: marcador de peso molecular 1 Kb plus. Tubo y carril 1: *bla*_{OXA-23-like} (*A. baumannii* AR0056), tubo y carril 2: ddH₂O. Tubo y carril 3: *bla*_{OXA-24-like} (*A. baumannii* AR0088), tubo y carril 4: ddH₂O. Tubo y carril 5: *bla*_{OXA-51-like} (*A. baumannii* AR0101), tubo y carril 6: ddH₂O. Tubo y carril 7: *bla*_{OXA-58-like} (*A. baumannii* AR0063), tubo y carril 8: ddH₂O. Tubo y carril 9: *bla*_{VIM} (*P. aeruginosa* AR0230), tubo y carril 10: ddH₂O. Tubo y carril 11: *bla*_{IMP} (*P. aeruginosa* AR0095), tubo y carril 12: ddH₂O.

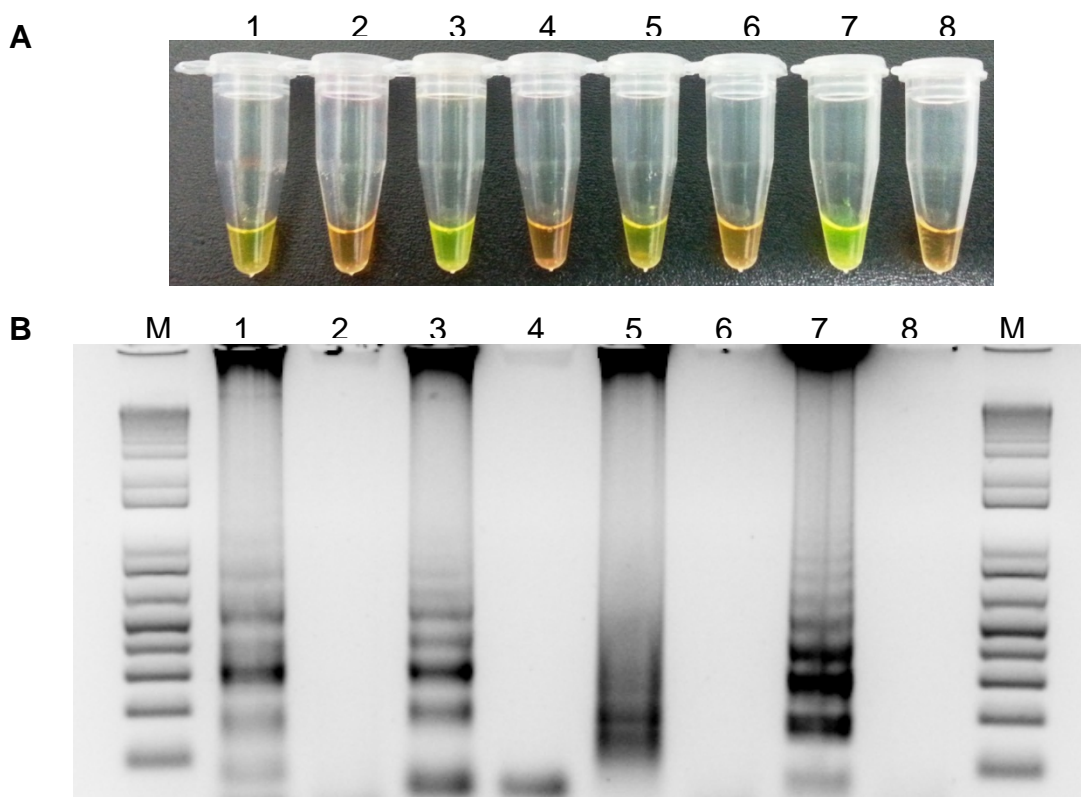


Figura 6. Amplificación por medio de LAMP de *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}. **A.** Productos de LAMP detectados con 1,000X SYBR Green I. **B.** Productos de LAMP detectados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed. Dónde: M: marcador de peso molecular 1 Kb plus. Tubo y carril 1: ADNg con presencia de *bla*_{KPC}, tubo y carril 2: ddH₂O. Tubo y carril 3: ADNg con presencia de *bla*_{NDM}, tubo y carril 4: ddH₂O. Tubo y carril 5: ADNg con presencia de *bla*_{SHV}, tubo y carril 6: ddH₂O. Tubo y carril 7: ADNg con presencia de *bla*_{TEM}, tubo y carril 8: ddH₂O.

7.7 Sensibilidad y especificidad analítica

Se determinó la sensibilidad y especificidad analítica para la identificación por LAMP de *A. baumannii*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Para ello, se realizaron diluciones seriadas a partir de ADN genómico desde 100 ng•μL⁻¹ hasta 1 fg•μL⁻¹, y se realizó amplificación por LAMP y PCR punto final para comparar los límites de detección de ambas técnicas (Figuras 7, 8, 9 y 10).

La técnica de LAMP tuvo un límite de detección de 100 fg•μL⁻¹ de templado para *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, y 10 fg•μL⁻¹ de templado para *S. aureus* (Figura 4B, Figura 5B, Figura 6B y Figura 7B), mientras que el PCR punto final detectó hasta 1 pg•μL⁻¹ para *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, y 10 pg•μL⁻¹ *S. aureus* (Figura 7C, Figura 8C, Figura 9C, Figura 10C), estos resultados sugieren que la detección de *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* por LAMP es hasta 10 veces más sensible, mientras que la detección de *S. aureus* es hasta 100 veces mayor que un PCR convencional.

La especificidad de LAMP para la detección de *A. baumannii*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, se determinó utilizando ADN genómico de siete bacterias diferentes (Tabla XI, Tabla XII, Tabla XIII y Tabla XIV). No se presentaron falsos positivos indicando la factibilidad del uso de esta técnica para la correcta identificación del patógeno en cuestión.

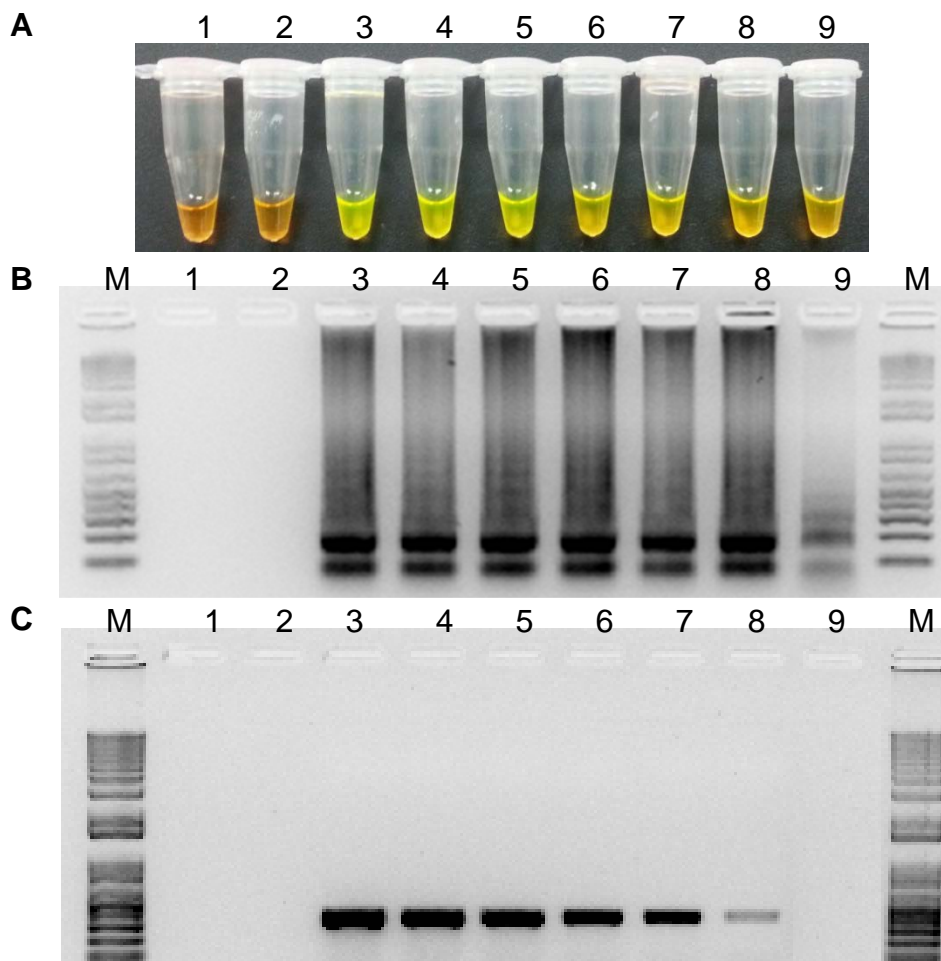


Figura 7. Evaluación de la sensibilidad analítica de LAMP para identificar *A. baumannii*. **A.** Productos de LAMP detectados con 1,000X SYBR Green I. **B.** Productos de LAMP detectados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed. Dónde: M: marcador de peso molecular 1 Kb plus. **C.** Productos de PCR detectados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed. Tubo y carril 1: ddH₂O, tubo y carril 2: control negativo (ADNg *Salmonella* sp.), tubos y carriles 3-9: ADNg de *Acinetobacter baumannii* 100.0 ng·μL⁻¹, 10.0 ng·μL⁻¹, 1.0 ng·μL⁻¹, 100 pg·μL⁻¹, 10 pg·μL⁻¹, 1 pg·μL⁻¹, 100 fg·μL⁻¹, respectivamente.

Tabla XI. Evaluación de la especificidad analítica de LAMP para identificar *A.baumannii*.

Bacteria	Amplificación por LAMP ^a
<i>A. baumannii</i> ^b	+
<i>A. Iwoffii</i> ^b	-
<i>A. juni</i> ^b	-
<i>S. aureus</i> ATCC 11632 ^c	-
<i>S. lentus</i> ^b	-
<i>S. hominis ssp hominis</i> ^b	-
<i>E. coli</i> O157:H7 ^c	-
<i>Campilobacter jejuni</i> ^d	-
<i>Listeria monocitógenes</i> ATCC 7644 ^c	-
<i>Salmonella spp.</i> ^c	-
<i>K. pneumoniae</i> ^b	-
<i>K. oxytoca</i> ^b	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ^e	-
<i>P. fluorescens</i> ^b	-
<i>P. putida</i> ^b	-

^a +, amplificación observada después de una incubación de 60 minutos; -, amplificación no observada después de una incubación de 60 minutos.

^b Procedencia: IMSS.

^c Procedencia: Instituto Tecnológico de Sonora.

^d Procedencia: ISSSTE.

^e Procedencia: INSP-CISEI

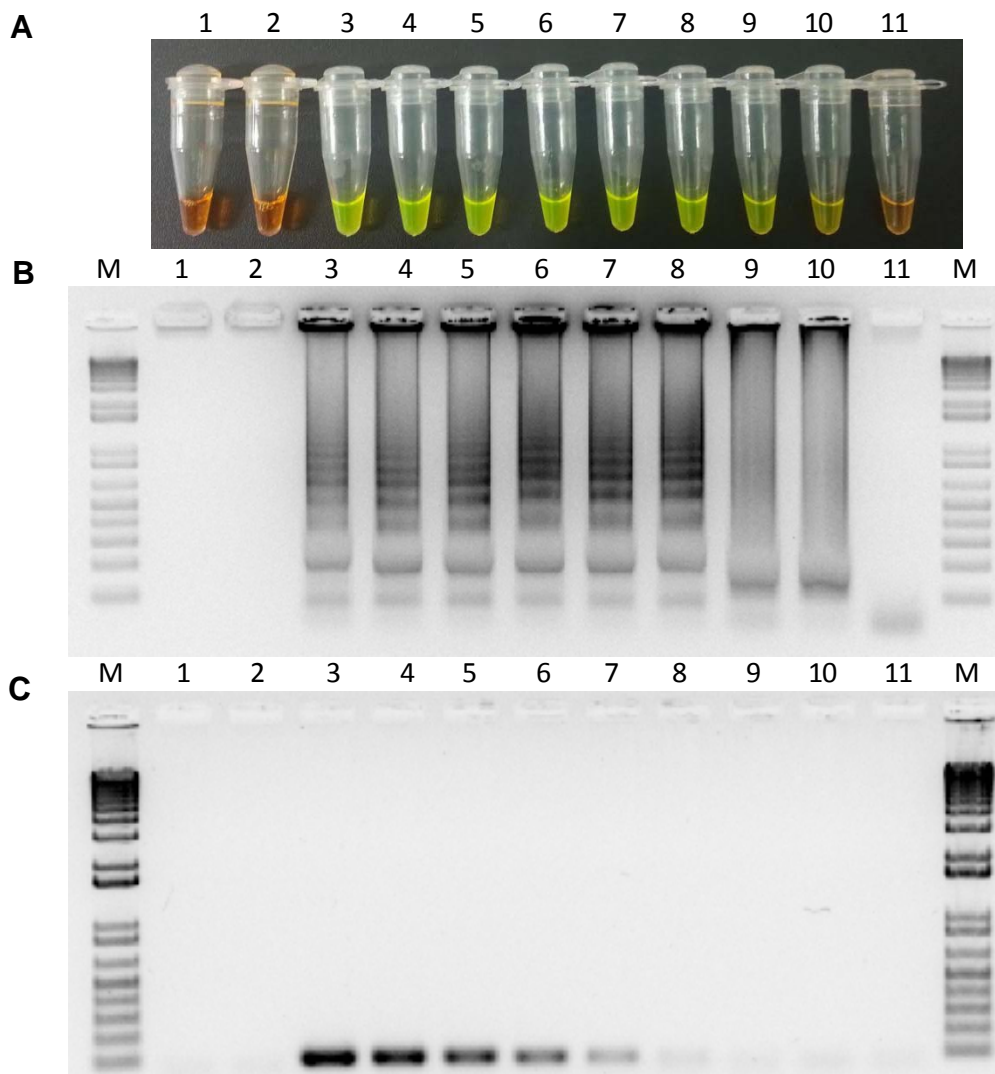


Figura 8. Evaluación de la sensibilidad analítica de LAMP para identificar *S. aureus*. **A.** Productos de LAMP detectados con 1,000X SYBR Green I. **B.** Productos de LAMP detectados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed. Dónde: M: marcador de peso molecular 1 Kb plus. **C.** Productos de PCR detectados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed. Tubo y carril 1: ddH₂O, tubo y carril 2: control negativo (ADNg *Salmonella* sp.), tubos y carriles 3-9: ADNg de *S. aureus* 100.0 ng•μL⁻¹, 10.0 ng•μL⁻¹, 1.0 ng•μL⁻¹, 100 pg•μL⁻¹, 10 pg•μL⁻¹, 1 pg•μL⁻¹, 100 fg•μL⁻¹, respectivamente.

Tabla XII. Evaluación de la especificidad analítica de LAMP para identificar *S. aureus*.

Bacteria	Amplificación por LAMP ^a
<i>S. aureus</i> ATCC 11632 ^c	+
<i>S. lentus</i> ^b	-
<i>S. hominis ssp hominis</i> ^b	-
<i>E. coli</i> O157:H7 ^c	-
<i>Campilobacter jejuni</i> ^d	-
<i>Listeria monocitógenes</i> ATCC 7644 ^c	-
<i>Salmonella spp.</i> ^c	-
<i>K. pneumoniae</i> ^b	-
<i>K. oxytoca</i> ^b	-
<i>A. baumannii</i> ^b	-
<i>A. Iwoffii</i> ^b	-
<i>A. juni</i> ^b	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ^e	-
<i>P. fluorescens</i> ^b	-
<i>P. putida</i> ^b	-

^a +, amplificación observada después de una incubación de 60 minutos; -, amplificación no observada después de una incubación de 60 minutos.

^b Procedencia: IMSS.

^c Procedencia: Instituto Tecnológico de Sonora.

^d Procedencia: ISSSTE.

