



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**Concordancia de la carga de genes de resistencia a antibióticos
(*bla*CTX-M-15 y *flo*R) en muestras de heces de madres y sus niños menores
de 2 años**

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Autores

Angela Melissa Faustino Oropeza

Daniela Rabanal Pazzaglia

Asesor

Dra. Monica Jehnny Pajuelo Travezaño

Co-Asesor

Mg. Maryhory Fiorella Vargas Reyes

Lima, Perú

2024

Jurado calificador

Presidente: Dra. Dora Jesus Maurtua Torres

Vocal: Dra. Maritza Mercedes Calderon Sanchez

Secretario: Mg. Gaby Espinoza Cordova



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

Concordancia de la carga de genes de resistencia a antibióticos
(*blaCTX-M-15* y *blaR1*) en muestras de heces de madres y sus niños menores
de 2 años

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Autores

Angela Melissa Fanstino Oropeza
Daniela Rahanal Pazzaglia

Asesor

Dra. Monica Johany Pajuelo Travezado

Co-Asesor

Mg. Maryhory Fiorella Vargas Reyes

Lima, Perú

2024

Informe estándar
Informe en inglés no disponible Más información

14% Similitud estándar Filtros

3 Exclusiones

Fuentes

Mostrar las fuentes solapadas

1 Internet
repositorio.upch.edu.pe 5%
66 bloques de texto 738 palabra que coinciden

2 Trabajos del estudiante
Universidad Nacional de San Cristóbal de Huaman... 1%
7 bloques de texto 207 palabra que coinciden

3 Internet
hdl.handle.net 1%
17 bloques de texto 148 palabra que coinciden

4 Internet
www.researchgate.net <1%
6 bloques de texto 51 palabra que coinciden

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro profundo agradecimiento a nuestras asesoras, Dra. Mónica Pajuelo y MSc. Maryhory Vargas, cuya orientación experta y apoyo incondicional fueron fundamentales para el desarrollo y éxito de esta investigación. Sus conocimientos, valiosas sugerencias y dedicación constante fueron una fuente invaluable de inspiración y aprendizaje a lo largo de este proceso.

Asimismo, agradecemos al equipo del laboratorio de investigación "Microbiología Molecular" que colaboró en la parte experimental de esta tesis; especialmente a cada miembro por su paciencia, apoyo y disposición para compartir conocimientos, recursos y habilidades técnicas en todo momento.

Agradecemos a los grupos de investigación de la Dra. Maritza Calderón, de la Dra. Patricia Sheen y del Dr. Daniel Guerra por el apoyo en el préstamo de equipos durante la parte experimental de nuestra investigación.

Expresamos nuestro aprecio al Dr. Hugo García por el financiamiento parcial del Training Grant D43 Fogarty International Center, National Institutes of Health (D43TW001140).

A nuestros familiares, queremos expresarles nuestro más sincero agradecimiento por su constante apoyo y aliento a lo largo de este viaje académico. Sus palabras de ánimo, comprensión y paciencia fueron fundamentales para mantenernos motivadas durante los momentos desafiantes. Gracias por estar a nuestro lado, por comprender nuestras ausencias y por celebrar nuestros logros con tanto entusiasmo. Este logro no solo es nuestro, sino también de ustedes.

Índice

1.	INTRODUCCIÓN.....	3
1.1.	Resistencia antimicrobiana	3
1.2.	Transmisión vertical de resistencia antimicrobiana.....	4
1.3.	Transmisión horizontal de resistencia antimicrobiana.....	5
1.4.	Uso de genes de resistencia como marcadores de RAM.....	7
1.4.1.	<i>bla</i> CTX-M-15.....	7
1.4.2.	<i>floR</i>	9
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACIÓN	11
3.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	13
4.	HIPÓTESIS.....	13
5.	OBJETIVO GENERAL.....	13
6.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
7.	METODOLOGÍA.....	14
7.1.	Diseño.....	14
7.2.	Población de estudio.....	14
7.3.	Colección de datos y muestras en el estudio madre.....	16
7.4.	Identificación y cuantificación de los genes en las muestras de heces...16	
7.4.1.	Extracción de ADN.....	16
7.4.2.	Cuantificación por espectrofotometría UV-visible.....	16
7.4.3.	PCR - CRISPR/Cas12a.....	17
7.5.	Operacionalización de variables.....	20
7.6.	Tamaño de muestra.....	21
7.7.	Análisis estadístico.....	21
7.8.	Consideraciones éticas.....	23
8.	RESULTADOS.....	24
8.1.	Descripción de la población	24
8.2.	Extracción de ADN.....	25
8.3.	Ensayos preliminares	25
8.4.	Prevalencia de los genes estudiados en las muestras de heces.....	27
8.5.	Concordancia de los genes estudiados en los pares madre-bebé.....	30

