

CAPÍTULO II.

Determinantes genéticos de la resistencia bacteriana



● **Diana Paola López Velandia**

dplopez@uniboyaca.edu.co.
<https://orcid.org/0000-0002-5408-6140>.

Magíster en Ciencias Biológicas.
Universidad de Boyacá.

● **Maritza Angarita Merchán**

mangarita@uniboyaca.edu.co.
<https://orcid.org/0000-0002-0220-2701>.

Magíster en Sistemas Integrados de Gestión.
Universidad de Boyacá.

Introducción

En los últimos años se han realizado análisis a genomas que ponen en evidencia la existencia de al menos 20.000 genes de resistencia, aunque la expresión de la resistencia se presenta en muy pocos. Así se ha documentado la teoría de la transferencia horizontal de genes, fundamentada en la identificación de islas genómicas de patogenicidad en patógenos de animales, plantas y humanos, las cuales se han investigado gracias al estudio de las secuencias de genes bacterianos (Torres *et al.*, 2018).

Dichos mecanismos de resistencia están presentes en bacterias Gram negativas y Gram positivas e implica un desafío evolutivo en cuanto a menudo las bacterias adquieren determinantes genéticos; esto puede presentarse por elementos genéticos móviles capaces de moverse dentro o entre moléculas de ADN, que incluyen secuencias de inserción, transposones y casetes/integrone de genes, y por elementos que pueden transferirse entre células bacterianas, como plásmidos y elementos integrativos y conjugativos (ICE) (Estepa *et al.*, 2017). Esa transferencia puede darse entre la misma o diferente especie, inclusive entre Gram positivas y Gram negativas, también, la inserción de pequeños fragmentos dentro del cromosoma bacteriano puede transferirse de manera horizontal, de modo que adquieren genes de resistencia más fácilmente.

Aparte de este mecanismo, existen otras formas para que las bacterias obtengan esos determinantes genéticos, entre ellas predomina la transferencia por medio de la

conjugación, transformación y transducción (Figura 7) (Partridge *et al.*, 2018).

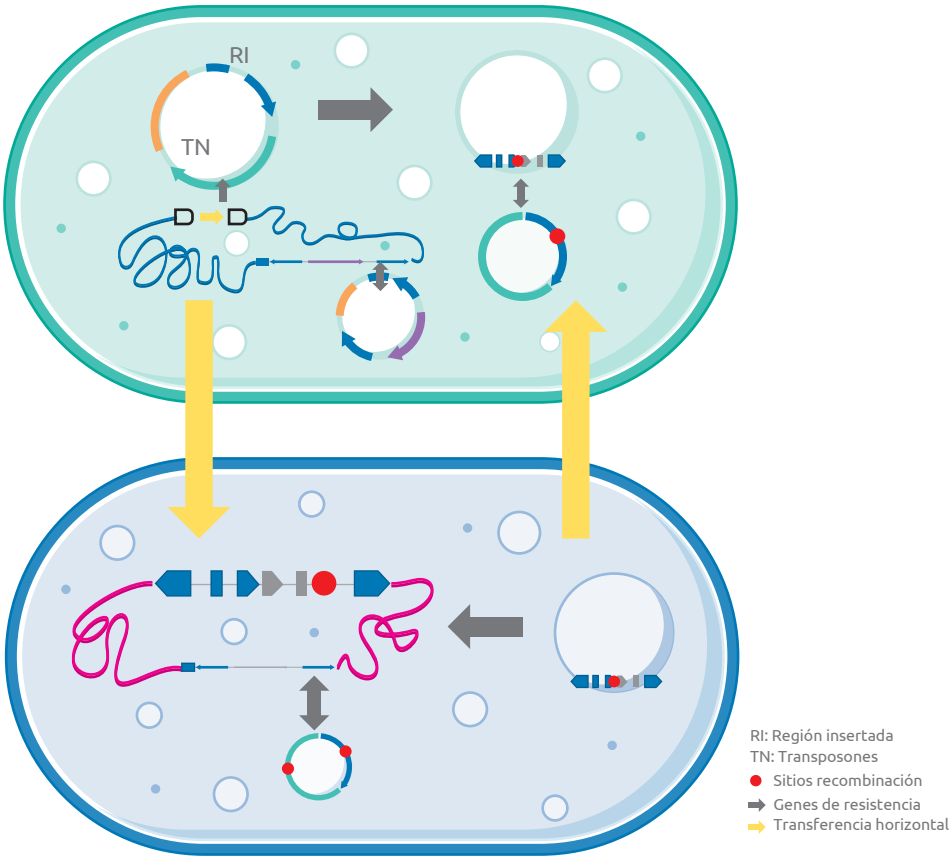


Figura 7. Intercambio de determinantes genéticos
Fuente: Elaboración Propia

De otra parte, se conocen otros mecanismos para que las bacterias puedan llegar a ser resistentes, como la producción de enzimas que inactivan antibióticos, la modificación del sitio diana, la disminución de la permeabilidad de la membrana celular y las bombas de eflujo (Bello & Dingle, 2018) (Tabla 2).

Tabla 2 . Determinantes genéticos frecuentes de Gram negativos

Mecanismo	Antibióticos	Fenotipo de resistencia	Genes de resistencia representativos	Ubicación del gen	Gram-negativos que con mayor frecuencia presentan el gen de resistencia
Enzimas que inactivan antibióticos	Betalactámicos	Penicilinas clase A de Ambler	<i>bla</i> TEM, <i>bla</i> SHV	P o C	<i>Enterobacteriaceae</i>
		Ambler clase A BLEE	<i>bla</i> TEM, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> CTX-M	P o C	<i>Enterobacteriaceae</i>
		Carbapenemasa de clase A de Ambler	<i>bla</i> KPC <i>bla</i> SME <i>bla</i> NMC <i>bla</i> IMI <i>bla</i> GES	P o C	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [<i>P. aeruginosa</i>], <i>Acinetobacter baumannii</i> [<i>A. baumannii</i>]
		Metalobetalactamasa de clase B de Ambler	<i>bla</i> NDM <i>bla</i> VIM <i>bla</i> IMP <i>bla</i> GIM <i>bla</i> SIM	PAG	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>
		Cefalosporinas clase C de Ambler	<i>bla</i> CMY, <i>bla</i> MIR, <i>bla</i> MOX, <i>bla</i> LAT, <i>bla</i> FOX, <i>bla</i> DHA, <i>bla</i> ACT, <i>bla</i> ACC, <i>bla</i> CFE	P o C	C - Organismos SPICE-HaM P - Otras <i>Enterobacteriaceae</i>
		Ambler clase D BLEE o carbapenemasa	<i>bla</i> OXA	P o C	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>
	Aminoglucósido	AME - acetiltransferasa (AAC)	<i>aac</i> (3) -, <i>aac</i> (6') -	P o C	Numerosos organismos Gram-negativos
		AME - nucleotidiltransferasa (ANT)	<i>hormiga</i> (2') -	P o C	Numerosos organismos Gram-negativos
		AME - fosfotransferasa (APH)	<i>aph</i> (3') -	P o C	Numerosos organismos Gram-negativos
Modificación del objetivo de antibióticos	Betalactámicos	Alteración de PBP	<i>ftsI</i> , <i>penA</i>	C	<i>Haemophilus influenzae</i> [<i>H. influenzae</i>], <i>Neisseria</i> spp. , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	Fluoroquinolonas	Protección de ADN girasa	<i>qnr</i>	P o C	Numerosos organismos Gram-negativos
		Alteración de la ADN girasa	<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i>	C	Numerosos organismos Gram-negativos
		Alteración de la topoisomerasa IV	<i>parC</i> , <i>parE</i>	C	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	Aminoglucósidos	Metilación del ARNr 16S	<i>rmtA</i> , <i>rmtB</i> , <i>rmtC</i> , <i>armA</i>	PAG	Numerosos organismos Gram-negativos
	Trimetoprima/sulfametoxazol	Mutación DHPS	<i>folP</i> , <i>sulI</i> , <i>sulII</i>	PAG	Numerosos organismos Gram-negativos
		Mutación DHFR	<i>dfr</i> <i>dhfrI</i>	PAG T (Tn 7)	<i>H. influenzae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Escherichia coli</i> [<i>E. coli</i>]
	Polimixinas	Alteración de LPS	<i>mcr</i>	PAG	<i>Enterobacteriaceae</i>
Bomba de eflujo	Numeroso	Expresión de la familia RND	<i>acrAB</i> , <i>tolC</i> <i>adeABC</i> <i>mex</i> <i>sdeAB</i> , <i>sdeCDE</i> <i>smeABC</i>	P o C	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> [<i>S. marcescens</i>] <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> [<i>S. maltophilia</i>]
		Expresión ABC	<i>vcaM</i> , <i>macAB</i>	C	<i>Vibrio cholerae</i> [<i>V. cholerae</i>], <i>E. coli</i>
		Expresión MFS	<i>emrAB</i>	C	<i>E. coli</i>
		Expresión MATE	<i>norma</i> , <i>ydhE</i>	C	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> [<i>V. parahaemolyticus</i>], <i>E. coli</i>
		Expresión SMR	<i>emrE</i> , <i>qac</i> , <i>sugE</i>	C	Numerosos organismos Gram-negativos
		Sobreexpresión de la bomba de eflujo	<i>mex</i> , <i>adeABC</i> , <i>marA</i> , <i>yhiV</i> , <i>soxX</i> , <i>mdfA</i> , <i>mtrCDE</i>	C	<i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> [<i>N. gonorrhoeae</i>]
		Pérdida de la función de la porina	<i>oprD</i>	C	<i>P. aeruginosa</i>
Barrera de permeabilidad	β-lactámicos	Mutación de la porina (bucle L3)	<i>omp36</i> , <i>porB</i> , <i>ompF</i> , <i>ompC</i> , <i>carO</i>	C	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Acinetobacter</i> spp. , <i>Enterobacteriaceae</i>