^e Procedencia: INSP-CISEI

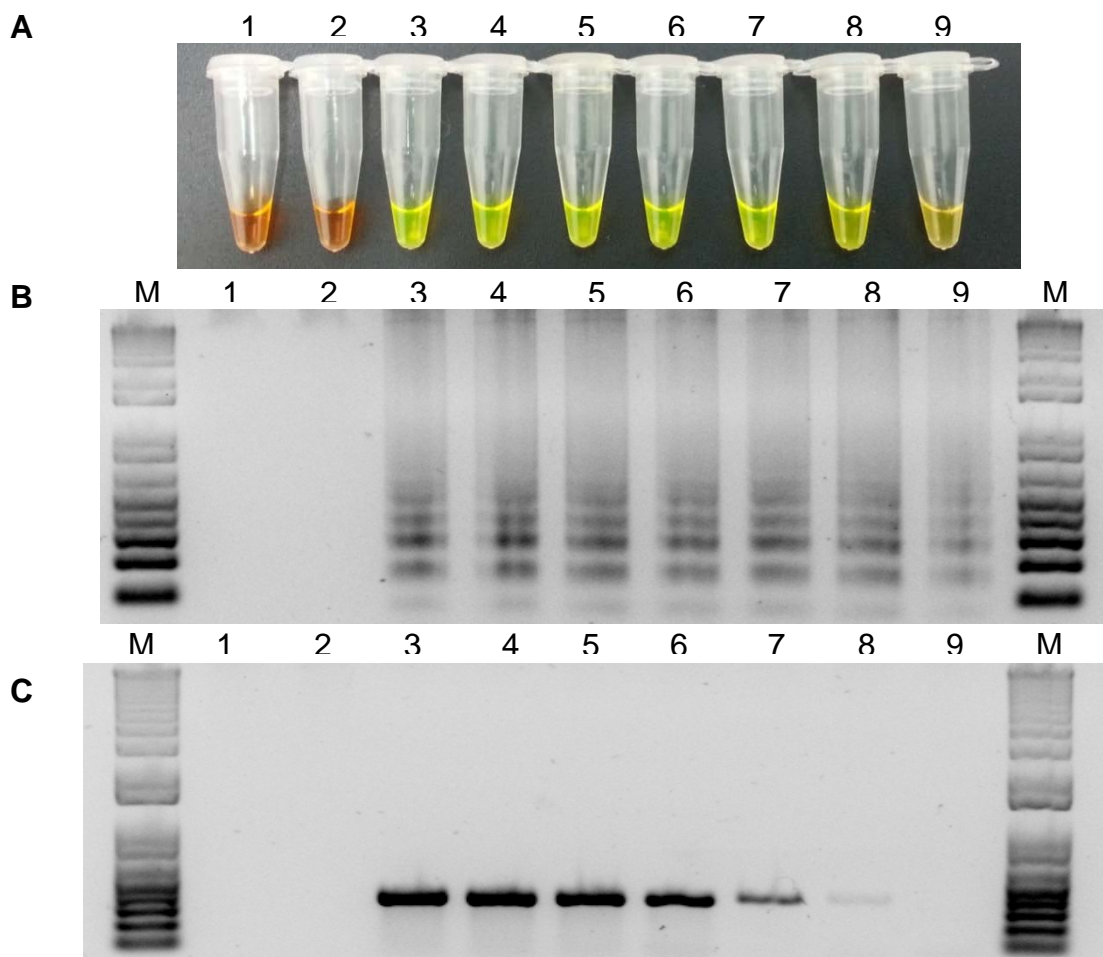


Figura 9. Evaluación de la sensibilidad analítica de LAMP para identificar *K. pneumoniae*. **A.** Productos de LAMP detectados con 1,000X SYBR Green I. **B.** Productos de LAMP detectados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed. Dónde: M: marcador de peso molecular 1 Kb plus. **C.** Productos de PCR detectados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed. Tubo y carril 1: ddH₂O, tubo y carril 2: control negativo (ADNg *Salmonella sp.*), tubos y carriles 3-9: ADNg de *K. pneumoniae* 100.0 ng·μL⁻¹, 10.0 ng·μL⁻¹, 1.0 ng·μL⁻¹, 100 pg·μL⁻¹, 10 pg·μL⁻¹, 1 pg·μL⁻¹, 100 fg·μL⁻¹, respectivamente.

Tabla XIII. Evaluación de la especificidad analítica de LAMP para identificar *K. pneumoniae*.

Bacteria	Amplificación por LAMP ^a
<i>K. pneumoniae</i> ^b	+
<i>K. oxytoca</i> ^b	-
<i>S. aureus</i> ATCC 11632 ^c	-
<i>S. lentus</i> ^b	-
<i>S. hominis ssp hominis</i> ^b	-
<i>E. coli</i> O157:H7 ^c	-
<i>Campilobacter jejuni</i> ^d	-
<i>Listeria monocitógenes</i> ATCC 7644 ^c	-
<i>Salmonella spp.</i> ^c	-
<i>A. baumannii</i> ^b	-
<i>A. Iwoffii</i> ^b	-
<i>A. juni</i> ^b	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ^e	-
<i>P. fluorescens</i> ^b	-
<i>P. putida</i> ^b	-

^a +, amplificación observada después de una incubación de 60 minutos; -, amplificación no observada después de una incubación de 60 minutos.

^b Procedencia: IMSS.

^c Procedencia: Instituto Tecnológico de Sonora.

^d Procedencia: ISSSTE.

^e Procedencia: INSP-CISEI

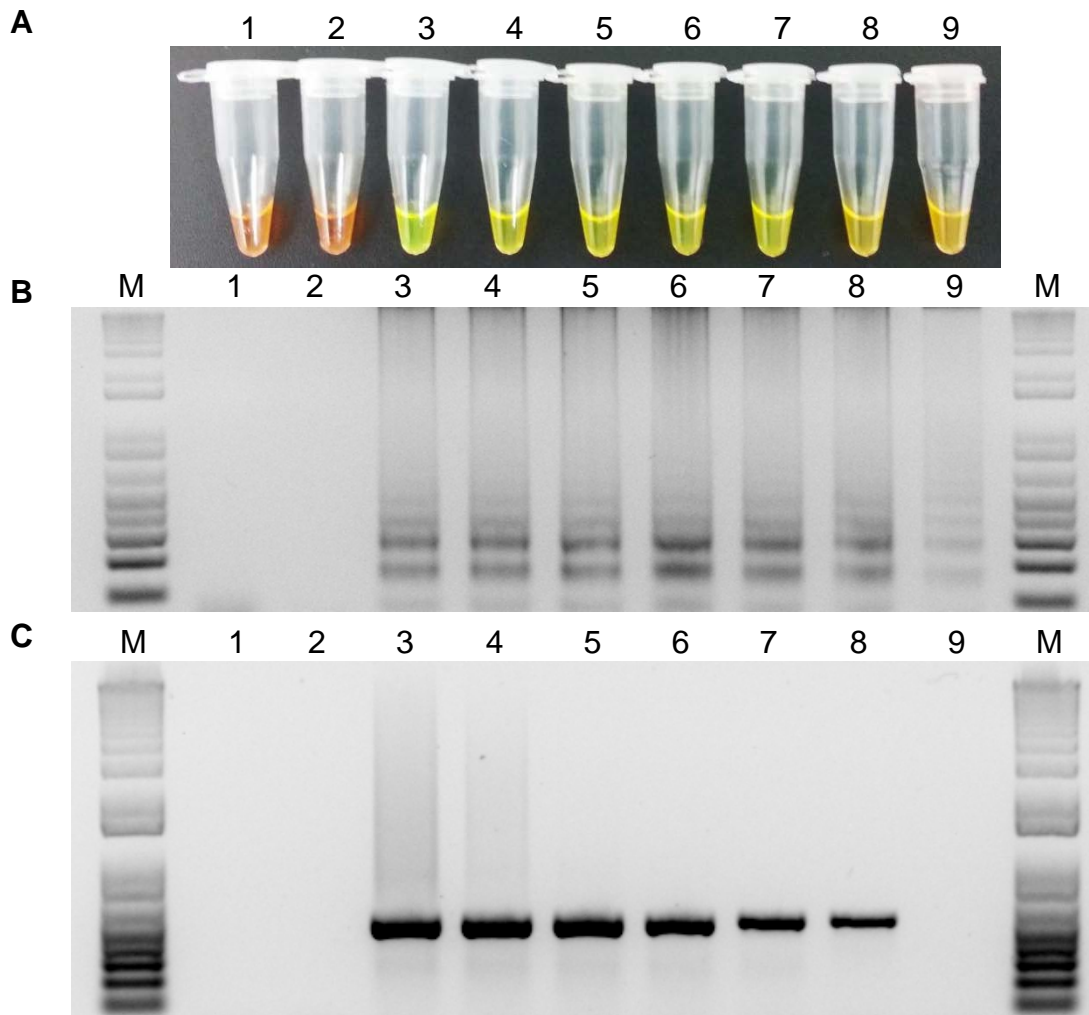


Figura 10. Evaluación de la sensibilidad analítica de LAMP para identificar *P. aeruginosa*. **A.** Productos de LAMP detectados con 1,000X SYBR Green I. **B.** Productos de LAMP detectados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed. Dónde: M: marcador de peso molecular 1 Kb plus. **C.** Productos de PCR detectados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed. Tubo y carril 1: ddH₂O, tubo y carril 2: control negativo (ADNg *Salmonella* sp.), tubos y carriles 3-11: ADNg de *P. aeruginosa* 100.0 ng·μL⁻¹, 10.0 ng·μL⁻¹, 1.0 ng·μL⁻¹, 100 pg·μL⁻¹, 10 pg·μL⁻¹, 1 pg·μL⁻¹, 100 fg·μL⁻¹, 10 fg·μL⁻¹, 1 fg·μL⁻¹ respectivamente.

Tabla XIV. Evaluación de la especificidad analítica de LAMP para identificar *P. aeruginosa*.

Bacteria	Amplificación por LAMP ^a
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ^e	+
<i>P. fluorescens</i> ^b	-
<i>P. putida</i> ^b	-
<i>S. aureus</i> ATCC 11632 ^c	-
<i>S. lentus</i> ^b	-
<i>S. hominis ssp hominis</i> ^b	-
<i>E. coli</i> O157:H7 ^c	-
<i>Campilobacter jejuni</i> ^d	-
<i>Listeria monocitogenes</i> ATCC 7644 ^c	-
<i>Salmonella spp.</i> ^c	-
<i>K. pneumoniae</i> ^b	-
<i>K. oxytoca</i> ^b	-
<i>A. baumannii</i> ^b	-
<i>A. Iwoffii</i> ^b	-
<i>A. juni</i> ^b	-

^a +, amplificación observada después de una incubación de 60 minutos; -, amplificación no observada después de una incubación de 60 minutos.

^b Procedencia: IMSS.

^c Procedencia: Instituto Tecnológico de Sonora.

^d Procedencia: ISSSTE.

^e Procedencia: INSP-CISEI

7.8. Sensibilidad y especificidad clínica

El cálculo de la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del equipo automatizado Vitek 2 y la técnica de diagnóstico rápido por medio de LAMP para la detección de, *A. baumannii*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* fue de 100% (Tabla XV). Mientras que la sensibilidad de la técnica de PCR punto final para la detección de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* fue de 95.65 (IC95%:78.05-99.89) y 96.61 (IC95%:88.29-99.59) y el VPN fue de 98.28 (IC95%:95.27-99.89) y 98.06 (IC95%:92.82-99.50), respectivamente.

Así mismo, la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la técnica de diagnóstico rápido por medio de LAMP para la detección de los genes involucrados con los mecanismos de resistencia de dichas bacterias fue de 100% (Tabla XV, XVI, XVII y XVIII). La detección por medio de PCR mostró una sensibilidad para el caso de blaTEM de 35.29% (IC95%:19.75-53.51) en *K. pneumoniae* ($P < 0.05$) y hasta de 65% (IC95%:40.78-84.61) en *A. baumannii* ($P < 0.05$). El VPN para el caso de blaTEM, mostró valores desde 30% (IC95%:19.08-43.78) en *A. baumannii* y hasta de 98.21 (IC95%:90.97-99.67) en *P. aeruginosa*. La especificidad y VPP para la detección de todos los genes de resistencia fue de 100% tanto para PCR como LAMP (Tabla XVI, XVII, XVIII y XIX).

Tabla XV. Evaluación de Vitek 2, PCR y LAMP para identificar bacterias patógenas.

	No. de cultivos		Sensibilidad (%)	IC (%)	Especificidad (%)	IC (%)	VPP (%)	IC (%)	VPN (%)	IC (%)
	Positivos	Negativos								
<i>A. baumannii</i>										
Vitek	31	161	100	88.78-100	100	97.73-100	100	-	100	-
PCR	30	162	96.77	83.30-99.92	100	97.73-100	100	-	99.38	95.90-99.91
LAMP	31	161	100	88.78-100	100	97.73-100	100	-	100	-
<i>S. aureus</i>										
Vitek	40	152	100	91.19-100	100	97.60-100	100	-	100	-
PCR	40	152	100	91.19-100	100	97.60-100	100	-	100	-
LAMP	40	152	100	91.19-100	100	97.60-100	100	-	100	-
<i>K. pneumoniae</i>										
Vitek	46	146	100	92.29-100	100	97.51-100	100	-	100	-
PCR	46	146	100	92.29-100	100	97.51-100	100	-	100	-
LAMP	46	146	100	92.29-100	100	97.51-100	100	-	100	-
<i>P. aeruginosa</i>										
Vitek	75	117	100	95.20-100	100	96.90-100	100	-	100	-
PCR	73	119	97.33	90.70-99.68	100	96.90-100	100	-	98.32	93.71-99.57
LAMP	75	117	100	95.20-100	100	96.90-100	100	-	100	-

VPP, Valor Predictivo Positivo

VPN, Valor Predictivo Negativo

IC, Intervalo de Confianza (95%)

-, no aplica

n=192

Tabla XVI. Evaluación de PCR y LAMP para identificar genes de resistencia a antimicrobianos en *A. baumannii*.

	LAMP VS PCR												
	No. de cultivos				Sensibilidad (%)	CI (%)	Especificidad (%)	CI (%)	VPP (%)	CI (%)	VPN (%)	CI (%)	
	LAMP		PCR										
	Frecuencia ^b (%)	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo								
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	6.4 (2/31)	2	29	2	29	100/100	15.81-100/ 15.81-100	100/100	88.06-100/ 88.06-100	100/100	-/-	100/100	-/-
<i>bla</i> _{VIM}	3.2 (1/31)	1	30	1	30	100/100	2.50-100/ 2.50-100	100/100	88.43-100/ 88.43-100	100/100	-/-	100/100	-/-
<i>bla</i> _{TEM}	90.3(28/31)	28 ^a	3	21	10	100/75	87.66-100/ 55.13-89.31	100/100	29.24-100/ 29.24-100	100/100	-/-	100/30	-/18.41-44.87

VPP, Valor Predictivo Positivo; VPN, Valor Predictivo Negativo; IC, Intervalo de Confianza (95%); -, no aplica; n=31; ^a: Diferencia estadística ($P < 0.05$); ^b: Frecuencia relativa dada por LAMP.

Tabla XVII. Evaluación de PCR y LAMP para identificar genes de resistencia a antimicrobianos en *S. aureus*.

	LAMP VS PCR												
	No. de cultivos				Sensibilidad (%)	CI (%)	Especificidad (%)	CI (%)	VPP (%)	CI (%)	VPN (%)	CI (%)	
	LAMP		PCR										
	Frecuencia ^b (%)	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo								
<i>mecA</i>	10.0(4/40)	4	36	4	36	100/100	39.76-100/39.76-100	100/100	90.26-100/90.26-100	100/100	-/-	100/100	-/-

VPP, Valor Predictivo Positivo; VPN, Valor Predictivo Negativo; IC, Intervalo de Confianza (95%); -, no aplica; n=40; ^b: Frecuencia relativa dada por LAMP.

Tabla XVIII. Evaluación de PCR y LAMP para identificar genes de resistencia a antimicrobianos en *K. pneumoniae*.

	No. de cultivos				LAMP VS PCR								
	LAMP		PCR		Sensibilidad (%)	CI (%)	Especificidad (%)	CI (%)	VPP (%)	CI (%)	VPN (%)	CI (%)	
	Frecuencia ^b (%)	Positivo	Negativo	Positivo									Negativo
<i>bla_{VIM}</i>	8.7(4/46)	4	42	2	44	100/50	39.76-100/ 6.76-93.24	100/100	91.59-100/ 91.59-100	100/100	-/-	100/95.45	-/88.74-98.24
<i>bla_{TEM}</i>	78.3(36/46)	36 ^a	10	24	22	100/66.67	90.26-100/ 49.03-81.44	100/100	69.15-100/ 69.15-100	100/100	-/-	100/45.45	-/34.43-56.95
<i>bla_{SHV}</i>	84.8(39/46)	39	7	35	11	100/89.74	90.97-100/ 75.78-97.13	100/100	59.04-100/ 59.04-100	100/100	-/-	100/63.64	-/40.88-81.58

VPP, Valor Predictivo Positivo; VPN, Valor Predictivo Negativo; IC, Intervalo de Confianza (95%); -, no aplica; n=46; ^a: Diferencia estadística ($P < 0.05$); ^b: Frecuencia relativa dada por LAMP.

Tabla XIX. Evaluación de PCR y LAMP para identificar genes de resistencia a antimicrobianos en *P.aeruginosa*.