8.6.	Características de los bebés y la concordancia del gen <i>blaCTX-M-15</i> en los pares madre-bebé.....	33
8.7.	Otras características relacionadas a la presencia de los genes estudiados en los bebés.....	34
8.7.1.	Consumo de antibióticos en los bebés.....	34
8.7.2.	Hábitos de higiene.....	36
8.7.3.	Crianza de animales (pollos).....	37
9.	DISCUSIÓN.....	38
9.1.	La prevalencia de <i>floR</i> fue mayor que la de <i>blaCTX-M-15</i>	38
9.2.	Concordancia de los genes estudiados en los pares madre-bebé.....	39
9.2.1.	Tipo de parto y concordancia de <i>blaCTX-M-15</i> en los pares madre-bebé.....	40
9.2.2.	Sexo del bebé y concordancia de <i>blaCTX-M-15</i> en los pares madre-bebé.....	40
9.2.3.	Edad del bebé, lactancia y concordancia de <i>blaCTX-M-15</i> en los <i>pares</i> madre-bebé.....	41
9.2.4.	Edad del bebé, alimentación complementaria y concordancia de <i>blaCTX-M-15</i> en los <i>pares</i> madre-bebé.....	42
9.3.	Presencia simultánea de ambos genes.....	42
9.4.	Variabilidad de la presencia de los genes estudiados en las muestras de bebés.....	43
9.5.	Otras características relacionadas a la presencia de los genes estudiados en los bebés.....	44
9.5.1.	Consumo de antibióticos en los bebés.....	44
9.5.2.	Hábitos de higiene.....	45
9.5.3.	Crianza de animales (pollos).....	46
10.	CONCLUSIONES.....	47
11.	FORTALEZAS.....	48
12.	LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES.....	49
13.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana es un problema que se ha evidenciado con mayor fuerza en los últimos años y a nivel mundial. El presente estudio buscó determinar si existe concordancia entre la presencia de genes de resistencia a antibióticos (*blaCTX-M-15* y *floR*) en muestras pareadas de heces de madres y de sus bebés menores de 2 años en zonas urbano-marginal en el distrito de Villa El Salvador, Lima-Perú. Se extrajo el material genético seguido de la verificación de la calidad del ADN por medio de espectrofotometría ultravioleta. Se realizó la amplificación de los genes de resistencia *blaCTX-M-15* y *floR* mediante PCR, seguido de la detección del amplicón por CRISPR/Cas12a. En madres y niños, se reporta mayor prevalencia para el gen *floR* (54,55%), el cual produce resistencia al grupo de antibióticos anfenícolos, cuyo uso es principalmente en animales. En cambio, *blaCTX-M-15*, que produce resistencia a antibióticos de uso humano, reportó menor prevalencia (31,31%). Asimismo, se determinó una concordancia ligeramente positiva, pero significativa entre la presencia del gen *blaCTX-M-15* en las muestras de madres y sus hijos, y no se encontró concordancia para el gen *floR*; sin embargo, no se descarta la hipótesis de relacionar la presencia del gen a otros factores ambientales.

Palabras clave: Resistencia antimicrobiana, genes de resistencia, *blaCTX-M-15*, *floR*, CRISPR/Cas12a, concordancia, madre, bebé.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a problem that has become more evident in recent years and worldwide. The present study sought to determine if there is concordance between the presence of antibiotic resistance genes (*blaCTX-M-15* and *floR*) in paired stool samples from mothers and their infants under 2 years of age in urban-marginal areas in the district of Villa El Salvador, Lima-Peru. Genetic material was extracted followed by verification of DNA quality by ultraviolet spectrophotometry. Amplification of the resistance genes *blaCTX-M-15* and *floR* was performed by PCR, followed by detection of the amplicon by CRISPR/Cas12a. In mothers and children, a higher prevalence was reported for the *floR* gene (54.55%), which produces resistance to the amphenicol group of antibiotics, whose use is mainly in animals. In contrast, *blaCTX-M-15*, which produces resistance to antibiotics for human use, reported a lower prevalence (31.31%). Likewise, a slightly positive but significant concordance was found between the presence of the *blaCTX-M-15* gene in the samples of mothers and their children, and, and, no concordance was found for the *floR* gene; however, ; however, the hypothesis of associating the presence of the gene to other environmental factors is not ruled out.