P, plásmido; C, cromosoma; T, transposón

Fuente: elaboración propia con base en datos de Bello y Dingle (2018).

Con el objetivo de la mejor comprensión de la temática abordada y la información previamente expuesta, se hace un acercamiento a los componentes genéticos de la resistencia bacteriana de cepas Gram negativas y Gram positivas:

Genes de resistencia en bacterias Gram negativas

La identificación de cepas resistentes ha sido uno de los grandes desafíos para el laboratorio de microbiología. En la última década ha adquirido gran importancia la caracterización de genes encargados de codificar la resistencia a antibióticos, especialmente en cepas de la familia *Enterobacteriaceae*, pues estas son consideradas los microorganismos más frecuentes. Al respecto, la OMS publicó una lista de prioridades mundiales de bacterias patógenas resistentes a los antimicrobianos, en el que se encuentra este grupo de bacterias.

El alto número de cepas resistentes en humanos está asociado a las frecuentes visitas a hospitales, estadías prolongadas en establecimientos de salud, hospitales de atención terciaria y hospitales universitarios (Taggar *et al.*, 2020). La tipificación de estos genes ha demostrado que la detección rápida de resistencias mejora los resultados de los pacientes, pues disminuye la mortalidad, la duración de la estancia hospitalaria, las tasas de superinfección y reacciones adversas a los medicamentos y, por ende, reduce los costos (Endimiani *et al.*, 2020).

AmpC

Los genes que codifican estas betalactamasas se encuentran comúnmente en los cromosomas de algunas *Enterobacteriaceae* como *Citrobacter freundii* [*C. freundii*], *Morganella morganii* [*M. morgananni*], *Providencia* spp.,

Enterobacter spp. y *S. marcescens*, y puede transmitirse a los plásmidos. La resistencia a cefalosporinas de amplio espectro entre *Enterobacteriaceae* que carecen de genes *AmpC* cromosómicos inducibles como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. y *Proteus mirabilis* [*P. mirabilis*] ha surgido mediante la adquisición de betalactamasa AmpC mediada por plásmido (Etemadi *et al.*, 2020; Tamma *et al.*, 2019). Dentro de este gen se han identificado variaciones alélicas y actualmente han surgido numerosas betalactamasas tipo AmpC. Sin embargo, la betalactamasa *bla* CMY-2 de tipo AmpC es la más prevalente.

Entre bacterias Gram negativas, el gen *bla* CMY-2 se puede encontrar de forma plasmídica y proporciona resistencia a antibióticos betalactámicos como penicilina, cefoxitina o cefotetan, cefalosporinas, especialmente cefalosporinas de tercera generación, y ocasionalmente carbapenémicos (Fallah *et al.* 2020; Tamma *et al.*, 2019).

Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Durante la década de 1980, las BLEE evolucionaron principalmente por mutación puntual de *bla* TEM, *bla* SHV y *bla* OXA. No obstante, desde el 2000 empezaron a presentar cambios genotípicos en los que la betalactamasa tipo *bla* C-TX-M se identificó con una presentación más alta entre las bacterias Gram negativas (Chevet *et al.*, 2012).

Las BLEE hidrolizan el anillo betalactámico de las cefalosporinas de tercera generación. Los genes codificantes para la resistencia a las betalactamasas son de origen plasmídico, el cual es una estructura que puede llegar a ser altamente móvil y albergar genes de otro tipo de resistencia a otras clases de antimicrobianos no relacionados, como quinolonas y aminoglucósidos. Durante el proceso catalítico, las

enzimas TEM, SHV y CTX-M utilizan sus residuos Ser70, Glu166, Lys73, Lys234 y Ser130, y la enzima OXA utiliza residuos Ser70, Lys73, Ser118 y Lys216 secuencialmente, lo que genera su hidrólisis. Se han reportado e identificado más de 211 variantes de estas enzimas, que se originan principalmente por sustituciones de un solo aminoácido que conducen a una alteración de la especificidad del sustrato y la actividad hidrolítica (Dhara & Tripathi, 2014).

Los genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M mediados por plásmidos son los más comunes en las especies de *Klebsiella* spp., seguido de *E. coli*. Estos genes BLEE producen enzimas que son capaces de llevar a cabo la hidrólisis de cefalosporinas y monobactamas de amplio espectro, pero que son inactivas frente a cefamicinas e imipenem. Se ha demostrado que cambios alélicos en los genes conducen a la sustitución en la secuencia de uno o dos aminoácidos, los cuales pueden mejorar la actividad catalítica de las betalactamasas contra las cefalosporinas de espectro extendido. La principal sustitución del aminoácido Gly238Ser en las betalactamasas TEM o SHV produce hidrólisis de las oximinocefalosporinas, mientras que la sustitución de Glu240Lys aumenta la actividad enzimática (Elmowalid *et al.*, 2018).

Gen *bla*CTX-M

La primera enzima CTX-M (cefotaximasa) se descubrió en 1986. Esta familia de BLEE ahora incluye más de 60 enzimas diversas en cinco grupos filogenéticos (Dhara & Tripathi, 2014).

Los genes *bla*CTX-M, en particular *bla*CTX-M-15, han estado involucrados en diversas situaciones epidemiológicas y se han diseminado por todos los continentes como resultado de plásmidos epidémicos y/o cepas epidémicas particulares. Su prevalencia aumenta constantemente

y varía del 6 % al 88 % en varios entornos de atención médica en todo el mundo. Además, los genes *bla*TEM y *bla*CTX-M son los genes productores de BLEE más comunes (Pishtiwan & Khadija, 2019). Incluso, los genes *bla*CTX-M se han convertido en el genotipo BLEE más comúnmente detectado en diversas ubicaciones geográficas del mundo, aunque existe una variación en las tasas de resistencia a los antimicrobianos y los genes asociados, dependiendo del área geográfica del estudio (Yasir *et al.*, 2020).

Gen *bla* TEM

La primera betalactamasa fue identificada en Grecia en la década de 1960. Esta era mediada por plásmidos en bacterias Gram negativas y se denominó TEM por el paciente del que se aisló (Temoniera). Dicha betalactamasa estaba presente en una cepa de *E. coli* (Haghighatpanah *et al.*, 2016). Posteriormente, se descubrió una enzima estrechamente relacionada y se denominó TEM-2. Esta presentaba características similares a la TEM-1 en cuanto a sus propiedades bioquímicas, y se diferenciaban por el cambio de un solo aminoácido (Gln por Lys en la posición 39) que resulta en un valor de punto isoeléctrico distinto: para TEM-1 de 5,4 y para TEM-2 de 5,6. Las cepas que adquieren el gen por lo general son microorganismos multirresistentes (Fast & Sutton, 2013).

Resistencia a carbapenémicos

Dentro de los antibióticos betalactámicos, los carbapenémicos se consideran la última opción de tratamiento para las infecciones causadas por bacilos Gram negativos multirresistentes, por lo que la aparición de resistencias a esta familia involucra graves implicaciones para la salud pública. Desafortunadamente, la producción de enzimas resistentes es cada vez más frecuente, lo que ha limitado las opciones terapéuticas disponibles (Rodríguez *et al.*, 2020).

Las carbapenemasas son enzimas que pertenecen a las betalactamasas, que se dividen en diferentes clases: las principales son las metalobetalactamasas (Clase B de Ambler), de mayor frecuencia en bacterias no fermentadoras, y las Serinocarbapenemasas (Clase A de Ambler), predominantes en enterobacterias (Torres *et al.*, 2018).