	No. de cultivos				LAMP VS PCR								
	LAMP		PCR		Sensibilidad (%)	CI (%)	Especificidad (%)	CI (%)	VPP (%)	CI (%)	VPN (%)	CI (%)	
	Frecuencia ^a (%)	Positivo	Negativo	Positivo									Negativo
<i>bla_{VIM}</i>	24 (18/75)	18	57	16	59	100/88.89	81.47-100/ 65.29-98.62	100/100	93.73-100/ 93.73-100	100/100	-/-	100/96.61	-/88.53-99.06
<i>bla_{KPC}</i>	2.6 (2/75)	2	73	2	73	100/100	15.81-100/ 15.81-100	100/100	95.07-100/ 95.07-100	100/100	-/-	100/100	-/-
<i>bla_{TEM}</i>	50.6 (38/75)	38	37	27	48	100/71.05	90.75-100/ 54.10-84.58	100/100	90.51-100/ 90.51-100	100/100	-/-	100/77.08	-/67.15-84.70
<i>bla_{SHV}</i>	34.6 (26/75)	26	49	22	53	100/84.62	86.77-100/ 65.13-95.64	100/100	92.75-100/ 92.75-100	100/100	-/-	100/92.45	-/83.26-96.79

VPP, Valor Predictivo Positivo; VPN, Valor Predictivo Negativo; IC, Intervalo de Confianza (95%); -, no aplica; n=75; ^a: Frecuencia relativa dada por LAMP.

7.9 Metagenómica del ambiente hospitalario

7.9.1 Extracción de ADN de muestras ambientales

Se obtuvieron 25 muestras; 3 réplicas biológicas por área y el control negativo, con una concentración y calidad de ADN dentro de los parámetros adecuados para ser enviadas a la empresa GENEWIZ donde se realizó la preparación de librerías y secuenciación la región V3-V4 del gen 16S del RNA ribosomal (Tabla XX).

Tabla XX. Concentración y calidad de las muestras ambientales.

Numero	Muestra	Concentración (ng/uL)	260/280
1	UCIN área común-1	355.7	1.88
2	UCIN área común-2	365.0	1.89
3	UCIN área común-3	425.9	1.89
4	UCIN área aislada-1	340.4	1.89
5	UCIN área aislada-2	380.3	1.89
6	UCIN área aislada-3	386.5	1.89
7	UCI área común-1	402.5	1.91
8	UCI área común-2	412.6	1.90
9	UCI área común-3	410.2	1.90
10	UCI área aislada-1	289.8	1.90
11	UCI área aislada-1	306.2	1.90
12	UCI área aislada-1	401.9	1.87
13	Cuneros-1	338.4	1.90
14	Cuneros-2	354.7	1.91
15	Cuneros-3	232.4	1.91
16	Hospitalización pasillo-1	116.5	1.91
17	Hospitalización pasillo-2	412.3	1.88
18	Hospitalización pasillo-3	474.3	1.90
19	Hospitalización-1	424.8	1.90
20	Hospitalización-2	261.8	1.87
21	Hospitalización-3	435.4	1.89
22	Urgencias-1	158.2	1.89
23	Urgencias-2	437.0	1.89
24	Urgencias-3	293.3	1.88
25	Control Negativo	364.1	1.91

7.9.2 Evaluación de la comunidad bacteriana

El conjunto de datos crudos de las 25 muestras fue de 649,589 secuencias. Posterior a la limpieza y ensamble, se obtuvieron 481,362 secuencias con un total de 215 Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) asignadas; identificando 8 phyla, 75 familias y 126 géneros. En la Figura 11 se observan las curvas de rarefacción, que representan el número de OTUs que fueron obtenidos de acuerdo al número de secuencias de cada muestra. El grado de cobertura alcanzado en la secuenciación fue óptimo y las muestras fueron bien representadas, debido a que las curvas alcanzaron una asíntota indicando que la secuenciación cubrió una parte importante de la riqueza de las secuencias. Con excepción de las réplicas CG12-4-3 y CG19-7-1 correspondientes al área común de UCI y hospitalización, respectivamente.

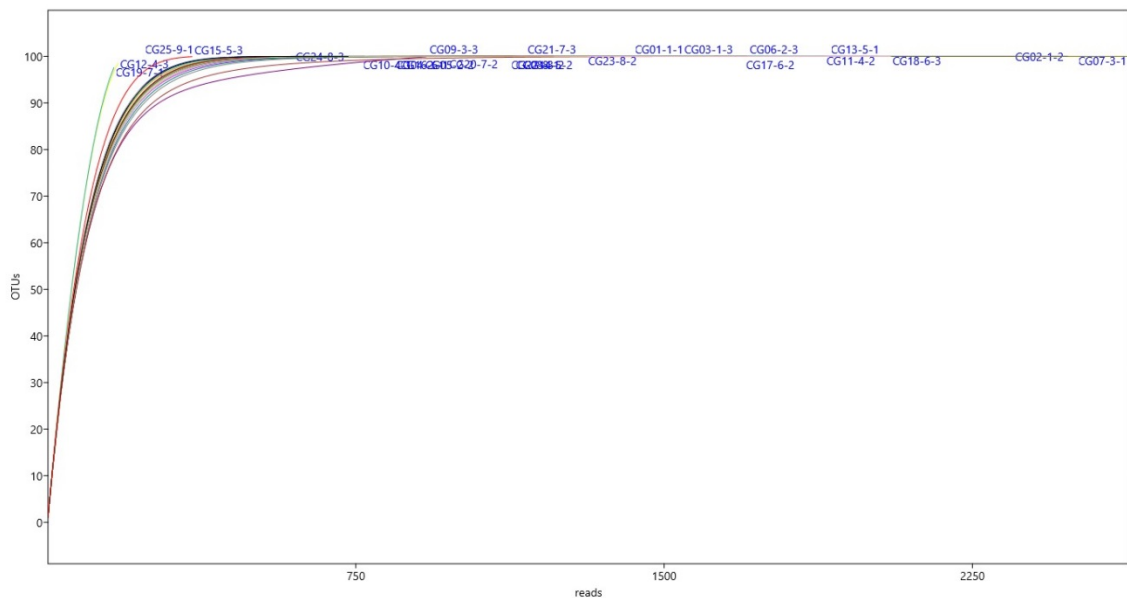


Figura 11. Curvas de rarefacción de las muestras ambientales.

9.9.3 Estructura de la comunidad bacteriana

Posterior a la normalización del número de lecturas para cada muestra utilizando la profundidad de secuenciación promedio, se determinó la abundancia relativa a nivel de phylum, familia y género en cada área. En las Figuras 12, 13 y 14 se muestran las gráficas de barras apiladas, donde la altura relativa representa el porcentaje de lecturas que pueden ser asignadas a un nivel taxonómico de phylum, familia o género.

De un total de ocho phyla bacterianas diferentes, específicamente: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Patescibacteria* y *Proteobacteria*, *Firmicutes* (33.53-70.28%) fue el phylum más abundante seguido por *Actinobacteria* (45.55-66.48%) y *Proteobacteria* (32.96-63.51%). *Actinobacteria* fue el phylum más abundante en el área de cuneros (66.48%), seguido por el área aislada de UCIN (45.55%). El phylum *Firmicutes* fue el más abundante en el área aislada de UCI (70.28%), el pasillo de hospitalización (56.12%) y hospitalización (33.53%), y *Proteobacteria* fue el más abundante en UCI (63.51%) urgencias (55.37%), el control negativo (54.62%) y UCIN (32.96%).

A nivel de familia, un total de 12 familias se observaron en todas las áreas con diferencias en su distribución. *Moraxellaceae* fue la más abundante en urgencias (67.51%) y UCIN (51.06%), *Propionibacteriaceae* en el área aislada de UCIN (99.41%) y en el control negativo (100%), *Prevotellaceae* en UCI (80.14%), *Rhodobacteraceae* en el área aislada de UCI (67.58%), *Corynebacteriaceae* en cuneros (73.25%), *Pseudomonadaceae* en hospitalización (46.82%) y *Staphylococcaceae* en el pasillo de hospitalización (84.41%).

Las comunidades microbianas de todas las áreas estuvieron dominadas por *Enhydrobacter* en urgencias (53.17%) y UCIN (44.14%), *Prevotellaceae* en UCI (80.14%), *Paracoccus* en el área aislada de UCI (67.58%), *Cutibacterium* en el

área aislada de UCIN (99.41%) y el control negativo (100%), *Corynebacterium* en cuneros (44.37%), *Pseudomonas* en hospitalización (46.82%) y *Staphylococcus* en el pasillo de hospitalización (84.41%).

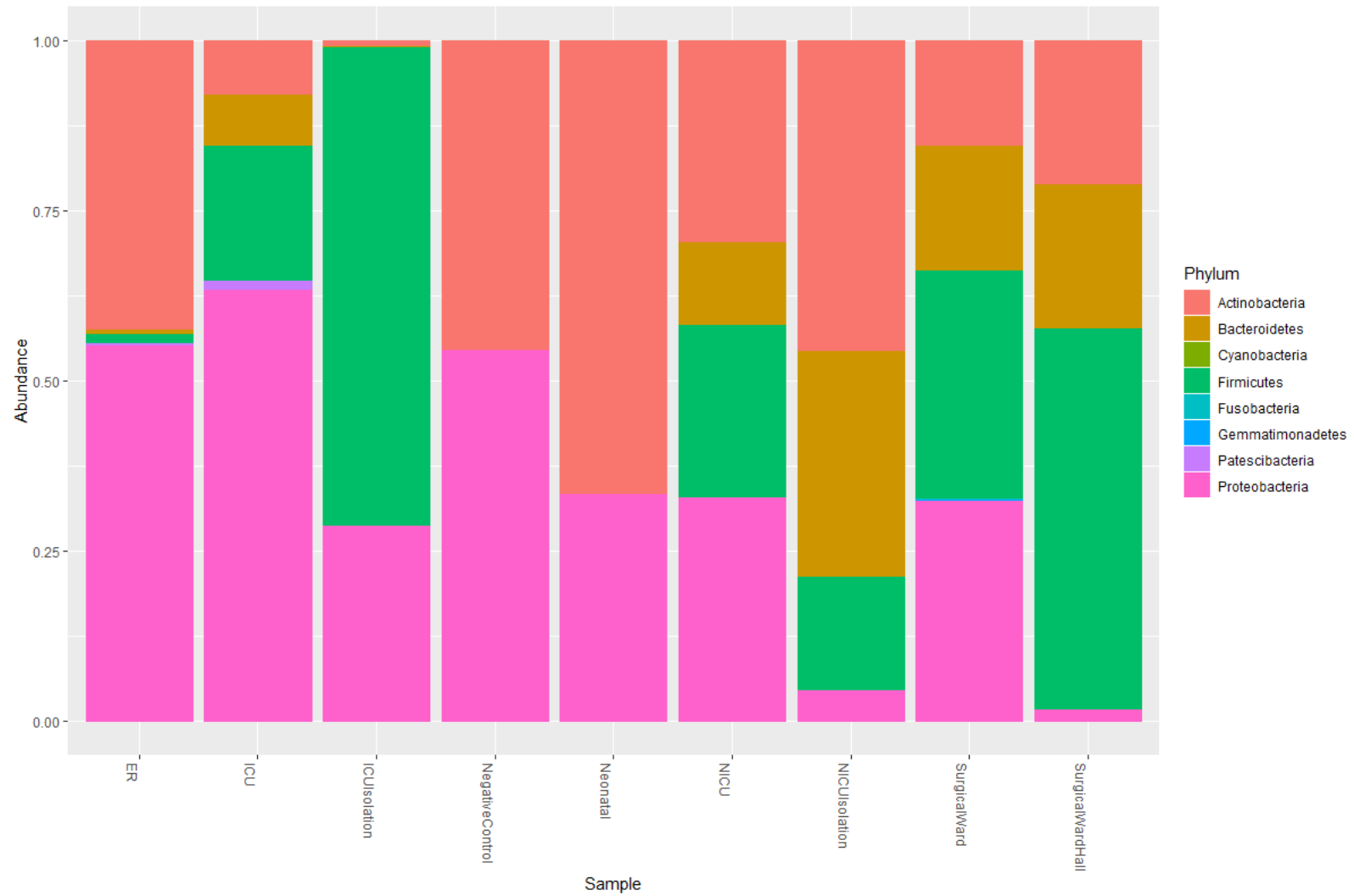


Figura 12. Abundancia relativa a nivel de phyla.

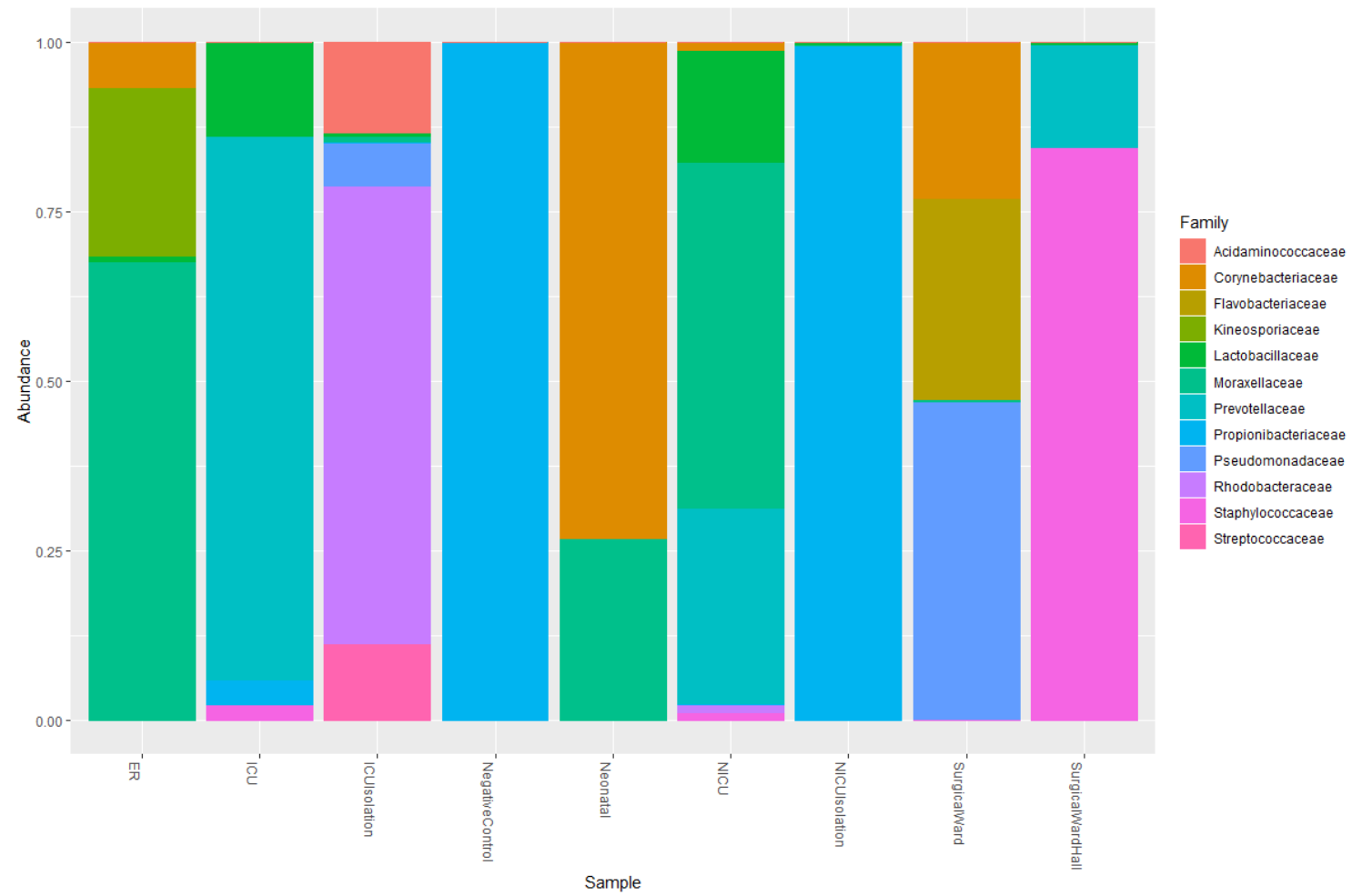


Figura 13. Abundancia relativa a nivel de familia.