Keywords: Antimicrobial resistance, resistance genes, *blaCTX-M-15*, *floR*, CRISPR/Cas12a, concordance, mother, baby.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana (RAM) es un problema que se ha evidenciado con mayor fuerza en los últimos años y a nivel mundial [1], manifestándose como una amenaza a la salud de las personas y ocasionando que los tratamientos contra distintas enfermedades no sean eficientes para combatirlas, provocando un mayor uso de los antibióticos de última línea. La RAM se produce cuando los microorganismos (bacterias, virus, hongos y parásitos) mutan o adquieren genes que les permiten sobrevivir a la acción del antimicrobiano [2]. Los mecanismos básicos de la RAM son modificación de la pared celular, inhibición de rutas metabólicas, entre otros [3]. Sin embargo, además de las mutaciones, el fenómeno de resistencia también puede expresarse entre bacterias mediante plásmidos, integrones, entre otros.

En un análisis realizado por Murray *et al.* [4], se investigó el impacto de las infecciones relacionadas con la RAM. El estudio utilizó un enfoque sistemático y un metaanálisis para estimar el número de muertes asociadas con la RAM en el año 2019. Los resultados revelaron que se estimaron aproximadamente 4.95 millones de muertes relacionadas con RAM en ese año, de las cuales 1.27 millones fueron directamente atribuibles a la resistencia antimicrobiana. Estas muertes situaron a la RAM como una de las diez principales causas de muerte a nivel mundial. Por ende, es necesario comprender los mecanismos de transmisión de la resistencia antimicrobiana en las bacterias.

El intestino aloja distintas bacterias como probióticos o patógenos, los cuales pueden representar o no un microbioma intestinal saludable y estable. Ante distintas situaciones, como es el consumo excesivo de antibióticos; el microbioma puede alterarse, convirtiéndose en un reservorio de bacterias que contengan genes de resistencia antimicrobiana (GRA) [5].

Múltiples investigaciones en Perú han descrito el desarrollo de RAM en niños e infantes. En el estudio de Murray *et al.* [6], compararon el perfil de resistencia de *Escherichia coli* de muestras de heces de humanos que estuvieron expuestos frente a diferentes niveles de contacto con carne de pollo (vendedores de pollo en mercados locales, adultos no vendedores y bebés de un estudio de cohorte en curso); y encontraron que los bebés tenían

perfiles de resistencia similares a los vendedores de pollo al demostrar resistencia a múltiples antibióticos. Incluso, los bebés presentaron tasas más altas de resistencia fenotípica a amoxicilina y trimetoprima/sulfametoxazol que los adultos, siendo los porcentajes de multidrogo resistencia 48.3%, 38.1% y 22.9% para bebés, vendedores, y no vendedores de pollo, respectivamente.

Asimismo, en el estudio de Alzamora *et al.* [7] se evaluó la resistencia antimicrobiana en niños sanos de 6 a 13 meses durante seis meses, observando un aumento gradual en la resistencia. Los mayores índices se encontraron para cotrimoxazol (49,1%), ampicilina (48,0%) y ácido nalidíxico (31,8%), con un 34% de los aislados mostrando resistencia a múltiples drogas. Las tasas de niños infectados con cepas multidrogo resistentes son cada vez más altas en diferentes partes del mundo. Calderón *et al.* [8], en Ecuador, demostraron que, de 405 aislamientos de *E. coli* recuperados de muestras fecales de niños, sólo el 30,1% fueron susceptibles a todos los antimicrobianos probados mientras que, aproximadamente, el 50% fueron resistentes a tres o más antimicrobianos. Esto sugiere que la RAM es un problema creciente que afecta en los primeros años de vida a nivel mundial mostrando resistencia a múltiples fármacos [9].

En una población vulnerable como los niños, los padres y cuidadores tienen la responsabilidad de proteger la microbiota de los bebés de bacterias portadoras de GRA, dado que su exposición podría tener graves consecuencias en la salud [2]. En general, se han identificado varias causas de la resistencia antimicrobiana, como el uso inadecuado/excesivo de antibióticos y el control deficiente de infecciones en hospitales y clínicas [10]. Específicamente en niños, el estudio de Lietzau *et al.* [11], que analizó muestras de heces de niños de 6 meses a 4 años, encontró una alta prevalencia de cepas de *E. coli* resistente a antibióticos comunes (ampicilina, doxiciclina y cotrimoxazol), relacionada con factores de riesgo. Destacaron que el contacto en el hogar es crucial para la colonización de *E. coli* resistente en la comunidad, facilitando tanto la transmisión vertical de madres a hijos y la transmisión horizontal entre bacterias.