Dentro de las betalactamasas, las tipo A de la clasificación de Ambler (KPC), las clase B (VIM, IMP, NDM) y las clase D (OXA-48) son las que se encuentran con mayor frecuencia y generan infecciones en el ámbito hospitalario, de igual forma, existen variantes de los genes que codifican para estas enzimas, como los clones de alto riesgo (ST) adquiridos en hospitales. Entre ellos están las variantes ST258 y ST11, las cuales se difundieron en todo el mundo (Vargas *et al.*, 2019).

Por otro lado, las enzimas que confieren la resistencia a carbapenémicos se encuentran clasificadas dentro de tres clases de Ambler: clase A, incluidas las carbapenemasas de serina KPC, FRI, IMI y SME; clase B, incluidas las metalobetalactamasas, VIM, NDM, e IMP; y clase D, incluidos OXA-48, OXA-23, OXA-24 y OXA-58. Sus genes codificantes llevan el mismo nombre. Ante esto, la transferencia horizontal de genes de plásmidos que transportan genes que codifican carbapenemasas juega un papel clave en la propagación de estas bacterias multirresistentes (Soliman *et al.*, 2020).

Las metalobetalactamasas están clasificadas en la clase B según hidrolizan antibióticos betalactámicos, excepto los monobactámicos que son inhibidos por quelantes de cationes divalentes como EDTA y mercaptoacetato de sodio, y según hidrolizan los inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico y la sulbactam (Togneri *et al.*, 2013). De otro lado, existen muchos tipos de carbapenemasas que se encuentran en plásmidos como los presentes en *Klebsiella*

pneumoniae [*K. pneumoniae*], OXA-betalactamasas y metalobetalactamasas, incluyendo Nueva Delhi MBL [NDM], Verona Integron codificada metalobetalactamasa [VIM] y metalobetalactamasa de tipo IMP (Yamakawa *et al.*, 2019).

Gen ^{bla}KPC

Este gen se ubica dentro de un elemento genético móvil y confiere resistencia a todos los antibióticos betalactámicos. Fue identificado por primera vez en 1996 en Estados Unidos y ha tenido una distribución global (Limbago *et al.*, 2011). *K. pneumoniae* es considerada la especie más importante en la producción de KPC, sin embargo, se ha detectado en otras cepas de la familia *Enterobacteriaceae* como *Klebsiella oxytoca* [*K. oxytoca*], *Salmonella enterica* [*S. enterica*], *E. coli*, *M. morganii*, *Proteus* spp., *C. freundii*, *S. marcescens*, *Enterobacter* spp., *Raoultella ornithinolytica* [*R. ornithinolytica*], *Pantoea* spp. y *Providencia* spp. De igual forma, ha sido reportada en bacilos Gram negativos no fermentadores como *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Raoultella* spp. y *Pantoea* spp. (Saldanha Ribeiro *et al.*, 2016).

Gen OXA

Las enzimas de las carbapenemasas de clase D son las OXA-β-lactamasas, subdivididas en varios subgrupos, principalmente ^{bla}OXA-24/40, ^{bla}OXA-23, ^{bla}OXA-58, ^{bla}OXA-143, ^{bla}OXA-51 y ^{bla}OXA-48. Estas betalactamasas de tipo OXA se encuentran ampliamente en *Acinetobacter* spp., que es la más abundante ^{bla}OXA-51 que está codificada cromosómicamente y, por lo tanto, es intrínseca a estas especies, aunque puede conferir resistencia a los carbapenémicos cuando su expresión está regulada por incremento por reorganización genética. Estas enzimas se encuentran agrupadas en dos clases: (I) carbapenemasas identificadas por primera vez en otras familias bacterianas

antes de la diseminación secundaria en enterobacterias (OXA-198, OXA-23, OXA-58 y OXA-40), y (II) carbapenemasas identificadas por primera vez en enterobacterias (OXA-372 y OXA-427) (Aruhomukama *et al.*, 2019).

Dentro de las variantes de este gen está *bla* OXA-23, que ha sido identificado en plásmidos conjugativos diferentes, aunque es el más común en *A. baumannii*. El gen *bla* OXA-23 se encuentra con mayor frecuencia en varios transposones asociados con IS Aba1 (por ejemplo, Tn 2006 o Tn 2008) o IS Aba4 (Tn2007). Esta cabapenemasa está ampliamente distribuida, pero en el año 2002 fue descrita en un género distinto a *Acinetobacter* spp. Dentro de las variantes descritas en otras enterobacterias está la OXA-198 en *P. aeruginosa*, OXA-372 en *C. freundii*, OXA427 en *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Providencia rettgeri* [*P. rettgeri*], *K. oxytoca* y *S. marcescens* (Bonnin *et al.*, 2020).

Gen *bla* VIM

Las metalobetalactamasas fueron identificadas por primera vez en una *P. aeruginosa* de Italia en 1999, poco después de provocar un brote generalizado en un hospital griego (Protonotariou *et al.*, 2020). Este gen ha sido identificado en especies como *K. pneumoniae* y *E. cloacae*. Se puede encontrar como plásmidos y transposones, también conocidos como elementos genéticos móviles, los cuales pueden portar integrones que incluyen genes que codifican resistencia a los medicamentos aminoglucósidos, sulfonamidas y fluoroquinolonas a través de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, dihidrofolato reductasa [*dhfr*] y resistencia a quinolonas mediada por plásmidos [*qnr*] (Villa *et al.*, 2017).

Gen ^{bla} *NDM-1*

La inhibición de las metalobetalactamasas [MBL] está mediada por agentes quelantes de Zinc, como el ácido etilenodiamino tetra acético [EDTA]. Los genes que las codifican para estas enzimas, como el ^{bla}*NDM-1*, son de origen plasmídico o cromosómico. Las MBL son las encargadas de la hidrólisis de un amplio grupo de antibióticos betalactámicos, incluyendo carbapenemas, penicilinas y cefalosporinas (1ª, 2ª, 3ª y 4ª generación); sin embargo, presentan sensibilidad a aztreonam. Por consiguiente, son de gran importancia clínica, ya que actúan frente a los carbapenémicos que son de amplio espectro de acción y son utilizadas como último recurso en tratamientos de infecciones con resistencia a otros antibióticos betalactámicos, principalmente en bacilos Gram negativos resistentes (Estepa *et al.*, 2017).

Tabla 3. Variantes del gen *bla* *NDM-1*

Variantes NDM-1	Sustitución de aminoácidos
<i>NDM-2</i>	P28A
<i>NDM-3</i>	D95N
<i>NDM-4</i>	M154L
<i>NDM-5</i>	V88L, M154L
<i>NDM-6</i>	A233L
<i>NDM-7</i>	D130N, M154L
<i>NDM-8</i>	D 130 por G / M154L
<i>NDM-9</i>	Q 152 por K
<i>NDM-10</i>	R32S, G36D, G69S, A74T y G200R
<i>NDM-12</i>	G 22 por D/ M154L
<i>NDM-13</i>	D95N, M154L
<i>NDM-14</i>	D130G
<i>NDM-15</i>	A233V, M154L
<i>NDM-16</i>	A264H
<i>NDM-17</i>	V88L, M154L, E170L

Fuente: elaboración propia con base en datos de Khan *et al.* (2017).

El gen ^{bla}*NDM-1* presenta diferencia a las características con otras MBL, pero posee un 32,4 % de identidad con *VIM-1/VIM-2*. Por la misma razón, se sugiere que *NDM-1* se encuentra en la subclase B1 (Monge, 2013). A la fecha se conocen 17 variantes de *NDM-1* relacionadas (Tabla 3),

entre las que se identifican las sustituciones de aminoácidos (Khan *et al.*, 2017).

Resistencia colistina

Las polimixinas son antibacterianos de tipo bactericida e incluyen seis compuestos: A, B, C, D, E y M. Son consideradas como la terapia de último recurso contra las enterobacterias resistentes a carbapenémicos. Su descubrimiento se dio en 1947 por Koyama *et al.*, quienes le otorgaron su nombre por tratarse de un metabolito secundario de *Paenibacillus polymyxa* subsp. *colistinas*, bacteria Gram positiva presente en el suelo (Melgarejo, 2022). En el 2015 fue descrita la resistencia de *Enterobacteriaceae* transferible a la colistina mediada por el plásmido (gen *mcr-1*) en aislados humanos, animales y ambientales (Dalmolin *et al.*, 2018). Actualmente se conocen alrededor de 22 variantes genéticas del “gen” *mcr-1*, las cuales son completamente funcionales y sus diferencias radican en uno o pocos aminoácidos, que les provocan una elevada identidad de nucleótidos y aminoácidos que les permiten efectos similares para la resistencia a la colistina. Estas variantes son: *mcr-1.1*, *mcr-1.2*, *mcr-1.3*, *mcr-1.4*, *mcr-1.5*, *mcr-1.6*, *mcr-1.7*, *mcr-1.8*, *mcr-1.9*, *mcr-1.10*, *mcr-1.11*, *mcr-1.12*, *mcr-1.13*, *mcr-1.14* y *mcr-1.15*, *mcr-1.16*, *mcr-1.17*, *mcr-1.18*, *mcr-1.19*, *mcr-1.20*, *mcr-1.21* y *mcr-1.22* (Melgarejo 2022).