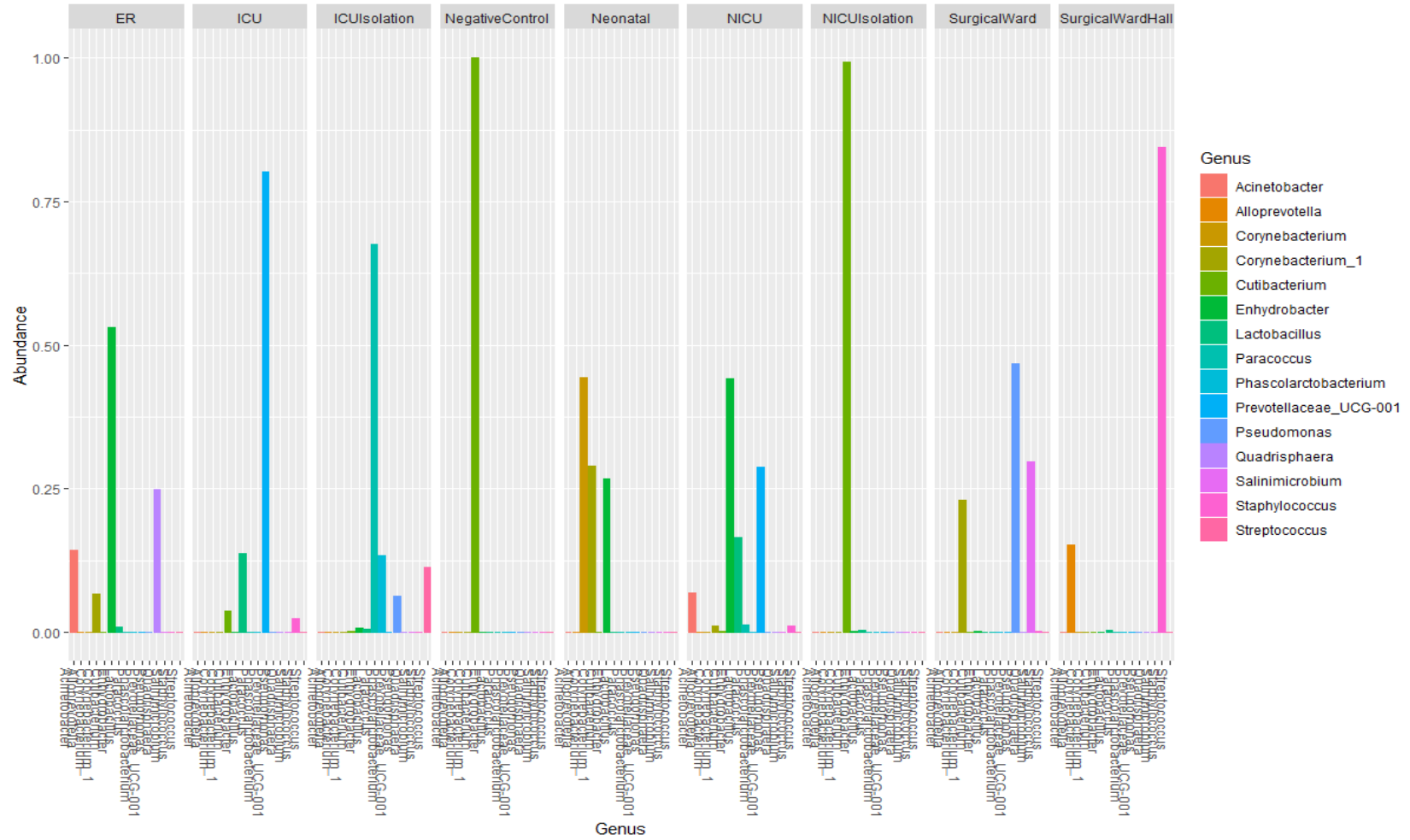


Figura 14. Abundancia relativa a nivel de género.

7.9.4 Diversidad bacteriana

Los índices de diversidad alfa, Chao1 y Shannon, se utilizaron para evaluar la riqueza y diversidad de las comunidades bacterianas en las distintas áreas (Figura 15). De acuerdo con el índice de Chao1 el área común de UCIN (48) presentó la mayor riqueza, seguida por UCI (39) y el pasillo de hospitalización (35), mientras que el control negativo presentó la menor riqueza (3). En cuanto al índice de Shannon, UCIN (2.91) y UCI (2.89) presentaron la mayor diversidad bacteriana, mientras que el área aislada de UCIN (0.46) presentó la menor diversidad.

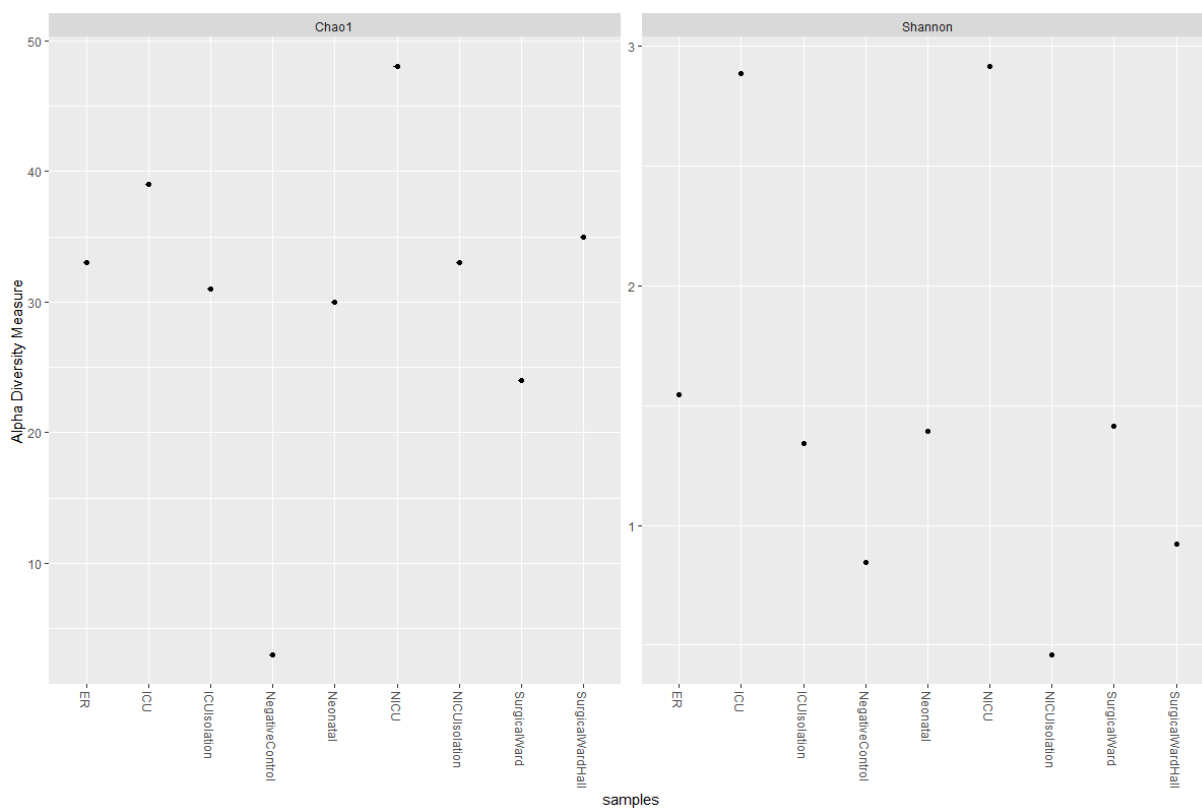


Figura 15. Alfa diversidad utilizando los índices de Chao1 y Shannon.

7.9.5 Network basada en el índice de Jaccard

Para determinar las interacciones ecológicas entre las comunidades bacterianas de las diversas áreas, se realizó una red igrph basada en el índice de similitud de Jaccard con una distancia máxima de tres entre los nodos conectados (Figura 16). Se observó un solo modulo que incluye todos los nodos, con relaciones cercanas entre algunas áreas. Las distancias más cercanas se observaron entre UCI y UCIN, hospitalización y cuneros, las áreas aisladas de UCIN y UCI y por último urgencias con el control negativo.

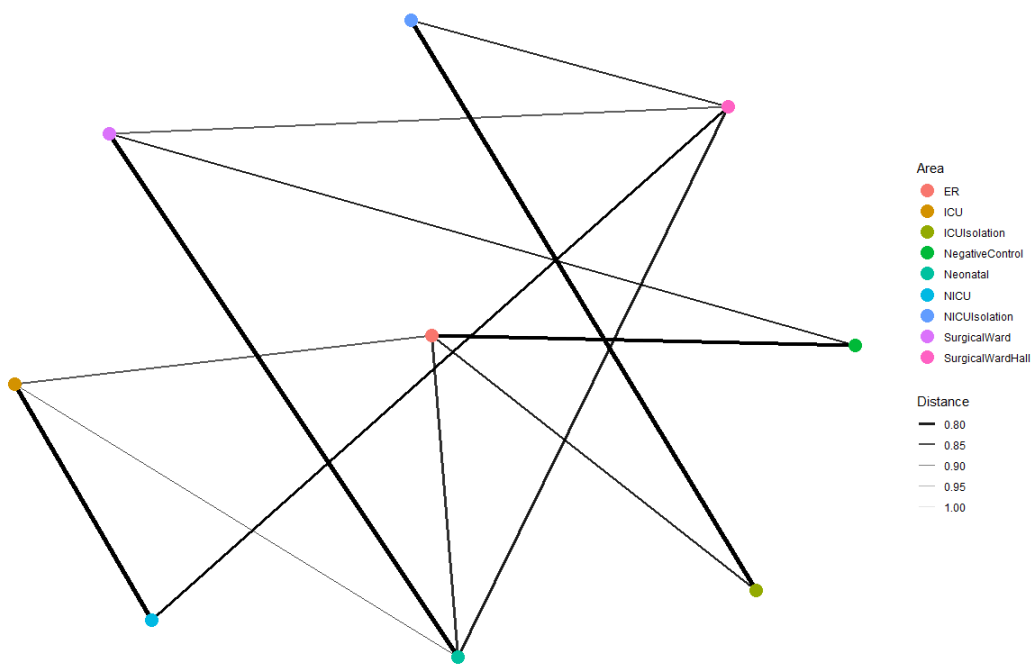


Figura 16. Igraph network basada en el índice de Jaccard.

7.9.6 Análisis de coordenadas principales (PCoA)

Como análisis estadístico multivariado, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia de Bray Crutis de los OTUs, para explorar las relaciones entre diferentes comunidades bacterianas en las áreas de muestreo (Figura 17). Los primeros dos componentes principales, que representan el 30.1% de la varianza, clasificaron las nueve muestras en tres grupos. El primer grupo incluye UCI y UCIN, el segundo grupo el área aislada de UCI y UCIN, el pasillo de hospitalización, y el control negativo, el tercer grupo incluye hospitalización, urgencias y cuneros. De manera interesante, dentro del segundo grupo, el área aislada de UCIN y el pasillo de hospitalización se encontraron más estrechamente relacionados entre sí a comparación del resto de las muestras en el grupo.

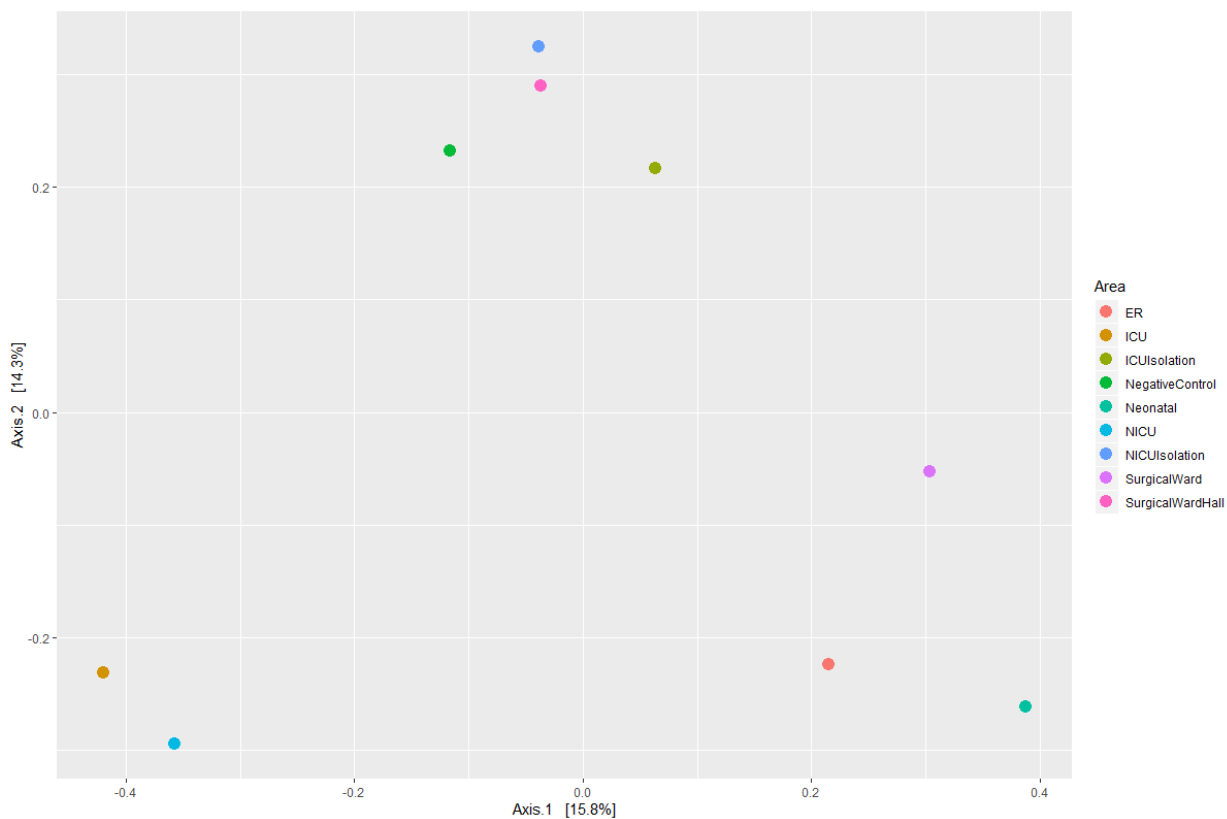


Figura 17. Analisis PCoA basado en la distancia de Bray Curtis de los OTUs.

8. DISCUSIÓN

8.1 Patrón de resistencia a antimicrobianos

De acuerdo a los cultivos bacteriológicos multidrogo resistentes (MDR) aislados de UCI y UCIN, *A. baumannii*, mostró una elevada resistencia especialmente a β -lactámicos, seguido por aminoglucosidos, fluoroquinolonas, e inhibidores de la ruta de folatos. Numerosos estudios han determinado que la principal causa de la resistencia a los agentes β -lactámicos en *A. baumannii* es la producción de β -lactamasas, en donde las carbapenemsasas son las más importantes, ya que generalmente confieren resistencia a los carbapenems y con frecuencia a todos los β -lactámicos (Zavascki *et al.*, 2010). Una de las causas más importantes de las tasas de morbilidad y mortalidad en pacientes en estado crítico, es la infección adquirida en cuidados intensivos, principalmente por patógenos MDR como *A. baumannii* resistente a carbapenems (CRAB) (Ben-Chetrit *et al.*, 2018). En información emitida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre “patógenos prioritarios” resistentes a antimicrobianos, se reporta a CRAB como un patógeno que debe ser ampliamente estudiado y para el cual se necesitan desarrollar nuevos agentes antimicrobianos para su tratamiento. Informes del Sistema Nacional de Vigilancia de la Resistencia a Antimicrobianos de China de 2015 a 2016, indicaron que el 69.8% de los aislamientos de *A. baumannii* eran resistentes a imipenem y el 71.4% a meropenem (Yun *et al.*, 2017). Además, la tasa de resistencia a antimicrobianos fue un 20% mayor entre los aislados de *A. baumannii* de UCI a diferencia de los aislados obtenidos fuera de terapia intensiva. Así mismo, los resultados de tres estudios de cohorte realizados en México de 2005 a 2012 documentaron un rango de tasas de resistencia para imipenem y meropenem de 36-76% (Morfin-Otero *et al.*, 2012; Garza-Gonzalez *et al.*, 2010; Llaca-Diaz *et al.*, 2012).

Por otro lado, los cultivos MDR de *S. aureus* tuvieron la menor incidencia (12.5%), para los cuales la resistencia a fluoroquinolonas y lincosamidas fueron las más importantes. Esta tasa es menor a lo reportado en México (62%) (Llaca-Diaz *et al.*, 2012), Estados Unidos (55%) y Canadá (22.3%) (Klevens *et al.*, 2007) pero similar a la reportada en Europa con un rango de >1-24% (Kraker *et al.*, 2011). Se ha demostrado que la resistencia a fluoroquinolonas, particularmente a ciprofloxacino, es significativamente mayor en aislados de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Gade y Qazi, 2013). Resultados similares de más del 90% de resistencia también han sido reportados en India y Pakistan, en donde la resistencia ha incrementado de 39% en 1992 a 68% en 1996 (Qureshi *et al.*, 2004). Así mismo, se ha reportado un 100% de resistencia a fluoroquinolonas y un 97.22% a lincosamidas en MRSA (Kaur y Chate, 2015).

Un factor importante que contribuye a la resistencia a antimicrobianos es la producción de β -lactamasas de amplio espectro (ESBL) por especies de Enterobacteriaceae, particularmente por *K. pneumoniae* (Lee *et al.*, 2019). La diseminación de estos patógenos productores de ESBL en el área hospitalaria es considerado un problema global emergente que merece una consideración especial (Hawkey, 2008; Llaca-Diaz *et al.*, 2012). En este estudio observamos una alta prevalencia de resistencia a fluoroquinolonas, betalactámicos e inhibidores de la ruta de folato en cultivos de UCI y UCIN, coincidiendo con otros reportes en donde se observa una mayor prevalencia de resistencia a fluoroquinolonas en pacientes con infecciones por *K. pneumoniae*-ESBL (Lautenbach *et al.*, 2001).

De igual manera, el rápido aumento de cultivos de *P. aeruginosa* productores de ESBL también representan un riesgo para la salud pública. La mayoría de los cultivos de *P. aeruginosa* son susceptibles a cefalosporinas y carbapenems; sin embargo, en los últimos año han adquirido resistencia a estos antimicrobianos. Se ha demostrado que la prevalencia de *P. aeruginosa* productora de carbapenemasas ha contribuido al aumento de cultivos MDR (De Oliveira Santos

et al., 2019). En un estudio reciente, se observaron altas tasas de resistencia a imipenem (77.1%), meropenem (46.9%) y amikacina (74.0%) (Bahrami *et al.*, 2018), coincidiendo con nuestros hallazgos en donde la resistencia a ácidos fosfónicos, aminoglucosidos, β -lactámicos y fluoroquinolonas fueron los más frecuentes, y significativamente mayores en UCI que en UCIN.

8.2 Desarrollo, estandarización y validación de la técnica de diagnóstico rápido

Las infecciones nosocomiales constituyen un problema de salud pública a nivel mundial. Las implicaciones son múltiples, desde el incremento de la morbilidad y mortalidad, el incremento de costos por la sobre estancia hospitalaria y el incremento de la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos. De ahí que el estudio de la diversidad de la comunidad bacteriana y los genes responsables de la resistencia antimicrobiana en el área hospitalaria, así como el desarrollo de herramientas diagnósticas constituyan un tema de interés.

A. baumannii, *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* son patógenos oportunistas multidrogo resistentes (MDR) que ocasionan infecciones nosocomiales principalmente en terapia intensiva. Sin embargo, las técnicas de diagnóstico tradicionales utilizadas en la mayoría de las instituciones de salud pueden prolongar la detección e identificación de dichos patógenos hasta 48 horas. Además, las técnicas de diagnóstico clínico en base a ácidos nucleicos siguen confinadas para su uso en laboratorios de referencia debido a los requisitos de instrumentación, equipo y personal especializado.

A diferencia del PCR la técnica de LAMP no requiere de una amplificación cíclica, ofreciendo simplicidad con muy alta sensibilidad y especificidad (Nagamine *et al.*,

2002; Notomi *et al.*, 2000). El único equipo necesario para el uso rutinario de la técnica es un thermo block o baño maría, con una incubación de 60 minutos.

Aunque tanto el PCR como LAMP requieren un paso previo de extracción de ADN para realizar la prueba, se ha establecido que LAMP es menos susceptible a inhibidores que se encuentran comúnmente en muestras clínicas (Kaneko *et al.*, 2007). Además, es posible realizar LAMP directamente de muestras biológicas como fue descrito por Bista *et al.* (2007) para la identificación del virus BK.

En este estudio se estandarizó la técnica de LAMP para la detección e identificación de las bacterias patógenas más problemáticas causantes de infecciones nosocomiales, así como sus genes involucrados en el mecanismo de resistencia a β -lactamasas; Clase A β -lactamasas (ESBL): *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{KPC}, Clase B β -lactamasas; *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, Clase D β -lactamasas; *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} y *mecA* de MRSA.

La especificidad analítica para la detección de los patógenos fue evaluada utilizando los juegos de primers con una variedad de bacterias, lo que confirmó que la técnica es 100% específica. LAMP en comparación con el PCR es inherentemente específico ya que se basa en 6 primers diferentes que reconocen 8 secuencias distintas en el gen blanco (Kim *et al.*, 2012). Para determinar el límite de detección de LAMP se realizaron diluciones seriadas de ADN genómico y los resultados fueron comparados con PCR convencional. Los resultados indicaron que LAMP es hasta 100 veces más sensible que el PCR. Lo anterior, también fue reportado por Xu *et al.* (2012), quienes obtuvieron un límite de detección 100 fg DNA/tubo para la identificación del género *Staphylococcus*.

Así mismo, los resultados de sensibilidad y especificidad clínica de LAMP comparados con PCR punto final y el equipo automatizado de identificación, Vitek 2, confirman que LAMP representa una herramienta de diagnóstico robusta con

mayor desempeño, al no presentar falsos positivos o falsos negativos en los ensayos. Estos resultados también fueron observados por Li *et al.* (2015) en donde la técnica de PCR presentó falsos negativos en la identificación de *A. baumannii*, lo cual confirma que en ocasiones la sensibilidad del PCR no es satisfactoria y podría introducir errores en los resultados de las pruebas diagnósticas.

En cuanto al análisis molecular de los genes de resistencia realizado con LAMP, se observó que en *A. baumannii* el gen más abundante fue *bla*_{TEM} con una tasa de 90.3%. *bla*_{TEM} codifica una β -lactamasa de Clase A de amplio espectro (ESBL) conocida por su capacidad para hidrolizar una amplia variedad de cefalosporinas. En un estudio realizado en un hospital de Egipto por Al-Agamy *et al.* (2014) también se observó una alta prevalencia de este gen con una tasa de 87.5%. El segundo gen más frecuente en los cultivos de *A. baumannii* fue *bla*_{OXA-23-like} (6.4%), el cual codifica para una β -lactamasa de clase D que hidroliza carbapenems. *bla*_{OXA-23-like} es la carbapenemasa más comúnmente adquirida en *A. baumannii* y su frecuencia se ha establecido desde 31% hasta 94% en algunos países (Shoja *et al.*, 2016). Por último, *bla*_{VIM} perteneciente a la clase B β -lactamasa, presentó la menor frecuencia (3.2%), estos resultados concuerdan con un estudio reciente en donde se observó una frecuencia de 7.08% en cultivos de *A. buamannii* (Goudarzi *et al.*, 2019).

S. aureus resistente a meticilina (MRSA) se ha definido como *S. aureus* que posee el gen *mecA* o que muestra una concentración mínima inhibitoria (MIC) de oxacilina mayor a 4 mg/L (Hososaka *et al.*, 2007). *mecA* codifica una proteína de unión a penicilina de baja afinidad (PBP2a) confiriéndole resistencia a todos los β -lactámicos (Stegger *et al.*, 2012). En este estudio solo se observaron 4 cultivos con este gen (10%), sugiriendo que la resistencia observada en los cultivos de *S. aureus* en UCI y UCIN, se encuentra mediada por otros mecanismos de

resistencia. Lo anterior concuerda con los patrones de resistencia observados, en donde la mayor tasa de resistencia fue para fluoroquinolonas y lincosamidas.

Cultivos productores de ESBL también han sido reportados ampliamente en diversos generos de Enterobacteriaceae (Muro *et al.*, 2012). En este estudio, *K. pneumoniae* presentó una alta frecuencia para dos genes que codifican ESBL, *bla_{SHV}* (84.8%) y *bla_{TEM}* (78.3%). Llaca-Diaz *et al.* (2012) describió una tasa del 85.4% para cultivos de *K. pneumoniae* productores de ESBL aislados de pacientes en UCI en México, en donde el gen predominante fue *bla_{SHV}* (51.5%).

En este estudio *P. aeruginosa* presentó tres de los genes que codifican ESBL, *bla_{TEM}* (50.6%), *bla_{SHV}* (34.6%) y *bla_{KPC}* (2.6%), además también se observó a *bla_{VIM}* (24%). Así mismo, Bahrami *et al.* (2018) observó una mayor prevalencia de *bla_{TEM}* (56.3%) seguido por *bla_{SHV}* (26.05%) en cultivos de *P. aeruginosa*. Komijani *et al.* 2018 encontró que el 81.98% de los cultivos eran ESBL positivos. Dado que la resistencia de *P. aeruginosa* a cefalosporinas, monobactámicos y carbapenems puede ser adquirida por la producción de ESBL (Fazeli *et al.*, 2014), estos resultados podrían sugerir que la resistencia a β -lactámicos observada en estos cultivos se debe en gran medida a la producción de ESBL.

En conclusión, se observó una concordancia entre el patrón de resistencia a antimicrobianos y los genes detectados mediante las técnicas de diagnóstico rápido desarrolladas. En donde, la extensa resistencia a β -lactámicos podría ser causada por la producción de ESBL en estos cultivos. Debido a que las opciones terapéuticas para los patógenos productores de ESBL son limitadas, esta alta tasa de resistencia en UCI, resalta la necesidad de estrategias para la prevención y control de estas infecciones. Por lo tanto, la aplicación de estas técnicas de diagnóstico representa una alternativa para su uso rutinario en las instituciones de salud, favoreciendo el acertado y oportuno diagnóstico de las infecciones nosocomiales.

8.3 Metagenómica del ambiente hospitalario

Las bacterias patógenas asociadas al ambiente hospitalario se caracterizan por poseer una alta incidencia de resistencia a antimicrobianos, convirtiéndose en un problema de salud pública. Debido a la limitada efectividad de los antimicrobianos contra estos patógenos, el control de las infecciones juega un papel importante en la reducción de las infecciones nosocomiales. El monitoreo de patógenos potenciales en las instituciones de salud es una medida importante para bloquear la transmisión o erradicar estos patógenos. Tradicionalmente, se han utilizado métodos basados en cultivos para identificar la mayoría de los agentes infecciosos después de la infección, sin embargo, estos métodos pueden fallar si no se conocen las condiciones de crecimiento o si las muestras no son manejadas correctamente (Tang *et al.*, 2015).

En este sentido, los estudios metagenómicos abrieron nuevos campos de investigación al proporcionar el acceso a una mayor diversidad microbiana nunca antes vista en una caja de Petri. En los últimos años, los avances en las tecnologías de secuenciación han permitido a los investigadores la capacidad de secuenciar comunidades microbianas enteras de forma masiva (Posa *et al.*, 2012). Las técnicas independientes de cultivo como la secuenciación del gen 16S del RNA ribosomal proporciona una perspectiva menos sesgada de los patógenos ambientales debido a que la muestra es tomada directamente del ambiente, permitiendo una profunda caracterización de comunidades bacterianas complejas (Tringe *et al.*, 2008). El gen 16S del RNAr bacteriano contiene nueve regiones hipervariables (V1-V9) que presentan una diversidad de secuencias considerable entre las distintas bacterias (Chakravorty *et al.*, 2007). La combinación de la unión de primers a sitios conservados y de secuencias variables, puede facilitar la identificación a nivel de género e incluso de especie (Kumar *et al.*, 2011).

Por lo anterior, en este estudio describimos la diversidad de la comunidad bacteriana asociada al ambiente hospitalario del HGZ1 IMSS de B.C.S, identificando potenciales bacterias patógenas causantes de infecciones nosocomiales.

8.3.1 Estructura de la comunidad bacteriana

Los phyla más abundantes en el área hospitalaria fueron *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. Estos hallazgos coinciden con previos resultados obtenidos de comunidades microbianas encontradas en el cuerpo humano, lo que podría explicarse en términos de la interacción entre la microflora normal que vive en los humanos y el entorno hospitalario (Qin *et al.*, 2010).

El phylum *Actinobacteria* fue principalmente representado en el aérea aislada de UCIN y en cuneros por las familias *Propionibacteriaceae* y *Corynebacteriaceae*, respectivamente. *Firmicutes* fue representado en el área aislada de UCI y el pasillo de hospitalización por las familias *Streptococcaceae* y *Staphylococcaceae*, respectivamente. Los géneros *Cutibacterium* (llamado anteriormente *Propionibacterium*), *Corynebacterium*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* son patógenos estrechamente asociados a la microbiota de la piel y se han encontrado con anterioridad en equipos médicos y estaciones de trabajo dentro de ambientes hospitalarios (Tang *et al.*, 2015). *Staphylococcus* es un patógeno oportunista que habita normalmente en la piel y las mucosas, siendo *S.aureus* una de las principales causas de infecciones nosocomiales (Poza *et al.*, 2012). *Streptococcus* un género diverso y versátil que causa una amplia gama de enfermedades, se encontró únicamente en el área aislada de UCI con una abundancia del (11.29%). En los últimos años, las cepas de *Streptococcus* resistentes a antimicrobianos han comenzado a emerger y causar epidemias (Yao *et al.*, 2011), lo que podría explicar su presencia en el área aislada de UCI. El género *Corynebacterium*, de igual manera forma parte de la flora normal de la piel y se encuentra en una amplia variedad de hábitats desde el suelo hasta fuentes marinas y animales.

Durante los últimos años, se han descrito un número considerable de nuevas especies causantes de enfermedades en huéspedes sanos e inmunocomprometidos (Dragomirescu *et al.*, 2020).

El phylum *Proteobacteria* se encontró representado en el área aislada de UCI y en hospitalización por la familia *Rhodobacteraceae* y *Pseudomonadaceae*, respectivamente. *Paracoccus*, encontrado en el área aislada de UCI con la mayor abundancia, se ha asociado a la comunidad microbiana de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (Kim *et al.*, 2019), y también fue sobrerrepresentado en muestras ambientales del pasillo de entrada en un hospital en España (Poza *et al.*, 2012). Específicamente *P. yeei* es un patógeno emergente que ha sido aislado de heridas, drenajes de incisión e infecciones oculares (Hassan *et al.*, 2019). El género *Pseudomonas* es un patógeno oportunista, siendo *P. aeruginosa* una de las bacterias patógenas más importantes en el desarrollo de infecciones nosocomiales como la neumonía asociada a ventilación mecánica en UCI, bacteremia, infecciones de tracto urinario e infección en personas con quemaduras (Bahrami *et al.*, 2018). Además, se ha encontrado abundantemente en muestras ambientales en UCIN en dos hospitales de tercer nivel en Estados Unidos (Hewitt *et al.*, 2013).

El phylum *Bacteroidetes* representado por *Prevotellaceae* perteneciente a la microbiota gastrointestinal humana, presentó la mayor abundancia en UCI. En un estudio reciente, *Prevotella* fue uno de los géneros aislados con mayor frecuencia en infecciones de heridas en un hospital de tercer nivel en Nigeria (Abdulrasheed *et al.*, 2019).

De manera general, la estructura de la comunidad bacteriana en el área hospitalaria se encontró dominada por bacterias asociadas a la flora humana, las cuales poseen características facultativas y nosocomiales, sugiriendo que los humanos participan como los vectores más importantes para la transferencia de las bacterias en el ambiente.

8.3.2 Diversidad bacteriana

Aunque no se observaron diferencias significativas entre las áreas hospitalarias en términos de riqueza y diversidad, se observó una variación notable en UCI y UCIN, en comparación con el resto. Estos resultados son contrastantes con otros estudios donde se demuestra que la mayor riqueza y diversidad dentro del ambiente hospitalario es observada en los lugares con mayor tránsito de personas, como la entrada y pasillo principal (Oberauner *et al.*, 2013, Poza *et al.* 2012). Debido a que la microbiota observada en un ambiente interior es tan diversa como sus ocupantes y sus estándares de higiene (King *et al.*, 2016), podemos sugerir que los pacientes y el personal de la atención de la salud contribuyen a la alta proporción y uniformidad de las especies en estas áreas, no solo por su papel como vectores para la importación y dispersión de bacterias, sino también por su propia huella bacteriana que representa una combinación única de microbiomas, incluidos los patógenos (Tang *et al.*, 2015).

De forma interesante, aunque el área aislada de UCIN presenta una riqueza mayor que el área de hospitalización, presentó la menor diversidad en comparación con el resto de las áreas. Lo que sugiere que, a pesar de poseer un número considerable de distintas especies, estas no se encuentran distribuidas de manera equitativa, probablemente relacionado con su confinamiento y consecuente presión selectiva. Estas condiciones promueven la selección de bacterias que pueden desarrollar o adquirir mecanismos de resistencia que les permiten sobrevivir en presencia de un amplio espectro de agentes antimicrobianos (Poza *et al.*, 2012).

En conjunto, estos resultados sugieren que las áreas comunes de terapia intensiva pudieran funcionar como reservorio de una diversa comunidad bacteriana, en donde las principales vías de transmisión podrían ser la vía aérea, mediante las unidades de manejo del aire acondicionado integral, y por contacto, en donde el personal de la atención de la salud juega un papel importante para la transmisión

debido a su capacidad de transitar a través de las distintas áreas hospitalarias. Resaltando la necesidad de un estricto cumplimiento de las pautas de higiene del personal, la correcta desinfección de las áreas problemáticas, así como un monitoreo a largo plazo de potenciales patógenos en el ambiente hospitalario, como medidas para reducir las infecciones nosocomiales.