Gen *mcr-1*

En 1996 se identificó resistencia a los carbapenémicos. Esta se convirtió en una preocupación fundamental en el sector sanitario, debido al aumento de la mortalidad y a las limitadas opciones terapéuticas. Por esta situación, la tigeciclina y la colistina se emplean como la “terapia de última línea” para estos organismos resistentes. No

obstante, el uso excesivo de la colistina ha conducido a un aumento de la notificación de patógenos bacterianos resistentes en todo el mundo, y esa es la principal causa de la resistencia a las polimixinas, junto con la modificación del lipopolisacárido [LPS] y su asociación a sistemas de dos componentes: *phoPQ*, *pmrAB* y el regulador *mgrB* (Mobasser *et al.*, 2019).

El gen *mcr-1* fue identificado por primera vez en China en el año 2015, a partir de aislados de *E. coli* en alimentos (Srinivas & Rivard, 2017). Se encontró que era transmitido por plásmidos y que se propagaba fácil y rápidamente entre diferentes poblaciones bacterianas. Este gen codifica una proteína transmembrana citoplásmica conocida como MCR-1, presente en bacterias Gram negativas, la cual se produjo gracias a una modificación de la ubicación 1' o 4' del grupo principal del lípido A. Su efecto consiste en ocultar los grupos fosfato cargados negativamente en la superficie bacteriana y retirar la atracción electrostática inicial de la que dependen en gran medida la colistina y otras polimixinas (Son *et al.*, 2019).

Genes de resistencia en bacterias Gram positivas

Gen *mecA*

Los primeros aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina [SARM] fueron reportados en 1961 tras la introducción de la meticilina en la práctica clínica. Al poco tiempo, se evidenció que presentaba un perfil heterogéneo de resistencia a antibióticos betalactámicos. Algunos estudios han reportado que dicha resistencia puede darse por mutaciones en los genes asociados con la división celular, así como al metabolismo central, los

cuales influyen en la expresión de la resistencia a los betalactámicos y el fenotipo resultante (Rolo *et al.*, 2017).

El gen *mecA* es el encargado de codificar una proteína de unión a la penicilina [PBP] de clase B, llamada PBP2A, la cual presenta un dominio C-terminal que cumple una función de transpeptidación y un dominio N-terminal sin ninguna función atribuida. La resistencia la proporciona el hecho de que esta PBP tiene una menor eficiencia de acilación por los antibióticos betalactámicos.

Este gen se transporta dentro de un elemento genético móvil cuyo nombre y sigla provienen del inglés “Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*” [SCC *mec*], el cual está delimitado por repeticiones directas e inversas. Estos casetes se encuentran en el cromosoma con el gen *orfX*, el cual codifica para una metiltransferasa ribosomal. Todos los casetes poseen un complejo de genes *mec*, que está compuesto por *mecA* (que codifica la PBP2a) y los genes *mecI* y *mecR*, cuyos productos regulan la expresión de la resistencia a meticilina (Aguayo-Reyes, *et al.*, 2018).

Dicho elemento genético móvil está compuesto por dos elementos centrales: el complejo *mec*, que contiene *mecA* y formas intactas y eliminadas de sus reguladores (*mecI*, *mecR1*); y el complejo *ccr*, compuesto por un casete de cromosomas recombinasas [*ccr*] involucrados en su movilidad (Miragaia, 2018).

La estructura genética del SCC *mec* presenta tres clases de complejos *mec*: A, B y C. La A con el complejo *mec* completo (*mecI*-*mecR1*-*mecA*), y las clases B y C que contienen genes reguladores de *mecA*, los cuales se interrumpen debido a la presencia de secuencias de inserción IS431Δ*mecR1*-*mecA* y ΨIS1272-Δ*mecR1*-*mecA*, respectivamente. La combinación de estos complejos ha hecho que actualmente se encuentren ocho tipos denominados de I

a VIII; los tipos I, IV, V, VI y VII codifican únicamente para la resistencia a antibióticos de tipo betalactámicos; los tipos II, III y VIII incluyen genes adicionales que le permiten la expresión de la resistencia a gran variedad de antibióticos (Luján, 2013) (Figura 8).

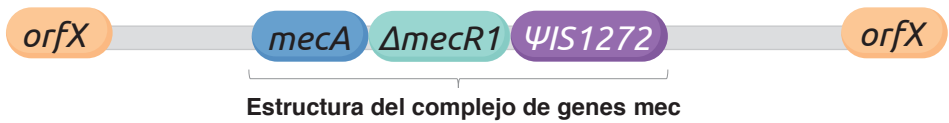


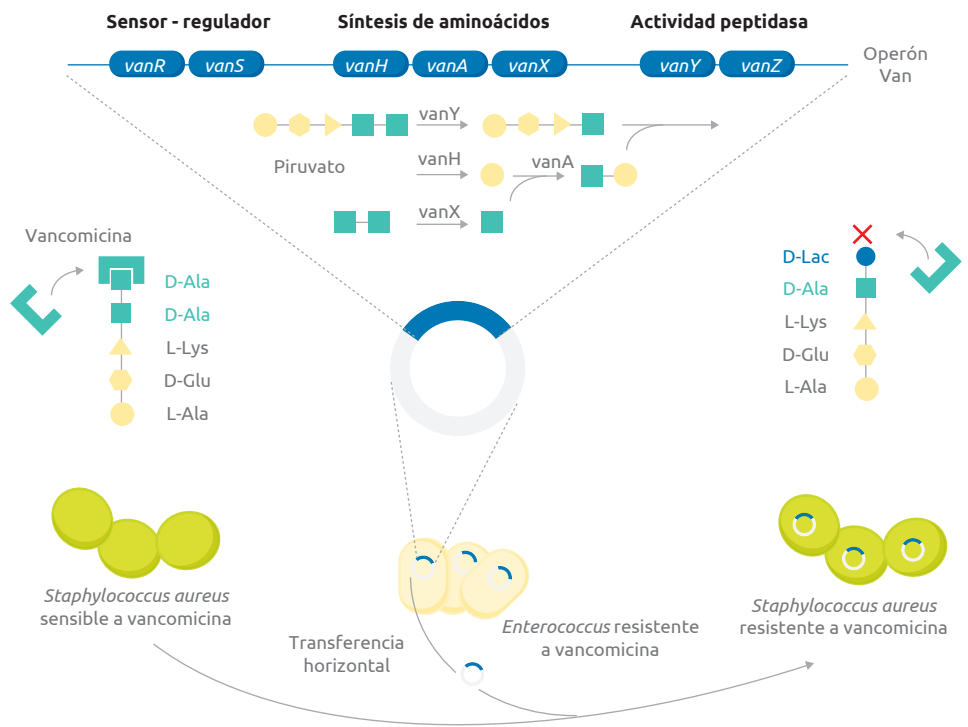
Figura 8. Estructura de SCCmec
Fuente: Elaboración propia

Este es un ejemplo de estructura de SCCmec con el transposón Tn554 en la región J2 (joining), responsable de la resistencia a diferentes antibióticos betalactámicos y no betalactámicos. También muestra los genes que regulan a *mecA* interrumpidos, debido a la presencia de secuencias de inserción IS431Δ*mecR1*-*mecA* y ΨIS1272-Δ*mecR1*-*mecA*, respectivamente.

Gen *Van*

La vancomicina es un glucopéptido que ha sido empleado para tratar infecciones por SARM. Sin embargo, en la década de los 80 se empezó a evidenciar resistencia no solo en *Staphylococcus* spp., sino también en *Enterococcus* spp. Su mecanismo está regulado por *vanA*, un operón que es codificado en el transposón Tn 1546, de un plásmido conjugativo presente en enterococos resistentes a vancomicina [VRE], mientras que *Staphylococcus aureus* [*S. aureus*] puede, durante el proceso de conjugación, adquirir plásmidos enterocócicos. La resistencia a la vancomicina en *S. aureus* se mantiene dentro de un plásmido enterocócico original o mediante una transposición de Tn 1546 del plásmido VRE en un plásmido residente de

estafilococos. La formación de la pared bacteriana de bacterias Gram positivas está dada por cadenas de glucanos NAG [N-acetilglucosamina] y NAM [N-ácido acetilmurámico], anclados entre sí mediante puentes de glicina y pentapéptidos por la unión de varios aminoácidos. La vancomicina interfiere con la síntesis de peptidoglicano en etapa tardía, pues forma enlaces de hidrógeno no covalentes con los penúltimos residuos de D-Ala-D-Ala de pentapéptidos recién sintetizados, lo que interrumpe el ensamblaje de peptidoglicano (Figura 9) (Ghahremani *et al.*, 2018; McGuinness *et al.*, 2017).