8.3.3 Relaciones entre los perfiles de la comunidad bacteriana

El análisis de ordenación PCoA según Bray-Curtis y el índice de similitud de Jaccard mostraron un patrón similar de agrupamiento de la comunidad bacteriana. Ambos criterios de análisis composicional explicaron una relación entre las áreas comunes de UCI-UCIN, las áreas aisladas de UCI-UCIN-pasillo de hospitalización y las áreas de hospitalización-urgencias-cuneros.

Este patrón de agrupamiento coincide con la diversidad bacteriana encontrada en las áreas hospitalarias, en donde se representan tres agrupaciones, por un lado el primer grupo conformado por UCI-UCIN con una alta diversidad, el segundo grupo conformado por las áreas aisladas de UCI-UCIN-pasillo de hospitalización con una baja diversidad y en la tercera agrupación las áreas de hospitalización-urgencias-cuneros con una diversidad intermedia en comparación con las agrupaciones anteriores.

En conclusión, se observaron agrupaciones de la comunidad bacteriana de acuerdo al tipo de ambiente. De esta manera, la cercanía de las agrupaciones de terapia intensiva mostró un grado de similitud composicional mayor entre sí con respecto a las comunidades de las áreas abiertas (hospitalización-urgencias-cuneros). Lo anterior también ha sido reportado por otros estudios en ambientes hospitalarios como el de Hewitt *et al.* (2013) y Tang *et al.* (2015) en donde observaron que las muestras pertenecientes a UCIN eran claramente divergentes al resto de las áreas de oficina, espacios abiertos y baños.

9. CONCLUSIONES

Se desarrollaron, estandarizaron y validaron técnicas de diagnóstico rápido específicas y sensibles basadas en la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP), para la identificación de las bacterias patógenas causantes de infecciones nosocomiales en pacientes de UCI y UCIN; *S. aureus*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, y sus genes de resistencia a antimicrobianos; Clase A β -lactamasas (ESBL): *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{KPC}, Clase B β -lactamasas; *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, Clase D β -lactamasas; *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} y *mecA* de MRSA.

La extensa resistencia a β -lactámicos en UCI es causada por la producción de ESBL mediada principalmente por *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} en *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, resaltando la necesidad de nuevas estrategias para el monitoreo y control de estos patógenos. Por lo tanto, la aplicación de las técnicas de diagnóstico desarrolladas representa una alternativa para su uso rutinario en las instituciones de salud en donde los costos y restricciones de equipos son imperativos, favoreciendo el acertado y oportuno diagnóstico de las infecciones nosocomiales.

La diversidad de la comunidad bacteriana en el área hospitalaria se encontró dominada principalmente por bacterias asociadas a la flora humana (*Cutibacterium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Paracoccus*, y *Pseudomonas*), las cuales poseen características facultativas y nosocomiales, sugiriendo que los humanos participan como los vectores más importantes para la transferencia de las bacterias en el ambiente.

Las áreas comunes de UCI y UCIN presentaron una notable riqueza y diversidad bacteriana en comparación con el resto de las áreas hospitalarias, lo que sugiere que podrían estar fungiendo como reservorios. Las principales vías de transmisión

podrían ser la vía área, mediante las unidades de manejo del aire acondicionado integral, y por contacto, en donde el personal de la atención de la salud juega un papel importante para la transmisión debido a su capacidad de transitar a través de las distintas áreas hospitalarias. Resaltando la necesidad de un estricto cumplimiento de las pautas de higiene del personal, la correcta desinfección de las áreas problemáticas, así como un monitoreo a largo plazo de potenciales patógenos en el ambiente hospitalario, como medidas preventivas para reducir las infecciones nosocomiales.

10. LITERATURA CITADA

- Abdu A.B., J. Egbagba, B.G. Fente. 2019. Identification and antimicrobial susceptibility profile of bacterial pathogens isolated from wound infections in a tertiary hospital, Bayelsa South southern, Nigeria. *Tropical Journal of Pathology & Microbiology*. 5:966-975.
- Al-Agamy M.H., N.G. Khalaf, M.M. Tawfickb, A. M. Shibl, A.E. Kholly. 2014. Molecular characterization of carbapenem-insensitive *Acinetobacter baumannii* in Egypt. *International Journal of Infectious Diseases* 22: 49–54.
- Arbolaez Goicochea M.C. 2012. Caracterización del *Staphylococcus aureus* aislado en piel y tejidos blandos. Hospital Universitario “Arnaldo Milián Castro” 2008-2012 [tesis]. Villa Clara: Centro Provincial de Higiene y Epidemiología.
- Arbolaez Goicochea M.C., J.A. Rodríguez Rodríguez, S. López Berrio, G. Hernández González, R. Rodríguez Pérez, L. de Armas Álvarez. 2016. *Staphylococcus aureus* nosocomial de piel y tejidos blandos. *Acta Médica del Centro*.10:4.
- Asensio A., A. Oliver, P. González-Diego, F. Baquero, J. C. Pérez-Díaz, P. Ros, J. Cobo, M. Palacios, D. Lasheras, R. Cantón. 2000. Outbreak of amultiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: Antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin. Infect. Dis.* 30:55–60.
- Bahrami M., M. Mohammadi-Sichani, Karbasizadeh V. 2018. Prevalence of SHV, TEM, CTX-M and OXA-48 β -Lactamase Genes in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Bandar-Abbas, Iran. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*. 5:86-90.
- Bassetti M., F. Ginocchio, M. Mikulska. 2011. New treatment options against Gram-negative organisms. *Crit Care*.15:215.
- Be N.A., Thissen J.B., Fofanov V.Y. Allen J.E., Rojas M., Golovko G., Fofanov Y., Koshinsky H. & Jaing C.J. 2015. Metagenomic Analysis of the Airborne Environment in Urban Spaces. *Microb Ecol*. 69:346–355.
- Beggs C., L. D. Knibbs, G.R. Johnson, L. Morawska. 2014. Environmental contamination and hospital-acquired infection: factors that are easily overlooked. *Indoor Air*. Epub 2014/10/28.
- Ben-Chetrit E., Y. Wiener-Well, E. Lesho, P. Kopuit, C. Broyer, L. Bier. 2018. An intervention to control an ICU outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: long-term impact for the ICU and hospital. *Crit Care*. 22:319.

Ben-David D., R. Kordevani, N. Keller, I. Tal, A. Marzel, O. Gal-Mor, Y. Maor, G. Rahav. 2012. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:54–60.

Bista B.R., C. Ishwad, R.M. Wadowsky, P. Manna, P.S. Rhandhawa, G. Gupta, M. Adhikari, R. Tyagi, G. Gasper, A. Vats. 2007. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of BK virus. *J Clin Microbiol* 45:1581–1587.

Blanquer J., J. Solé-Violán, J. Carvajal y F. Lucena. 2010. Infecciones comunitarias que requieren ingreso en UCI. *Med Intensiva.* 34:388–396.

Breviario para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de infecciones nosocomiales, Dirección de Prestaciones Médicas. IMSS. 2014.

CENAVECE. Centro Nacional De Vigilancia Epidemiológica Y Control De Enfermedades. Abril 2013. "Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica y Retos del siglo XXI". <http://www.himfg.edu.mx/descargas/documentos/epidemiologia/IN2013/L22ab/ri113IN/RedHospitalariaVigilanciaEpidemiologicaRetosigloXXI.pdf>

Chakravorty S., D. Helb, M. Burday, N. Connell, D. Alland. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol methods.* 69: 330–339.

Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine». *Chest* 101 (6): 1644–55.

Davies J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science.* 264:375-82.

De la Rosa M., J. Prieto, J.M. Navarro. 2011. *Microbiología en ciencias de la salud. Conceptos y aplicaciones.* Elsevier España, S.L. 3ra edición. Barcelona, España.

De Oliveira Santos I.C., N. F. Pereira de Andrade, O.C. Da Conceição Neto, B.S. Da Costa, E. De Andrade Marques, C.M. Rocha-de-Souza, M.D. Asensi, A.P. D'Alincourt Carvalho-Assef. 2019. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995–2015). *Infection, Genetics and Evolution.* 73:411–415.

Delcour A.H. 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et biophysica acta.* 1794:808-16.

Dijkshoorn L., A. Nemec, H. Seifert. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol.* 5:939–51.

Dirección General De Epidemiología <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/publicaciones> 2012.

Dragomirescu C.C., B.E. Lixandru, I.L. Coldea, O.N. Corneli, M. Pana, A. M. Palade, M.I. Popa. 2020. Antimicrobial Susceptibility Testing for *Corynebacterium* Species Isolated from Clinical Samples in Romania. *Antibiotics*. 31:1-9.

Eames I., J.W. Tang, Y. Li, P. Wilson. Airborne transmission of disease in hospitals. 2009. *J. R. Soc. Interface*. 6:S697–S702.

Eriksen H.M., B.G. Iversen, P. Aavitsland. 2005. Prevalence of nosocomial infections in hospitals in Norway, 2002 and 2003. *J Hosp Infect*. 60:40–5.

Fabrega A., S. Madurga, E. Giralt, J. Vila. 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial biotechnology*. 2:40-61.

Fazeli N. y H. Momtaz. 2014. Virulence Gene Profiles of Multidrug- Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Iranian Hospital Infections. *Iran Red Crescent Med J*.16: e15722.

Fluit, A. C., F. J. Schmitz, J. Verhoef, and the European SENTRY Participant Group. 2011. Frequency of isolation of pathogens from bloodstream, nosocomial pneumonia, skin and soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 20:188–191.

Franzosa E. A., T. Hsu, A. Sirota-Madi, A. Shafquat, G. Abu-Ali, X. C. Morgan. 2015. Sequencing and beyond: integrating molecular ‘omics’ for microbial community profiling. *Nat.Rev.Microbiol*. 13:360–372.

Gade N.D., Qazi M.S. 2013. Fluoroquinolone Therapy in *Staphylococcus aureus* Infections: Where Do We Stand?. *Journal of Laboratory Physicians*. 5:109-112.

Garner J.S., W. R. Jarvis, T.G. Emori, T. C. Horan, J. M. Hughes. 1988. CDC definitions for nosocomial infection. *American Journal of Infection Control*. 16:128–140.

Garza-Gonzalez E., J.M. Llaca-Diaz, F.J. Bosques-Padilla, G.M. Gonzalez. 2010. Prevalence of multidrug-resistant bacteria at a tertiary-care teaching hospital in Mexico: special focus on *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy*. 56:275–9.

Goudarzi H., E.S. Mirsamadi, Z.Ghalavand, M.H. Vala, H. Mirjalali, A. Hashemi. 2019. Rapid detection and molecular survey of blaVIM, blaIMP and blaNDM genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* using new multiplex real-time PCR and melting curve analysis. *BMC Microbiology*.19:122.

Griffith C.J., R.A. Cooper, J. Gilmore, C. Davies, M. Lewis. 2000. An evaluation of hospital cleaning regimes and standards. *Journal of Hospital Infection*. 45:19–28.

Guo J., C. Li. 2019. Molecular epidemiology and decreased susceptibility to disinfectants in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients in central China. *J Infect Public Health*. 7:JIPH-1107.

Gutiérrez J.P., J. Rivera-Dommarco, T. Shamah-Levy, S. Villalpando-Hernández, A. Franco, L. Cuevas-Nasu, M. Romero-Martínez, M. Hernández-Ávila. 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX).

Hasman H., D. Saputra, T. Sicheritz-Ponten. 2014. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J. Clin. Microbiol*. 52:139–146.

Hassan M.M., T. Naab, A. Afsari. 2019. *Paracoccus yeei*, a rare cause of ocular infection *Am J Clin Pathol*. 152:S128-S133.

Hawkey P. 2008. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *Br J Pharmacol* 2008. 153:S406–S413.

Hewitt K.M., F.L. Mannino, A. Gonzalez, J.H. Chase, J.G. Caporaso, R. Knight, S.T. Kelley. 2013. Bacterial Diversity in Two Neonatal Intensive Care Units (NICUs). *PLoS ONE*. 8: e54703.

Higgins P.G., F.J. Perez-Llarena, E. Zander, A. Fernández, G. Bou, H. Seifert. 2013. OXA-235, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 57: 2121–2126.

Hocheol K., H.Y. Yoon, K. Choi, J.W. Bae, C.J. Woo. 2019. Human lung microbial communities are associated with clinical outcome in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Korean Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*.127:418-418.

Horan T.C. 1993. Nosocomial infections in surgical patients in the United States, 1986–1992 (NNIS). *Infect Control HospEpidemiol*, 1993, 14:73–80.

Hososaka Y. H. Hanaki, H, Endo, Y. Suzuki, Z. Nagasawa, Y. Otsuka, T.Nakae, K. Sunakawa. 2007. Characterization of oxacillin-susceptible-positive: a new type of MRSA *mecA* *Staphylococcus aureus*. *J Infect Chemother*. 13:79–86.

Instituto Nacional de Pediatría. Programa de educación sobre medidas de prevención y control de infecciones nosocomiales para personal de salud, familiares y visitantes. México. 2010.

Inweregbu K., J. Dave, A. Pittard. 2005. Nosocomial infections. Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain. 5:1-9.

Janeway C.A. Jr, P. Travers, M. Walport. 2001. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Infectious agents and how they cause disease. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27114/>.

Jiang W., Liang P., Wang B., Fang J., Lang J., Tian G, Jiang J. & Zhu T.F. 2015. Optimized DNA extraction and metagenomic sequencing of airborne microbial communities. Nature protocols. 10:89-95.

Jovel J., J. Patterson, W. Wang, N. Hotte, S. O'Keefe, T. Mitchel, T. Perry, D. Kao, A. L. Mason, K. L. Madsen, G.K.-S. Wong. 2016. Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. Front. Microbiol.7:459.

Kaneko H., T. Kawana, E. Fukushima, T. Suzutani. 2007. Tolerance of loop mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. J Biochem Biophys Methods 70:499–501.

Kaur D.C., Chate S.S. 2015. Study of antibiotic resistance pattern in methicillin resistant Staphylococcus Aureus with special reference to newer antibiotic. J Global Infect Dis. 7:78-84.

Kelley S. T. y J. A. Gilbert. 2013. Studying the microbiology of the indoor environment. Genome Biology. 14:202.

Kim D. W., P. E. Kilgore, E. J. Kim, S. A. Kim, D. D. Anh, B. Q. Dong, M. Seki. 2012. The enhanced pneumococcal LAMP assay: a clinical tool for the diagnosis of meningitis due to Streptococcus pneumoniae. PloS one. 7(8).

King P., L.K. Pham, S. Waltz, D. Sphar, R.T. Yamamoto, D. Conrad. 2016. Longitudinal Metagenomic Analysis of Hospital Air Identifies Clinically Relevant Microbes. PLoS ONE. 11:e0160124.

Klebens R.M., M.A. Morrison, J.Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, Investigators ABCsAM. 2007. Invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in the United States. JAMA. 298:1763–1771.

Koide Y., H. Maeda, K. Yamabe, K. Naruishi, T. Yamamoto, S. Kokeguchi and S. Takashiba 2010. Rapid detection of mecA and spa by the loop-mediated

isothermal amplification (LAMP) method. *Letters in Applied Microbiology* 50: 386–392.

Komijani M., K. Shahin, M. Barazandeh, M. Sajadi. 2018. Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamases Genes in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Med Lab J.*12:34-41.

Kraker M.E., M. Wolkewitz, P.G. Davey, W. Koller, J. Berger, J. Nagler, Group BS. 2011. Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother.*55:1598–1605.

Kramer A., I. Schwebke, G. Kampf. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 6:130.

Kumar A., H.P. Schweizer. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced drug delivery reviews.* 57:1486-513.

Kumar P.S., M.R. Brooker, S.E. Dowd, T. Camerlengo. 2011. Target region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16S pyrosequencing. *Plos One.* 6:e20956.

Kumar S., M.F. Varela. 2013. Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: Méndez-Vilas A., editor. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*. Formatex Research Center; Badajoz, Spain. 522–534.

Lai Y.Y., Y. Li, J. Lang, X. Tong, L. Zhang, J. Fang, 2015. Metagenomic Human Respiratory Air in a Hospital Environment. *PLoS ONE* 10(10):e0139044.

Lautenbach E. B.L. Strom, W.B. Bilker, J.B. Patel, P.H. Edelstein, N.O. Fishman. 2001. Epidemiological Investigation of Fluoroquinolone Resistance in Infections Due to Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Infectious Diseases.* 33:1288–94.

Leblebicioglu H., O" zgu"ltekin A., O" zay A., CetinkayaSardan Y., Koksall, Yalcin A.N., 2005. Extra length of stay and device-associated nosocomial infection rates in intensive care units (ICU) in nine hospitals of Turkey. ICAAC meeting, 2005.December 16 to 19.Washington DC.

Lee Y.L., M.C. Lu, P.L. Shao, P.L. Lu, Y.H. Chen, S.H. Cheng, W.C. Ko, et al., 2019.Nationwide surveillance of antimicrobial resistance among clinically important Gram-negative bacteria, with an emphasis on carbapenems and colistin: Results from the Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART) in 2018. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 54:318–328.

Li P, W. Niu, H. Li, H. Lei, W. Liu, X. Zhao, L. Guo, D. Zou, X. Yuan, H. Liu, J. Yuan, C. Bai. 2015. Rapid detection of *Acinetobacter baumannii* and molecular epidemiology of carbapenem-resistant *A. baumannii* in two comprehensive hospitals of Beijing, China. *Front. Microbiol.* 6:997.

Liang C.A., Y.C. Lin, P.L. Lu, H.C. Chen, H.L. Chang, C.C. Sheu. 2018 Antibiotic strategies and clinical outcomes in critically ill patients with pneumonia caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.* 24:e1–7.

Liu B., M. Pop. 2009. ARDB—Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Res* 37: D443–D447.

Livermore D.M. 1995. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews*.8:557-84.

Llaca-Diaz J.M., S. Mendoza-Olazarán, A. Camacho-Ortiz. 2012. One-year surveillance of ESKAPE pathogens in an intensive care unit of Monterrey, Mexico. *Chemotherapy.* 58:475–81.

Lockhart S.R, M.A. Abramson, S.E. Beekmann, G. Gallagher, S.Riedel, D.J. Diekema, J. P. Quinn, G. V. Doern. 2007. Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. *J. Clin. Microbiol.* 45:3352–3359.

López Pérez M., J.A. Rodríguez Rodríguez, G.J. Castillo Oliva. 1999. Evolución de *Staphylococcus aureus* en el servicio de Ortopedia y Traumatología (2001-2007).

Magiorakos A.P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber and D. L. Monnet. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.*18:268–281.

Malagon-Londoño, Hernández Esquivel. *Infecciones hospitalarias*. 2da edición.

Mannien J., J.C. Wille, J.J. Kloek, B.H. van Benthem. 2011. Surveillance and epidemiology of surgical site infections after cardiothoracic surgery in The Netherlands, 2002–2007. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 141:899–904.

McManus M.C. 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health Syst Pharm.* 54:1420–1433.

Medicentro [Internet]. 2009 [citado 10 Feb 2016]; 13(1): [aprox. 3 p.]. Disponible en:<http://medicentro.vcl.sld.cu/pdf/Sumario/Ano%202009/v13n1a09/evolucion13.pdf>.

Mehta A.P., C. Rodrigues, K. Sheth, S. Jani, A. Hakimiyan, N. Fazalbhoy. 1998. Control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care Centre: A five-year study. *J Med Microbiol.* 16:3-4

Morfin-Otero R., J.C. Tinoco-Favila, H.S. Sader. 2012. Resistance trends in gram-negative bacteria: surveillance results from two Mexican hospitals, 2005–2010. *BMC Res Notes.* 5:277.

Mori T., S. Mizuta, H. Suenaga, K. Miyazaki. 2008. Metagenomic screening for bleomycin resistance genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6803–6805.

Mori Y., H. Kanda, T. Notomi. 2013. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *J Infect Chemother,* 19:404–41.

Mosquito S., J. Ruiz, J. L. Bauer, T. J. Ochoa. 2011. Mecanismos Moleculares De Resistencia Antibiótica En *Escherichia Coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 28 (4):648-56.

Moura A., M. Soares, C. Pereira, N. Leitao, I. Henriques. 2009. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics* 25: 1096–1098.

Muro S., E. Garza-González, A. Camacho-Ortiz, G.M. González, J.M. Llaca-Díaz, Bosques F., Rositas F. 2012. Risk factors associated with extended- spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* nosocomial bloodstream infections in a tertiary care hospital: a clinical and molecular analysis. *Chemotherapy.* 58:217–224.

Nagamine K., T. Hase, T. Notomi. 2002. Accelerated reaction by loop mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 16:223–229.

Nakano R., A. Nakano, Y. Ishii, T. Ubagai, T. Kikuchi-Ueda, H. Kikuchi, S. Tansho-Nagakawa, G. Kamoshida, X. Mu, Y. Ono. 2015. Rapid detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) gene by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J Infect Chemother* 21: 202-206.

Neu H.C. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science.* 257:1064–1073.
Noskin G.A, R.J. Rubin, J.J. Schentag, J. Kluytmans E.C. Hedblom, M. Smulders, E. Lapetina, E. Gemmen. 2005. The burden of *Staphylococcus aureus* infections

on hospitals in the United States: an analysis of the 2000 and 2001 Nationwide Inpatient Sample Database. *Arch Intern Med* 165: 1756–1761.

Notomi T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase. 2000. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28:e63.

Oberauner L., C. Zachow, S. Lackner, C. Hogenauer, K.H. Smolle, G. Berg. 2013. The ignored diversity: complex bacterial communities in intensive care units revealed by 16S pyrosequencing. *Scientific Reports*. 3:1413.

Onori R., S. Gaiarsa, F. Comandatore, S. Pongolini, S. Brisse, A. Colombo. 2015. Tracking nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infections and outbreaks by whole-genome analysis: small-scale Italian scenario within a single hospital. *J Clin Microbiol*. 53:2861–2868.

Peleg A.Y., D.C. Hooper. 2010. Hospital-Acquired Infections Due to Gram Negative Bacteria. *N Engl J Med*. 362:19:1804–13.

Piskin N., H. Aydemir, N. Oztoprak 2012. Inadequate treatment of ventilator-associated and hospital-acquired pneumonia: risk factors and impact on outcomes. *BMC Infect. Dis*. 12:268.

Poza M., C. Gayoso, M.J. Gomez, S. Rumbo-Feal, M. Tomas, J. Aranda, A. Fernandez, G. Bou. 2012. Exploring Bacterial Diversity in Hospital Environments by GS-FLX Titanium Pyrosequencing. *PLoS ONE*. 7: e44105,

Qin J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K.S. Burgdorf. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464: 59–65.

Qureshi A.H., S. Rafi, S.M.Qureshi, A.M. Ali 2004. The current susceptibility patterns of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* to conventional anti-staphylococcus antimicrobials at Rawalpindi. *Pak J Med Sci*. 20:361-4.

Rice L.B. 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis*. 197:1079–1081.

Riegelman R.K., Hirsch R.P. 1992. *Cómo estudiar un estudio y probar una prueba: lectura crítica de la literatura médica*. 2 ed. Washington: OPS.

Roberts K., C.F. Smith, A. M. Snelling, K.G. Kerr, K.R. Nafield, P. A. Sleight & C. B. Beggs. 2008 Aerial dissemination of *Clostridium difficile* spores. *BMC Infect. Dis*. 8: 7.

Romero Cabello, R. 2007. Microbiología y parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Editorial medica Panamericana. 3ra edición. México.

Rosenthal V.D., S. Guzman, C. Crnich. 2004. Device-associated nosocomial infection rates in intensive care units of Argentina. *Infect Control HospEpidemiol.* 25:251-5.

Ruppé E., D. Baud, S. Schicklin, G. Guigon, J. Schrenzel. 2016. Clinical metagenomics for the management of hospital and healthcare acquired pneumonia. *Future Microbiol.* 11:427-39.

Sackett D.L., Haynes R.B., Guyatt G.H., Tugwell P. 1998. Epidemiología Clínica. Ciencia básica para la medicina clínica. Madrid: Panamericana. Segunda edición.

Sambrook and Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.). Volumen I. Protocolo 7.

Schmieder R. y R. Edwards. 2012. Insights into antibiotic resistance through metagenomics approaches. *Future Microbiol.* 7: 73–89.

Sevillano E. y L. Gallego. 2011. Molecular techniques for detection and control of nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* Formatex Research Center; Badajoz, Spain.

Shin B., W. Park. 2017. Antibiotic resistance of pathogenic *Acinetobacter* species and emerging combination therapy. *J Microbiol.* 55:837–49.

Shoja S., M. Moosavian, S. Rostami, F. Abbasi, M.A. Tabatabaiefar, A. Peymani. 2016. Characterization of oxacillinase and metallo- β -lactamas genes and molecular typing of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Ahvaz, South-West of Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology.* 9: e32388.

Signore A. 2013. About inflammation and infection. *EJNMMI Research* 3:8
Siguier P., J. Perochon, L. Lestrade, J. Mahillon, M. Chandler 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* 34: D32–D36.

Snitkin E.S., M.A. Zelazny, P. J. Thomas, F. Stock, NISC Comparative Sequencing Program, D.K. Henderson, T.N. Palmore, J.A. Segre. 2012. Tracking a Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Whole-Genome Sequencing. *Science Translational Medicine.* 4:148ra116.

Stegger M. P.S. Andersen¹, A.Kearns, B. Pichon, M.A. Holmes, G. Edwards, F. Laurent, C. Teale, R. Skov y A.R. Larsen. 2012. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA_{LGA251}*. *Clinical Microbiology and Infection*. 18:395-400.

Tang C.Y.,S. Yiu, H. Kuo. 2015. Application of 16S rRNA metagenomics to analyze bacterial communities at a respiratory care centre in Taiwan. *ApplMicrobiol Biotechnol*. 99: 2871–2881.

Tenover F. C. 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*. Vol 119 (6A), S3–S10.

Tringe S.G., P. Hugenholtz. 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol* 11:442–446.

Tyson G.H., P.F. McDermott, C. Li. 2015. WGS accurately predicts antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 70(10), 2763–2769.

Vincent Jean-Louis. 2003. Nosocomial infections in adult intensive-care units. Review Article. *The Lancet*, Volume 361, Issue 9374. Pages 2068-2077.

Weber M.W., J.B. Carlin, S. Gatchalian. 2003. Predictions of neonatal sepsis in developing countries. *Pediatr Infect Dis J*. 22:711–16.

WHO. 2002. World Health Organization Department of Communicable Disease, Surveillance and Response Prevention of hospital-acquired infections. A practical guide 2nd edition. WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12

WHO. 2013. Media centre, Centro de prensa de la OMS (Organización Mundial de la Salud). Enfermedades Diarreicas. Nota descriptiva N°330..

Yang J., L.H. Chen, L.L. Sun, J. Yu, Q. Jin. 2008. VFDB 2008 release: an enhanced web-based resource for comparative pathogenomics. *Nucleic Acids Res* 36: D539–D542.

Yang S. and R. E. Rothman. 2004. Review PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses , limitations , and future applications in acute-care settings. *THE LANCET. Infectious Diseases*. 4:337–348.

Yao K.H., Z.J. Liu, J.G. Yu, S.J. Yu, L. Yuan et al. 2011. Type distribution of serogroup 6 *Streptococcus pneumoniae* and molecular epidemiology of newly identified serotypes 6C and 6D in China. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 70: 291–298.

Yun L., L. Yuan, Z. Bo, X. Feng, Z. Xiu-zhen, H. Yun-jian. 2017. Antimicrobial susceptibility of gram-negative organisms: results from China antimicrobial resistance surveillance trial program, 2015-2016. *Chin J Clin Pharmacol.* 33:2521–42.

Zavascki A.P., C.G. Carvalhaes, R.C. Picão, A.C. Gales. 2010. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 8:71–93.

Mori Y., H. Kanda, T. Notomi. 2013. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *J Infect Chemother,* 19:404–41.

Anexo I. Cultivos bacteriológicos multidrogo resistentes. (A) *A. baumannii*, (B) *S. aureus*, (C) *K. pneumoniae* y (D) *P. aeruginosa*.

A.

No.	Isolate	Clinical data			MIC (mg/l) ^a								
		Specimen	Isolation date (mo-yr)	Gender	SAM	TZP	CRO	FEP	MEM	AMK	GEN	CIP	SXT
1	Ab2	CT	08-2018	M	≥32	≥128	≥64	≥64	≥16	-	≥16	≥4	≥320
2	Ab4	Secretion	08-2018	M	≥32	≥128	≥64	≥64	≥16	-	≥16	≥4	≥320
3	Ab5	Expectoration	08-2018	F	≥32	≥128	≥64	≥64	≥16	32	-	≥4	≥320
4	Ab6	Expectoration	08-2018	M	16	≥128	≥64	≥64	≥16	34	-	≥4	≥320
5	Ab11	Blood	03-2019	M	≥32	-	≥64	≥64	≥16	-	≥16	≥4	≥320
6	Ab13	Expectoration	05-2019	M	≥32	-	≥64	≥64	8	-	≥16	≥4	≥320
7	Ab14	Blood	05-2019	M	≥32	-	≥64	≥64	≥16	8	≥16	≥4	≥320
8	Ab15	Urine	06-2019	M	≥32	-	≥64	≥64	8	-	≥16	≥4	≥320
9	Ab16	Urine	06-2019	M	≥32	-	≥64	≥64	≥16	-	≥16	≥4	≥320
10	Ab17	Urine	06-2019	M	≥32	-	≥64	32	4	-	≥16	≥4	≥320
11	Ab18	BS	06-2019	M	≥32	-	≥64	≥64	8	≥64	≥16	≥4	≥320
12	Ab19	Unknown	06-2019	M	≥32	-	≥64	≥64	8	≥64	≥16	≥4	≥320
13	Ab20	Blood	06-2019	M	≥32	-	≥64	32	8	-	≥16	≥4	≥320
14	Ab21	BA	06-2019	M	≥32	-	≥64	≥64	≥16	-	≥16	≥4	≥320
15	Ab22	Urine	06-2019	M	≥32	-	≥64	32	≥16	-	≥16	≥4	≥320
16	Ab23	BS	06-2019	M	≥32	-	≥64	32	≥16	-	≥16	≥4	≥320
17	Ab24	Urine	07-2019	F	≥32	-	≥64	≥64	≥16	-	≥16	≥4	≥320
18	Ab25	Urine	07-2019	M	≥32	-	≥64	≥64	8	32	≥16	≥4	≥320
19	Ab26	Urine	07-2019	F	≥32	-	≥64	≥64	≥16	-	≥16	≥4	≥320
20	Ab27	CT	07-2018	F	≥32	-	≥64	≥64	≥16	-	≥16	≥4	≥320
21	Ab28	PF	07-2019	M	≥32	-	≥64	≥64	≥16	-	≥16	≥4	≥320
22	Ab29	CT	07-2019	M	≥32	-	≥64	≥64	≥16	-	≥16	≥4	≥320
23	Ab30	Urine	07-2019	M	≥32	-	≥64	≥64	≥16	≥64	≥16	≥4	≥320
24	Ab31	Secretion	07-2019	M	≥32	-	≥64	≥64	≥16	-	≥16	≥4	≥320

CT, cateter tip; BS, bronchial secretion; BA, bronchial aspirate; PF, peritoneal fluid.

^a SAM, ampicillin-sulbactam; TZP, piperacillin-tazobactam; CRO, ceftriaxone; FEP, cefepime; MEM, meropenem; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; CIP, ciprofloxacin; SXT, trimethoprim-sulphamethoxazole.

B.

No.	Isolate	Clinical data			MIC (mg/l) ^a							
		Specimen	Isolation date (mo-yr)	Gender	OXA	GEN	CIP	MXF	ERY	CLI	TET	SXT
1	Sa2	BS	08-2018	M	≥4	-	≥8	4	≥8	≥8	-	-
2	Sa4	CF	08-2018	F	-	-	2	-	-	≥8	≥16	160
3	Sa7	Expectoration	09-2018	M	≥4	-	≥8	≥8	≥8	≥8	-	-
4	Sa20	WS	12-2019	M	≥4	-	≥8	≥8	≥8	≥4	-	-
5	Sa32	Blood	05-2019	F	≥4	≥16	≥8	≥8	≥8	≥4	-	80

BS, bronchial secretion; CF, Cerebrospinal fluid; WS, wound secretion.

^aOXA, oxacillin; GEN, gentamicin; CIP, ciprofloxacin; MXF, moxifloxacin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; TET, tetracycline; SXT, trimethoprim-sulphamethoxazole.

C.