Nota: El operón vanA está compuesto por genes *vanA*, *vanH*, *vanX*, *vanS*, *vanR*, *vanY* y *vanZ*. Se controla mediante un sistema sensor-regulador conformado por dos componentes codificados por *vanS* y *vanR*, los cuales detectan la vancomicina y activan la transcripción del operón, respectivamente.

● **Figura 9.** Mecanismo molecular de la resistencia a la vancomicina de tipo vanA en *Staphylococcus aureus*. Fuente: elaboración propia con base en datos de McGuinness *et al.* (2017).

Gen *erm*

Los genes de la familia de la metilasa ribosómica [*erm*] codifican N-metiltransferasas y metilan el ARNr 23S para prevenir la unión de antibióticos. Este gen confiere resistencia a lincosamidas, macrólidos y estreptogramina B (Schroeder & Stephens, 2016).

La resistencia a los macrólidos está generada por la expresión de varios genes, dados por la modificación en la metilación del sitio diana ribosómico en el rRNA 23S, la protección del ribosoma a través de proteínas ABC-F, la salida activa a través de transportadores de la Superfamilia Facilitadora Mayor [MFS] y por la inactivación enzimática por fosfotransferasas o esterasas (Feßler *et al.*, 2018).

Materiales y métodos: investigaciones realizadas por GRIBAC

Las diferentes investigaciones adelantadas por el Grupo de investigación del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico –GRIBAC– fueron estudios de tipo descriptivo de corte transversal. A partir de aislamientos de cepas bacterianas de origen clínico y animal (Tabla 4), se planteó el objetivo de identificar genes que codifican para la resistencia a antibióticos. Para la ejecución de los diferentes proyectos, se inició con aislamientos bacterianos, seguidos de la extracción de ADN bacteriano. Para ello se utilizaron kits comerciales siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez establecidas las condiciones de pureza y calidad de la muestra, se procedió al montaje de la reacción en cadena de la Polimerasa [PCR] convencional, con previa estandarización de protocolos, con el fin de establecer la presencia de genes codificantes para la resistencia a antibióticos (Tabla 5).

● **Tabla 4.** Resumen de proyectos, población, cepas bacterianas y genes estudiados

Título Proyecto	Población estudiada	Cepas bacterianas	Genes
Tipificación molecular de genes de resistencia en bacilos gramnegativos asociados a infecciones en una Institución Prestadora de Servicios de Salud del departamento de Boyacá.	Muestras provenientes de diferentes servicios de un hospital de tercer nivel de atención del departamento de Boyacá.	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	BLEE: <i>bla</i> <i>TEM</i> , <i>bla</i> <i>SHV</i> , <i>bla</i> <i>CTXM-1</i> <i>AmpC</i>
Tipificación molecular de genes de resistencia en bacilos gramnegativos aislados de urocultivo en una Institución Prestadora de Servicios de Salud del departamento de Boyacá.	Muestras de orina provenientes de diferentes servicios de un hospital de tercer nivel de atención del departamento de Boyacá.	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. maltophilia</i>	BLEE: <i>bla</i> <i>TEM</i> , <i>bla</i> <i>SHV</i> , <i>bla</i> <i>CTXM-1</i> <i>AmpC</i>
Tipificación molecular de genes de resistencia en bacterias en una Institución Prestadora de Servicios de Salud.	Muestras provenientes de diferentes servicios de un hospital de tercer y cuarto nivel de atención del departamento de Boyacá.	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>K. oxytoca</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> [<i>E. aerogenes</i>] <i>Enterobacter cloacae</i> [<i>E. cloacae</i>] <i>C. freundii</i> <i>Citrobacter farmerii</i> [<i>C. farmerii</i>] <i>S. marcescens</i> <i>P. aeruginosa</i>	BLEE: <i>bla</i> <i>TEM</i> , <i>bla</i> <i>SHV</i> , <i>bla</i> <i>CTXM-1</i> <i>AmpC</i> : <i>MOX</i> , <i>CMY</i> , <i>DHA</i> , <i>ACC</i> , <i>MIR</i> y <i>FOX</i>
Detección de genes de resistencia a betalactámicos en aislamientos de <i>Staphylococcus</i> spp. asociados a mastitis bovina.	Muestra con mastitis provenientes de 61 fincas lecheras de Boyacá.	<i>Staphylococcus warneri</i> [<i>S. warneri</i>] <i>Staphylococcus xylosus</i> [<i>S. xylosus</i>] <i>Staphylococcus hominis</i> [<i>S. hominis</i>] <i>Staphylococcus epidermidis</i> [<i>S. epidermidis</i>] <i>Staphylococcus hyicus</i> [<i>S. hyicus</i>] <i>Staphylococcus chromogenes</i> [<i>S. chromogenes</i>] <i>Staphylococcus haemolyticus</i> [<i>S. haemolyticus</i>] <i>Staphylococcus simulans</i> [<i>S. simulans</i>] <i>Staphylococcus sciuri</i> [<i>S. sciuri</i>] <i>Staphylococcus lentus</i> [<i>S. lentus</i>] <i>Staphylococcus capitis</i> [<i>S. capitis</i>]	<i>mecA</i> <i>blaZ</i>

Fuente: elaboración propia

Tabla 5. Condiciones de la PCR

Gen	Secuencia 5' – 3'	Tamaño (pb)	Desnaturalización inicial	Ciclos	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>blaTEM</i>	5'-AAACGC TGG TGAA AGTA 3' 5'-AGCG ATCTGTC TAT 3'	239	94°C, 30 segundos	35	49°C, 1 minuto	72°C 1 minuto	72°C 10 minutos
<i>blaSHV</i>	5'-ATGCGT TATAT TCG CCTGTG 3' 5'-TGCTTTG TTA TTCGG GCCAA 3'	241	94°C, 30 segundos	35	56°C	72°C 1 minuto	72°C 10 minutos
<i>blaC-TX-M1</i>	5'-GACGAT GTCACTGG CTGAGC 3' 5'-AGCCG CCGACGCT AATACA 3'	499	94°C, 30 segundos	35	58°C	72°C 1 minuto	72°C 10 minutos
<i>Amp-C</i>	5'-ATCAAA AC TGGCA GCCG-3' 5'-GAGCCC GTT TTATGC ACCCA-3'	170	94°C, 30 segundos	35	56.9°C	72°C 1 minuto	
<i>blaZ</i>	5'-ACTTCA ACACCTGC TG CTTTC-3' 5'-TGACCAC TTT TATCAG CAACC-3'	639	94°C 30 segundos	35	55°C 30 segundos	72°C 30 segundos	72°C 5 minutos
<i>mecA</i>	5'-AAAATC GATGG TAAAGG TTGGC -3' 5' AGTTCTG CAGT ACCGGA TTTGC -3'	356	94°C 30 segundos	30	55°C 30 segundos	72°C 1 minuto	72°C 5 minutos

DN: desnaturalización inicial; CS: ciclos; Alin.: alineamiento;
Ext.: extensión; EF: extensión final

Fuente: Adaptado de Velandia *et al.* (2016),
Soares *et al.*, (2012) y Lee (2006).

Resultados

Los resultados obtenidos en relación con genes de resistencia en Gram negativos muestran una estrecha relación con el fenotipo de resistencia tipo BLEE. Se obtuvo un predominio del gen *TEM*, el cual confiere resistencia a ampicilina, penicilina y cefalosporinas de primera generación. Seguido aparece el predominio del gen *CTXM* que confiere resistencia a cefotaxima y a la ceftriaxona.

Respecto a la presencia del gen *SHV*, este se asocia con la resistencia a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera generación. De su parte, el gen *AmpC* es de naturaleza inducible y puede hidrolizar cefamicinas, oximino cefalosporinas, monobactámicos y aminopenicilinas combinadas con inhibidores de betalactamasas (Figura 10).

La presencia de los cuatro tipos de estos genes es alarmante, ya que confirma que son cepas multirresistentes de interés en salud pública al presentarse en el 25 % de los aislamientos. No obstante, la correcta identificación de dichos genes permite ofrecer un tratamiento oportuno y efectivo a los pacientes que cursan infecciones de origen bacteriano, ya que las bacterias pueden presentar falsas sensibilidades. La identificación de genes mediante técnicas moleculares es considerada la prueba de oro, pues su detección ayuda a un tratamiento más rápido y efectivo, ya que disminuye morbilidad y mortalidades en los centros hospitalarios. Sin embargo, las técnicas moleculares son complementarias, ya que las pruebas genotípicas permiten definir si los microorganismos presentan el gen, aunque no siempre esté activo el mecanismo.