No.	Isolate	Clinical data			MIC (mg/l) ^a										
		Specimen	Isolation date (mo-yr)	Gender	AMP	SAM	TZP	CZF	CRO	FEP	ATM	GEN	CIP	TGC	SXT
1	Kp3	TA	08-2018	M	≥32	≥32	64	≥64	≥64	2	≥64	≥16	≥4	4	≥320
2	Kp4	Urine	08-2018	F	≥32	≥32	16	≥64	≥64	2	16	-	2	-	≥320
3	Kp5	Blood	08-2018	M	≥32	≥32	16	≥64	≥64	2	16	≥16	-	-	≥320
4	Kp7	Secretion	08-2018	F	≥32	≥32	-	≥64	≥64	2	≥64	≥16	≥4	-	≥320
5	Kp8	Expectoration	08-2018	F	≥32	≥32	16	≥64	≥64	2	16	-	2	-	≥320
6	Kp9	Stool	08-2018	M	≥32	-	16	≥64	≥64	2	-	-	2	-	≥320
7	Kp10	CT	08-2018	M	≥32	-	16	≥64	≥64	8	-	-	2	-	≥320
8	Kp11	CT	09-2018	M	≥32	≥32	-	≥64	≥64	≥64	≥64	≥16	≥4	≥8	≥320
9	Kp13	Stool	10-2018	M	≥32	≥32	-	≥64	≥64	≤1	≥16	-	-	-	≥320
10	Kp14	TS	10-2018	M	≥32	≥32	16	≥64	≥64	-	16	≥16	≥4	-	≥320
11	Kp15	BS	10-2018	M	≥32	≥32	-	≥64	≥64	≥64	≥64	-	≥4	-	≥320
12	Kp17	VS	11-2018	F	≥32	≥32	-	≥64	≥64	2	16	≥16	2	-	≥320
13	Kp18	Blood	11-2018	M	≥32	≥32	16	≥64	≥64	2	16	≥16	2	-	≥320
14	Kp19	Urine	11-2018	F	≥32	≥32	-	-	-	-	-	≥16	-	-	-
15	Kp20	Blood	11-2018	M	≥32	≥32	-	≥64	≥64	2	16	≥16	2	-	≥320
16	Kp22	Secretion	11-2018	F	≥32	≥32	-	≥64	≥64	8	≥64	≥16	≥4	-	≥320
17	Kp23	Blood	11-2018	M	≥32	≥32	-	≥64	≥64	2	16	≥16	≥4	-	≥320
18	Kp29	Blood	01-2019	M	≥32	≥32	-	≥64	≥64	2	16	≥16	2	-	≥320
19	Kp30	BS	01-2019	F	≥32	≥32	32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥16	≥4	-	≥320
20	Kp32	Expectoration	03-2019	F	≥32	≥32	32	≥64	≥64	4	32	≥16	≥4	-	≥320
21	Kp33	Blood	03-2019	M	≥32	≥32	-	-	≥64	≥64	-	≥16	-	-	-
22	Kp34	Secretion	04-2019	M	≥32	≥32	-	-	≥64	4	-	≥16	≥4	-	≥320
23	Kp35	Blood	04-2019	M	≥32	≥32	-	-	≥64	4	-	≥16	2	-	≥320
24	Kp37	WS	04-2019	F	≥32	≥32	-	-	≥64	≥64	-	-	≥4	-	≥320
25	Kp41	BS	05-2019	M	≥32	≥32	-	-	≥64	≥64	-	≥16	-	-	-
26	Kp42	BS	05-2019	M	≥32	≥32	-	-	≥64	≥64	-	≥16	-	-	-
27	Kp44	Urine	06-2019	M	≥32	≥32	-	-	≥64	≥64	-	≥16	-	-	-
28	Kp45	Secretion	06-2019	M	≥32	≥32	-	-	≥64	2	-	≥16	≥4	-	≥320

TA, Tracheal aspirate; CT, cateter tip; TS, tracheal secretion; BS, bronchial secretion; VS, vaginal swab; WS, wound secretion.

^a AMP, ampicillin; SAM, ampicillin-sulbactam; TZP, piperacillin-tazobactam; CFZ, ceftazolin; CRO, ceftriaxone; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; GEN, gentamicin; CIP, ciprofloxacin; TGC, tigecycline; SXT, trimethoprim- sulphamethoxazole.

^b All isolates were negative to *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}.

D.

No.	Isolate	Clinical data			MIC (mg/l) ^a						
		Specimen	Isolation date (mo-yr)	Gender	FEP	ATM	MEM	AMK	GEN	CIP	FOF
1	Pa3	CT	08-2018	F	≥64	-	8	≥64	≥16	-	-
2	Pa4	WS	08-2019	M	32	-	≥16	≥64	≥64	-	-
3	Pa7	BS	08-2019	M	32	32	8	-	-	-	-
4	Pa11	CT	09-2018	M	≥64	-	≥16	≥64	≥16	≥4	-
5	Pa14	CT	09-2018	F	16	16	4	-	8	-	-
6	Pa15	BS	11-2018	M	8	16	≥16	≥64	-	≥4	-
7	Pa19	Secretion	12-2018	M	16	≥64	≥16	≥64	8	≥4	-
8	Pa22	BS	12-2018	M	32	16	≥16	≥64	-	≥4	-
9	Pa24	MF	01-2019	F	≥64	16	≥16	≥64	≥16	≥4	-
19	Pa26	BS	01-2019	M	32	32	≥16	≥64	-	≥4	-
20	Pa35	CT	02-2019	F	≥64	-	≥16	≥64	8	≥4	128
21	Pa39	CT	03-2019	M	≥64	-	≥16	≥64	≥16	≥4	-
22	Pa41	CT	04-2019	F	≥64	-	≥16	32	≥16	2	≥256
23	Pa42	Blood	04-2019	F	≥64	-	-	32	≥16	≤0.25	128
24	Pa44	CT	04-2019	M	≥64	-	≥16	≥64	8	≥4	64
25	Pa45	CT	04-2019	M	8	-	≥16	≥64	-	≥4	-
26	Pa46	CT	04-2019	M	≥64	-	≥16	≥64	≥16	2	≥256
27	Pa47	Blood	04-2019	M	≥64	-	≥16	≥64	≥16	2	≥256
28	Pa48	Blood	04-2019	F	≥64	-	8	≥64	≥16	-	128
29	Pa49	Blood	04-2019	F	≥64	-	-	≥64	≥16	-	128
30	Pa50	CT	04-2019	M	≥64	-	≥16	-	-	-	≥256
31	Pa55	Expectoration	05-2019	F	≥64	-	≥16	≥64	8	≥4	64
32	Pa56	BS	06-2019	M	≥64	-	≥16	≥64	8	≥4	≤16
33	Pa57	Blood	06-2019	M	≥64	-	8	≥64	≥16	≥4	≥256
34	Pa58	BS	06-2019	F	≥64	-	≥16	≥64	8	≥4	≤16
35	Pa59	Blood	06-2019	F	≥64	-	≥16	≥64	-	≥4	≤16
36	Pa60	Blood	06-2019	F	≥64	-	≥16	≥64	-	≥4	≤16
37	Pa62	CT	06-2019	M	≥64	-	≥16	≥64	≥16	≥4	32
38	Pa63	BS	06-2019	M	≥64	-	≥16	≥64	8	≥4	≤16
39	Pa66	BS	06-2019	F	≥64	-	≥16	≥64	8	≥4	≤16
40	Pa67	BS	06-2019	M	≥64	-	≥16	≥64	8	≥4	≤16
41	Pa68	BS	07-2019	M	≥64	-	≥16	≥64	8	≥4	≤16
42	Pa69	Urine	07-2019	M	≥64	-	≥16	≥64	8	≥4	≤16
43	Pa70	CT	07-2019	M	≥64	-	≥16	≥64	8	≥4	≤16
44	Pa72	BS	07-2019	F	≥64	-	≥16	≥64	8	≥4	≤16
45	Pa74	CT	07-2019	M	≥64	-	≥16	≥64	≥16	≥4	≥256
46	Pa75	Expectoration	07-2019	M	≥64	-	≥16	≥64	8	≥4	≤16

CT, catheter tip; WS, wound secretion; BS, bronchial secretion; MF, mediastinal fluid.

^a FEP, cefepime; ATM, aztreonam; MEM, meropenem; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; CIP, ciprofloxacin; FOF, fosfomicin.

^b All isolates were negative to *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}.

Anexo II. Primers para la identificación de los genes involucrados en el mecanismo de resistencia a antimicrobianos.

Primer	5'pos	3'pos	Tamaño (pb)	Tm	Secuencia
<i>bla_{OXA-23-like}</i>					
F3	361	379	19	55.78	GAAGCCATGAAGCTTTCTG
B3	540	560	21	55.76	GTATGTGCTAATTGGGAAACA
FIP			44		ACCGAAACCAATACGTTTTACTTCT-CAGTCCCAGTCTATCAGGA
BIP			42		CTGAAATTGGACAGCAGGTTGA-CTCTACCTCTTGAATAGGCG
F2	380	398	19	56.58	CAGTCCCAGTCTATCAGGA
F1c	435	459	25	60.93	ACCGAAACCAATACGTTTTACTTCT
B2	518	537	20	56.27	CTCTACCTCTTGAATAGGCG
B1c	464	485	22	60.82	CTGAAATTGGACAGCAGGTTGA
LF	413	434	22	60.02	TTTTGCATGAGATCAAGACCGA
LB	494	516	23	60.21	GGTTGGTAGGACCATTAAAGGTT
<i>bla_{OXA-24-like}</i>					
F3	358	376	19	56.46	ACTTTAGGTGAGGCAATGG
B3	551	569	19	57.14	CGGTTATGTGCAAGGTCAT
FIP			38		TGCATTAGCTCTAGGCCAGT-ATTGTCAGCAGTTCCAGT
BIP			47		GGAACACAGGTTCGATAATTTTTGG-CGGCAAATTAACCTTCTTGACT
F2	378	395	18	55.33	ATTGTCAGCAGTTCCAGT
F1c	418	437	20	60.40	TGCATTAGCTCTAGGCCAGT
B2	528	550	23	57.28	CGGCAAATTAACCTTCTTGACT
B1c	478	501	24	60.14	GGAACACAGGTTCGATAATTTTTGG
LF	398	417	20	60.11	CCGTCTTGCAAGCTCTTGAT
LB	507	527	21	60.09	TGGCCCCCTTAAATTACACC
<i>bla_{OXA-58-like}</i>					
F3	540	558	19	55.32	TGGCAATATGCAAATAGGC
B3	725	742	18	56.54	CCCAGCCACTTTTAGCAT
FIP			48		CCTTGGGCTAAATCATAACAACT-GGAAGTTGATCAATTTTGGTTGA
BIP			45		TTGCCTTTTAAACCTGAAGTTCAGC-ATAGACGATTCTCCCCTCTG
F2	561	583	23	57.54	GGAAGTTGATCAATTTTGGTTGA

F1c	620	644	25	61.37	CCTTGGGCTAAATCATACACAAACT
B2	705	724	20	57.28	ATAGACGATTCTCCCCTCTG
B1c	649	673	25	62.38	TTGCCTTTTAAACCTGAAGTTCAGC
LF	587	611	25	60.88	TGTATAGGTGTAATTGTCAAAGGCC
LB	680	704	25	60.54	TGAAAGAGATGTTGTATGTAGAGCG
<i>bla_{IMP}</i>					
F3	196	214	19	56.05	GCGTTGTTCTAAACATGG
B3	396	417	22	55.77	TTGTTAATTCAGATGCATACGT
FIP			45		CTCCACAAACCAAGTGACTAACTTT- GGTTCTTGTAATGCTGAGG
BIP			43		AGGCAGCATTTCCTCTCATTTTT- AGATCGAGAATTAAGCCACTC
F2	221	240	20	55.76	GGTTCTTGTAATGCTGAGG
F1c	281	305	25	61.37	CTCCACAAACCAAGTGACTAACTTT
B2	369	389	21	56.79	AGATCGAGAATTAAGCCACTC
B1c	323	344	22	60.44	AGGCAGCATTTCCTCTCATTTTT
LF	255	279	25	60.41	CAGTATCTTTAGCCGTAAATGGAGT
LB	346	362	17	61.33	ATAGCGACAGCACGGGC
<i>bla_{VIM}</i>					
F3	190	207	18	59.58	TGGTCGCATATCGCAACG
B3	396	413	18	59.89	GCCCGAAGGACATCAACG
FIP			39		TCGCACCCCACGCTGTATCA- GGTCTACCCGTCCAATGGT
BIP			39		AACACAGCGGCACTTCTCGC- TGAAAGTGCGTGGAGACTG
F2	225	243	19	60.54	GGTCTACCCGTCCAATGGT
F1c	279	298	20	65.81	TCGCACCCCACGCTGTATCA
B2	359	377	19	59.22	TGAAAGTGCGTGGAGACTG
B1c	301	320	20	65.40	AACACAGCGGCACTTCTCGC
LF	245	269	25	64.39	AACTCATCACCATCACGGACAATGA
LB	330	351	22	60.31	AAAGCAAATTGGACTTCCCGTA
<i>mcr-1</i>					
F3	42	60	19	60.42	TCCGTTTGTCTTGTTGGCG
B3	216	235	20	59.60	CAGGCTTTAGCACATAGCGA
FIP			41		TCCGCGATGGGATAGTTTGG- GTGTTGCCGTTTTCTTGACC
BIP			42		AATCTCGGCTTTGTGCTGACGA- CGATGATAACAGCGTGGTGA
F2	62	81	20	59.53	GTGTTGCCGTTTTCTTGACC

F1c	117	137	21	64.04	TCCGCGATGGGATAGGTTTGG
B2	194	213	20	59.52	CGATGATAACAGCGTGGTGA
B1c	139	160	22	64.49	AATCTCGGCTTTGTGCTGACGA
LF	83	103	21	60.50	AAAAGGTAAGATTGGCGGTCG
LB	162	180	19	63.59	CGCTGTCGTGCTCTTTGGC
<i>bla_{KPC}</i>					
F3	54	70	17	59.36	TGGCTTTTCTGCCACCG
B3	232	247	16	61.86	TGCGAGCCAGCACAGC
FIP			37		TACACACCGATGGAGCCGCC- CCTCGTCGCGGAACCAT
BIP			41		GGCTCAGGCGCAACTGTAAGT- GCAGCAAGAAAGCCCTTGAA
F2	81	97	17	60.91	CCTCGTCGCGGAACCAT
F1c	121	140	20	66.41	TACACACCGATGGAGCCGCC
B2	211	230	20	60.99	GCAGCAAGAAAGCCCTTGAA
B1c	154	174	21	64.90	GGCTCAGGCGCAACTGTAAGT
LB	182	198	17	60.28	CTGAGGAGCGCTTCCCA
<i>bla_{NDM}</i>					
F3	231	249	19	59.18	TTTGATCGTCAGGGATGGC
B3	420	437	18	59.75	TTCGACAACGCATTGGCA
FIP			40		GGCAGGTTGATCTCCTGCTTGA- GGTCGATACCGCCTGGAC
BIP			35		CGGTGGTGACTCACGCGCA- AGTCGCAATCCCCGCC
F2	264	281	18	61.08	GGTCGATACCGCCTGGAC
F1c	314	335	22	64.44	GGCAGGTTGATCTCCTGCTTGA
B2	402	417	16	60.98	AGTCGCAATCCCCGCC
B1c	347	365	19	67.09	CGGTGGTGACTCACGCGCA
LF	293	310	18	60.49	AGTTGAGGATCTGGGCGG
LB	366	383	18	60.78	TCAGGACAAGATGGGCGG
<i>bla_{SHV}</i>					
F3	453	468	16	59.41	CGGCGACAACGTCACC
B3	634	649	16	60.68	TCAACGGTCCGGCGAC
FIP			35		ATGCTGGCCGGGGTAGTGG- GCCTTGACCGCTGGGA
BIP			36		GACCCTGCGCAAGCTGCT- CGTCCACCATCCACTGCA
F2	470	485	16	60.53	GCCTTGACCGCTGGGA
F1c	527	545	19	66.32	ATGCTGGCCGGGGTAGTGG

B2	611	628	18	61.32	CGTCCACCATCCACTGCA
B1c	552	569	18	65.02	GACCCTGCGCAAGCTGCT
LF	487	505	19	62.27	GCGCCTCATTGAGTTCCGT
LB	570	586	17	60.52	GACCAGCCAGCGTCTGA
<i>bla_{TEM}</i>					
F3	367	386	20	59.64	GCTGCCATAACCATGAGTGA
B3	564	583	20	59.43	CGCCAGTTAATAGTTTGCGC
FIP			42		ACATGATCCCCCATGTTGTGCA- CTTCTGACAACGATCGGAGG
BIP			39		CGTTGGGAACCGGAGCTGAA- AACGTTGTTGCCATTGCTG
F2	406	425	20	59.50	CTTCTGACAACGATCGGAGG
F1c	449	470	22	64.59	ACATGATCCCCCATGTTGTGCA
B2	545	563	19	59.16	AACGTTGTTGCCATTGCTG
B1c	484	503	20	64.42	CGTTGGGAACCGGAGCTGAA
LF	426	443	18	61.00	GCGGTTAGCTCCTTCGGT
LB	504	523	20	60.05	TGAAGCCATACCAAACGACG