Por otro lado, una vez analizados los aislamientos de los dos centros hospitalarios, se observó que había una presencia alta de cepas del servicio de urgencias y consulta externa, por lo que se debería restringir el uso de antibióticos betalactámicos de amplio espectro e implementar medidas rigurosas de higiene para el control de las infecciones y para la prevención y control de la diseminación de microorganismos productores de betalactamasas. A su vez, estos servicios se encuentran dentro de los de mayor demanda, lo cual sugiere una grave problemática debido a que el mayor número de muestras aisladas son de pacientes ambulatorios, lo que demuestra la existencia de patógenos multirresistentes en la comunidad, por lo que se presume un uso indiscriminado de antibióticos en este medio.

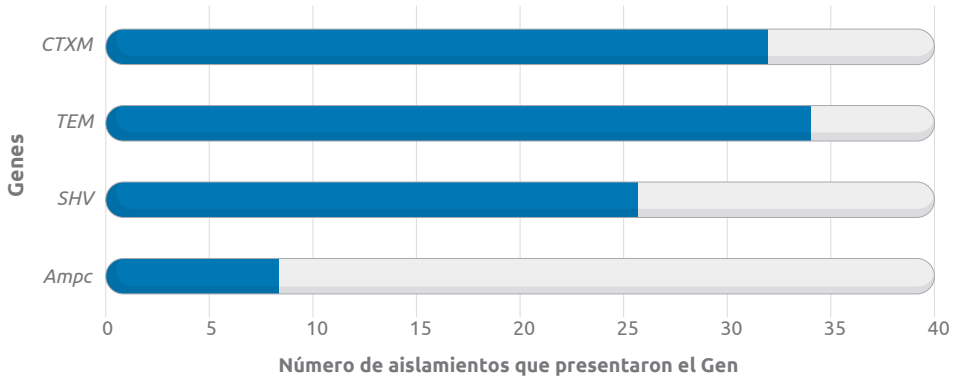


Figura 10. Genes de resistencia identificados en bacterias Gram negativas aisladas a partir de muestras clínicas
Fuente: elaboración propia

En lo relacionado con la detección de genes de resistencia en cepas Gram positivas, estos se identificaron en muestras de origen animal (mastitis) de donde se aislaron diferentes especies de *Staphylococcus* spp. Entre ellas se encuentran especies de *S. aureus*, *S. lentus*, *S. warneri* y *S. epidermidis* (n=87). De estas, el 83,9 % (73 aislamientos) presentaron el gen *blaZ* y el 5,7 % (5 aislamientos) el *mecA* (Figura 11). Las demás no presentaron ninguno de los dos genes.



Figura 11. Genes de resistencia identificados en bacterias Gram positivas de origen animal
Fuente: elaboración propia

Discusión

Los bacilos Gram negativos son una amenaza en los centros hospitalarios por tener circulación clonal con cepas de este tipo de genes, entre los que predomina el gen *TEM*. Esto es similar a lo reportado por Shaoo *et al.* (2019) en su estudio, en el que a partir de aislados clínicos predominaron los genes *TEM* y *CTXM*. De igual forma, en la ciudad de Ghana se detectó el gen *TEM* en un 48,1 %, como el de mayor detección en los aislados clínicos (Oduro *et al.*, 2016). No obstante, la prevalencia de los genes varía de acuerdo con la distribución geográfica.

Otras investigaciones han reportado presencia de genes que codifican para antibióticos betalactámicos en los que han sobresalido cepas productoras de *AmpC*, como *bla* *CTX-M-2* y *bla* *SHV-129* (Neto *et al.*, 2020). En Egipto identificaron aislados con multirresistencia en los que se detectaron las variantes *TEM1*, *SHV1*, *SHV11*, *SHV12* y *SHV31*. En México el predominio ha sido de variantes alélicas de *AmpC* como *CMY*, aunque este último es la betalactamasa de tipo AmpC más frecuente en enterobacterias como *E. coli*, reportada en países como España y Japón (Merida *et al.*, 2020). Para el año 2017, en Estados Unidos evaluaron diferentes grupos de genes entre los cuales predominaron el *CTXM* y *SHV*, resultados que difieren de lo obtenido en los datos analizados (Castanheira *et al.*, 2019).

Las infecciones dentro del entorno hospitalario son una de las principales problemáticas a nivel mundial, ya que la mortalidad por su causa es de alrededor del 30 %. Esto está directamente relacionado con pacientes inmunocomprometidos o con comorbilidades, que deben prolongar su tiempo de hospitalización, lo que genera mayores costos para el sistema de salud (Gómez y Sánchez, 2018).

La resistencia a betalactámicos está mediada por el gen *blaZ* que codifica la producción de penicilinasas (betalactamasas) que hidrolizan el anillo betalactámico de la penicilina. Los resultados reportados en nuestros estudios no presentan coincidencia, según lo encontrado fenotípicamente, al detectar betalactamasas con la prueba de Cefinasa, pues solo se encontraron 15 (n=67) aislamientos positivos. Genotípicamente, fue más detectable esta resistencia, con un 83,9 %, similar a lo reportado por otros autores como Michael Zschöck, quien en un estudio realizado en Venezuela reportó resistencia a betalactámicos en un 84,91 % (Castellano-González *et al.*, 2012).

La resistencia a la meticilina (oxacilina, meticilina, cloxacilina, nafcilina) en cepas *Staphylococcus* spp. de origen animal se debe a que las bacterias adquieren un gen codificante para la producción de una proteína fijadora de penicilina [PBP] de baja afinidad por los betalactámicos, lo que impide la acción del antibiótico. Las PBP2a o PBP2', de 78 kDa, son codificadas por el gen *mecA*, cuya expresión fenotípica de la resistencia es compleja y se puede afectar por diferentes factores, como presencia de secuencias cromosómicas reguladoras, osmolaridad, pH, temperatura, y de otros genes cromosómicos no relacionados.

Al respecto, es posible la diferenciación de dos tipos de cepas de SARM o de *Staphylococcus* coagulasa negativos resistentes a la meticilina: el primer grupo tiene expresión de resistencia homogénea y el segundo grupo tiene resistencia heterogénea. Las cepas del primer grupo, también conocidas como de alto nivel a la oxacilina, están presentes en la mayor parte de la población (Jiménez *et al.*, 2020).

Adicionalmente, se detectaron aislamientos que expresaron el gen *mecA*. Este resultado concuerda con lo obtenido en el antibiograma, pues los mismos aislamientos con resistencia a la oxacilina y la prueba positiva al cefoxitin presentaron

el gen. El bajo porcentaje de detección de este gen no se relaciona con los resultados de estudios nacionales que reportan prevalencia de 27 % en regiones colombianas, especialmente en leche bovina. Así mismo, se evidenció en los reportes de la literatura que el fenotipo de resistencia a la meticilina (oxacilina) es mucho más frecuente entre las diferentes especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa que en *S. aureus* (Jiménez *et al.*, 2020).

Conclusiones

Es necesario contar con procedimientos bioquímicos y microbiológicos estandarizados que permitan detectar específicamente las cepas multirresistentes, y hacer uso de las herramientas que ofrece la epidemiología molecular para detectar clones y otras características genéticas de la población bacteriana, pues esta es parte crucial de la política de control de la vigilancia antibiótica. Así lo orienta la Organización Mundial de la Salud [OMS], justificada en que la identificación facilita la supervisión del comportamiento y el control de resistencia, particularmente ante el empleo o consumo de un antibiótico específico que genera resistencia cruzada hacia otros antibióticos del mismo grupo o clase o con el mismo mecanismo de acción o incluso a compuestos de familias diferentes.

En los aislamientos de *Staphylococcus* spp. evaluados se encontró la presencia del gen *blaZ*, resultado que no es fenotípicamente comparable con la detección de betalactamasas al usar la prueba de Cefinasa, pues no en todos los aislamientos se tuvo amplificación del gen, como en el estudio realizado en muestras de leche con mastitis bovina. Esto podría significar que la sensibilidad de las técnicas microbiológicas, en comparación con las técnicas moleculares, no es la misma en este caso. Por eso, se sugiere

combinar el uso de diferentes métodos para lograr un diagnóstico seguro.

La importancia epidemiológica de la presencia de estas cepas en productos como la leche no solo es relevante para los animales, sino que también es de interés en el ámbito de salud pública, debido a la posibilidad de diseminación en humanos. Eso porque la multirresistencia de estas cepas provoca dificultades en el tratamiento y complica la resolución de las infecciones.

En cuanto al gen *mecA*, la incidencia registrada en estos estudios es baja, pues solo se presentó en cinco aislamientos de especies de *Staphylococcus* spp. Con ello se corrobora la alta sensibilidad a antibióticos presente en los agentes etiológicos de la mastitis bovina en Boyacá.

Ahora, el conocimiento del perfil de susceptibilidad de los estafilococos y la detección de genes de resistencia permitirían un manejo efectivo de los antibióticos para controlar las infecciones de la glándula mamaria.

Por otro lado, la multirresistencia en bacterias Gram negativas es un importante desafío clínico y de salud pública. El principal mecanismo de resistencia está relacionado con la producción de enzimas que hidrolizan los antibióticos betalactámicos, como las betalactamasas de espectro extendido, y tienen una resistencia cruzada a muchas otras clases de antibióticos, lo que limita las opciones terapéuticas.

El desarrollo de herramientas de biología molecular para el diagnóstico de cepas resistentes permite monitorear los cambios epidemiológicos, la circulación clonal y determinar el impacto socioeconómico. De acuerdo con esto, es necesario generar medidas de detección y vigilancia junto a

programas estrictos de prevención y control de infecciones y programas de administración de antimicrobianos.

Consideraciones éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que en este capítulo del libro no se realizaron experimentos con animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que los datos tuvieron un manejo ético y confidencial de la información según las normas constitucionales y legales sobre protección de datos personales (Ley habeas data).

Todos los datos analizados de los diferentes proyectos fueron revisados y avalados por el Comité de Bioética Institucional de la Universidad de Boyacá.

- Aguayo-Reyes, A., Quezada-Aguiluz, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo-Capurro, A., Bello-Toledo, H., Domínguez, M. y González-Rocha, G. (2018). Bases moleculares de la resistencia a metilicina en *Staphylococcus aureus*. *Revista Chilena de Infectología*, 35(1), 7-14. <https://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000100007>.
- Aruhomukama, D., Najjuka, C. F., Kajumbula, H., Okee, M., Mboowa, G., Sserwadda, I., Mayanja, R., & Kateete, D. P. (2019). ^{bla}VIM-and ^{bla}OXA-mediated carbapenem resistance among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the Mulago hospital intensive care unit in Kampala, Uganda. *BMC infectious diseases*, 19(1), 1-8. <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-4510-5>
- Bello, A., & Dingle, T. (2018). What's That Resistance Mechanism? Understanding Genetic Determinants of Gram-Negative Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Newsletter* 40(20), 165–74. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2018.10.001>
- Bonnin, R. A., Jousset, A. B., Emeraud, C., Oueslati, S., Dortet, L., & Naas, T. (2020). Genetic diversity, biochemical properties and detection methods of minor acquired carbapenemases in Enterobacterales. *Frontiers in Medicine*, 7, 1061. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.616490>
- Castanheira, M., Doyle, T., Mendes, R., & Sader, H. (2019). Comparative Activities of Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam against Enterobacteriaceae Isolates Producing Extended-Spectrum -Lactamases from U.S. Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63(7). <https://doi.org/10.1128/AAC.00160-19>
- Castellano-González, M., Perozo Mena, A., Parra, A. M., Ginestre Pérez, M. y Rincón Villalobos, G. (2012). Genotipos de resistencia antimicrobiana y su expresión fenotípica en cepas de *Staphylococcus aureus*. *Kasmera*, 40(2), 146-159. <http://ve.scielo.org/pdf/km/v40n2/art05.pdf>
- Chevet, K., Guyot, K., Mellon, G., Vidal, B., Couzigou, C., Misset, B., ... & Nguyen Van, J. C. (2012). Détection phénotypique d'une carbapénémase associée à une bêta-lactamase à spectre élargi chez *Klebsiella pneumoniae*. *Médecine et maladies infectieuses*, 42(1), 33. https://www.academia.edu/19890910/_Phenotypic_detection_of_carbapenemase_associated_with_extended_spectrum_beta_lactamase_in_Klebsiella_pneumoniae

- Dalmolin, T. V., Martins, A. F., Zavascki, A. P., de Lima-Morales, D., Barth, A. L. (2018). Acquisition of the Mcr-1 Gene by a High-Risk Clone of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 90(2), 132–33. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.016>
- Dhara, L., & Anusri, T. (2014). Genetic and Structural Insights into Plasmid-Mediated Extended-Spectrum β -Lactamase Activity of CTX-M and SHV Variants among Pathogenic Enterobacteriaceae Infecting Indian Patients. *International Journal of Antimicrobial Agents* 43(6), 518–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.03.002>
- Elmowalid, G. A., Ahmad, A. A. M., Hassan, M. N., Abd El-Aziz, N. K., Abdelwahab, A. M., & Elwan, S. I. (2018). Molecular detection of new SHV β -lactamase variants in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Egypt. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 60, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.09.013>
- Endimiani, A., Ramette, A., Rhoads, D., & Jacobs, M. (2020). The Evolving Role of the Clinical Microbiology Laboratory in Identifying Resistance in Gram-Negative Bacteria: An Update. *Infectious Disease Clinics of North America* 34(4), 659–76. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2020.08.001>
- Estepa, V., Rojo-Bezares, B., Azcona-Gutiérrez, J. M., Olarte, I., Torres, C. y Sáenz, Y. (2017). Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital español. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.014>
- Etemadi, S., Ebrahimzadeh, H., & Ghotaslou, R. (2020). AmpC β -Lactamase among Enterobacteriaceae: A New Insight. *Gene Reports* 19, 1–20.
- Fallah, F., Azimi, T., Azimi, L., Karimi, A., Rahbar, M., Shirdoust, M., Sedighi, I., Sadeghi, A. S., & Armin, S. (2020). Evaluating the antimicrobial resistance and frequency of AmpC β -lactamases blaCMY-2 gene in Gram-negative bacteria isolates collected from selected hospitals of Iran: a multicenter retrospective study. *Gene Reports*, 21, 100868. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100868>

- Fast, W., & Sutton, L. D. (2013). Metallo- β -lactamase: inhibitors and reporter substrates. *Biochim Biophys Acta*, 1834(8), 1648-59. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.04.024>
- Feßler, A., Wang, Y., Wu, C., & Schwarz, S. (2018). Mobile Macrolide Resistance Genes in Staphylococci. *Plasmid* 99, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.05.001>
- Ghahremani, M., Jazani, N., & Sharifi, Y. (2018). Emergence of Vancomycin-Intermediate and -Resistant Staphylococcus Aureus among Methicillin-Resistant S. Aureus Isolated from Clinical Specimens in the Northwest of Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 14, 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.01.017>
- Gómez, J. y Sánchez, J. (2018). Perfil Microbiológico y Resistencia Bacteriana En Una Unidad de Cuidados Intensivos de Pereira, Colombia, 2015. *Revista Médicas UIS* 31(2), 9–15. <https://doi.org/10.18273/revmed.v31n2-2018001>
- Haghighatpanah, M., Nejad, A. S. M., Mojtahedi, A., Amirmozafari, N., & Zeighami, H. (2016). Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and plasmid-borne blaCTX-M and blaTEM genes among clinical strains of Escherichia coli isolated from patients in the north of Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 7, 110-113. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.08.005>
- Jiménez-Velásquez, S. D. C. J., Higuera, L. D. T., Arango, J. L. P., Bautista, J. L. R., Castro, F. E. G., & Burbano, R. E. P. (2020). Perfil de resistencia antimicrobiana en aislamientos de Staphylococcus spp. obtenidos de leche bovina en Colombia. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.05.004>
- Khan, A. U., Maryam, L., & Zarrilli, R. (2017). Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC microbiology*, 17(1), 1-12. <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-1012-8>
- Lee, J. H. (2006). Occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from cattle and chicken, and analyses of their mecA, mecR1 and mecI genes. *Veterinary Microbiology*, 114(1-2), 155-9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.024>

- Limbago, B. M., Rasheed, J. K., Anderson, K. F., Zhu, W., Kitchel, B., Watz, N., Munro, S., Gans, H., Banaei, N. & Kallen, A. J. (2011). IMP-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States. *Journal of clinical microbiology*, 49(12), 4239-4245. <https://doi.org/10.1128/JCM.05297-11>
- Luján, D. (2013). Staphylococcus Aureus Resistente a Meticilina Asociado a La Comunidad: Aspectos Epidemiológicos y Moleculares. *Anales de la Facultad de Medicina* 74(1), 57–62. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832013000100011
- McGuinness, W., Malachowa, N., & DeLeo, F. (2017). Vancomycin Resistance in Staphylococcus Aureus. *Yale Journal of Biology and Medicine* 90(2), 269–81. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5482303/>
- Melgarejo, N. L. (2022). Resistencia a colistina en enterobacterales. *Revista de Salud Pública del Paraguay*, 12(2): 48-61. <https://doi.org/10.18004/rspp.diciembre.48>
- Merida, J., De Colsa, A., Calderón, Y., & Aquino, A. (2020). Detection of CMY-Type Beta-Lactamases in *Escherichia Coli* Isolates from Paediatric Patients in a Tertiary Care Hospital in Mexico. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 9(1), 168. <https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-020-00840-4>
- Miragaia, M. (2018). Factors Contributing to the Evolution of Meca-Mediated β -Lactam Resistance in Staphylococci: Update and New Insights from Whole Genome Sequencing (WGS). *Frontiers in Microbiology* 9(NOV), 2723. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02723>
- Mobasser, G., Teh, C., Ooi, P., & Thong, K. (2019). The Emergence of Colistin-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Strains from Swine in Malaysia. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 17, 227–32. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213716518302595>
- Monge, M. (2013). Carbapenémicos: Tipos y Mecanismos de Resistencia Bacterianos. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica* 1(1): 1–7. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=47783>
- Neto, L. V. P., Oliveira, M. S., Orsi, T. D. A., do Prado, G. V. B., Martins, R. C. R., Leite, G. C., Marchi, A. P., de Lira, E. Farrel, M., Sánchez, E. Dantas de Maio, C., Boszczowski, I., Guimaraes,

- T., Figueredo, S. & Levin, A. S. (2020). Alternative drugs against multiresistant Gram-negative bacteria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 23, 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.07.025>
- Oduro-Mensah, D., Obeng-Nkrumah, N., Bonney, E. Y., Oduro-Mensah, E., Twum-Danso, K., Osei, Y. D., & Sackey, S. T. (2016). Genetic characterization of TEM-type ESBL-associated antibacterial resistance in Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Ghana. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 15(1), 1-9. <https://link.springer.com/article/10.1186/s12941-016-0144-2>
- Partridge, S., Kwong, S., Firth, N., & Jensen, S. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 31(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Pishtiwan, A., & Khadija, K. (2019). Prevalence of BlaTEM, BlaSHV, and BlaCTX-M Genes among ESBL-Producing Klebsiella Pneumoniae and Escherichia Coli Isolated from Thalassemia Patients in Erbil, Iraq. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 11(1), 2019041. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2019.041>
- Protonotariou, E., Poulou, A., Politi, L., Meletis, G., Chatzopoulou, F., Malousi, A., Metallidis, S., Tsakris, A., & Skoura, L. (2020). Clonal Outbreak Caused by VIM-4-Producing Proteus Mirabilis in a Greek Tertiary-Care Hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents* 56(2), 106060. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106060>
- Rodríguez, E. A., Aristizábal-Hoyos, A. M., Morales-Zapata, S., Arias, L., & Jiménez, J. N. (2020). High frequency of gram-negative bacilli harboring blaKPC-2 in the different stages of wastewater treatment plant: A successful mechanism of resistance to carbapenems outside the hospital settings. *Journal of Environmental Management*, 271, 111046. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111046>
- Rolo, J., Worning, P., Boye Nielsen, J., Sobral, R., Bowden, R., Bouchami, O., Damborg, P., Guardabassi, L., Perreten, V., Westh, H., Tomasz, A., de Lencastre, H. & Miragaia, M. (2017). Evidence for the evolutionary steps leading to mecA-mediated β -lactam resistance in staphylococci. *PLoS genetics*, 13(4), e1006674. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006674>

- Sahoo, S., Otta, S., Swain, B., & Kar, S. (2019). Detection and Genetic Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *J Lab Physicians* 11(3), 253-258. https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_31_19
- Saldanha Ribeiro, P.C, Souza Monteiro, A.S., García Marques, S.G., Gomes Monteiro, S., Monteiro-Neto, V., Melo Coqueiro, M. M., García Marques, A. C., Gomes Turri, R., Goncalves Santos, S., & Quaresma Bomfim, M. R. (2016). Phenotypic and molecular detection of the blaKPC gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. *BMC Infect Dis* 16(737). <https://doi.org/10.1186/s12879-016-2072-3>
- Schroeder, MR. y Stephens, DS. (2016). Resistencia a los macrólidos en *Streptococcus pneumoniae*. *Fronteras en microbiología celular y de infecciones*, 6, 98. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00098>
- Soares, L. C., Pereira, I. A., Pribul, B., Oliva, M. S., Coelho, S. M. O., Souza, M. M. S. (2012). Antimicrobial resistance and detection of mecA and blaZ genes in coagulase-negative Staphylococcus isolated from bovine mastitis. *Pesq. Vet. Bras.* 32(8), 692-696. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000800002>.
- Soliman, A. M., Zarad, H. O., Nariya, H., Shimamoto, T., & Shimamoto, T. (2020). Genetic analysis of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria isolated from a university teaching hospital in Egypt. *Infection, Genetics and Evolution*, 77, 104065. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104065>
- Son, S., Huang, R., Squire, C., & Leung, I. (2019). MCR-1: A Promising Target for Structure-Based Design of Inhibitors to Tackle Polymyxin Resistance. *Drug Discovery Today* 24(1), 206–16. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.004>
- Srinivas, P., & Rivard, K. (2017). Polymyxin Resistance in Gram-Negative Pathogens. *Current Infectious Disease Reports* 19(11), 1–9. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11908-017-0596-3> .
- Taggar G, Attiq Rheman, M., Boerlin, P., Diarra, MS. (2020). Molecular Epidemiology of Carbapenemases in Enterobacteriales from Humans, Animals, Food and the Environment. *Antibiotics (Basel)*, 9(10), 693. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100693>. PMID: 33066205; PMCID: PMC7602032.

- Tamma, P. D., Doi, Y., Bonomo, R. A., Johnson, J. K., Simner, P. J., & Antibacterial Resistance Leadership Group Tamma PD Doi Y Bonomo RA. (2019). A primer on AmpC β -lactamases: necessary knowledge for an increasingly multidrug-resistant world. *Clinical Infectious Diseases*, 69(8), 1446-1455. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz173>
- Togneri, A. M., Gómez, S. A., Podestá, L. B., Pérez, M. P., Faccone, D. F., Ríos, L. E., Gañete, M., Anchordoqui, M., Pasterán, F. y Corso, A. C. (2013). Diseminación de blaIMP-8 en enterobacterias aisladas en un hospital de Buenos Aires. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(2), 104-109. <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v45n2/v45n2a08.pdf>
- Torres, M., Castro, L., Prada, C., & López, D. (2018). Antibiotic Resistance: Origins, Evolution and Healthcare-Associated Infections. *Salud Uninorte. Barranquilla (Col.)* 34(2), 494-505. <http://dx.doi.org/10.14482/sun.34.2.615.32>
- Vargas, J. M., Mochi, M. M., Nuñez, J. M., Cáceres, M., Mochi, S., Del Campo Moreno, R., & Jure, M. A. (2019). Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae*. *Helicon*, 5(6), e01829. <https://doi.org/10.1016/j.helicon.2019.e01829>
- Velandia, D. P. L., Caycedo, M. I. T., Orduz, L. M. C., & Quiroga, C. F. P. (2016). Determinación de genes que codifican la resistencia de betalactamasas de espectro extendido en bacilos Gram negativos aislados de urocultivos. *Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá*, 3(2), 107-126. <https://revistasdigitales.uniboyaca.edu.co/index.php/rs/article/view/182>
- Villa, J., Arana, D. M., Viedma, E., Perez-Montarelo, D., & Chaves, F. (2017). Characterization of mobile genetic elements carrying VIM-1 and KPC-2 carbapenemases in *Citrobacter freundii* isolates in Madrid. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(6), 340-345. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.07.001>
- Yamakawa, H., Kosai, K., Akamatsu, N., Matsuda, J., Kaku, N., Uno, N., Morinaga, Y., Hasegawa, H., Tsubouchi, T., Kanejo, Y., Miyazaki, T., Izumikawa, K., Mukae, H., & Yanagihara, K. (2019). Molecular and epidemiological analysis of IMP-1 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 25(4), 240-246. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.11.012>

Yasir, M., Farman, M., Shah, M. W., Jiman-Fatani, A. A., Othman, N. A., Almasaudi, S. B., Alawi, M., Shakil, S., Al-Abdullah., Ismaeel, N., & Azhar, E. I. (2020). Genomic and antimicrobial resistance genes diversity in multidrug-resistant CTX-M-positive isolates of *Escherichia coli* at a health care facility in Jeddah. *Journal of Infection and Public Health*, 13(1), 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.011>