1.2. Transmisión vertical de resistencia antimicrobiana

La transmisión vertical se refiere a la transferencia de bacterias resistentes o genes de resistencia de la madre al hijo, y es crucial debido a su impacto en el microbioma y la

salud del niño [12]. Actualmente, se evalúan diversos medios de esta transmisión, que incluyen el parto, la lactancia, la exposición a antibióticos y la higiene en el cuidado del bebé [13-15].

Durante el parto, se han encontrado especies similares de *Bacteroides* en madres e hijos, especialmente asociadas con el parto vaginal [16]. Dicho grupo de bacterias tienen efectos positivos para el bebé, sin embargo, se ha reportado la transmisión de bacterias resistentes a antibióticos de madre a recién nacido ($p < 0,001$). En mujeres embarazadas, la prevalencia de bacterias resistentes a los antibióticos fue del 23%, incluyendo BLEE (β -lactamasa de espectro extendido), SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina) y ERV (Enterococos resistentes a la Vancomicina) con un 16 %, 6 % y 1 % respectivamente. De manera similar, los recién nacidos mostraron una prevalencia de bacterias resistentes del 9,2 %, con BLEE y SARM a 7,6 % y 1,6 % respectivamente [17]. Esto sugiere que la colonización ocurre durante el embarazo después de la ruptura de la membrana amniótica [16]. De este modo, sería importante ejercer un control estricto en la prescripción de antibióticos a mujeres embarazadas y lactantes [18].

Los riesgos de las bacterias resistentes a antibióticos en niños son objeto de investigación intensiva debido a su capacidad para complicar el tratamiento de infecciones, lo que puede aumentar significativamente la morbilidad y la mortalidad en los pacientes pediátricos. Carvalho *et al.* [19], por ejemplo, analizaron muestras rectales para evaluar la prevalencia de β -lactamasas en madres y recién nacidos con sepsis neonatal, encontrando que la colonización materna con microbiota positiva para *blaCTX-M-15* o *blaNDM* se asoció con la sepsis neonatal. Los bebés portadores de cepas BLEE con presencia de genes *blaCTX-M-15* o *blaOXA-48* tenían mayor riesgo de sepsis neonatal que los no portadores.

1.3. Transmisión horizontal de resistencia antimicrobiana

La transmisión horizontal de genes explica la transmisión genética entre cepas y especies; y se da comúnmente en bacterias. Este mecanismo puede ocurrir de diferentes maneras como la conjugación, transformación y transducción; siendo el más relacionado con la resistencia antimicrobiana, la conjugación bacteriana. Por medio de esta, se puede transferir ADN entre bacterias a través de elementos genéticos móviles (plásmidos,

integrones y transposones), cuya replicación sucede independientemente de los cromosomas. La transferencia del plásmido sucede a partir del contacto físico entre la célula donante y la receptora, por medio del pili (protuberancia proteínica propia de la célula bacteriana) [20]. En la *figura 1*, se esquematiza el mecanismo.

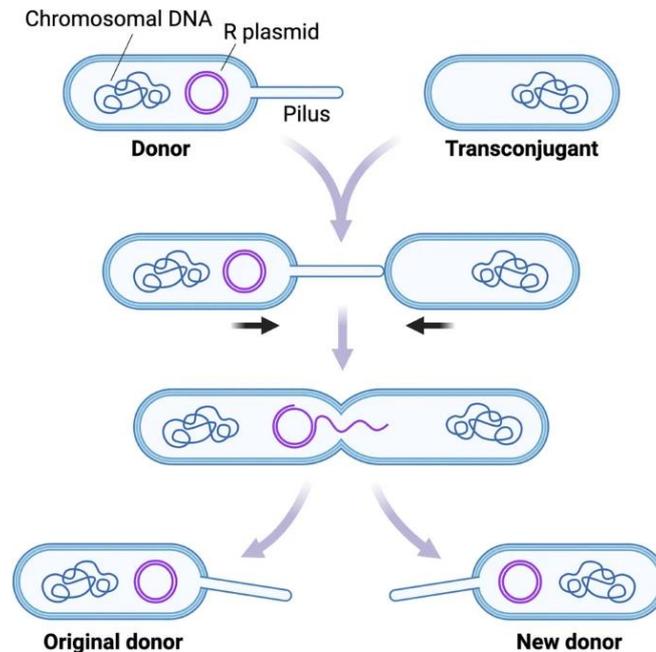


Figura 1. Conjugación bacteriana [21].

Una célula donante, que porta un plásmido R conjugativo (superior izquierda), extiende un pilus para contactar con una célula receptora compatible (superior derecha). Al entrar en contacto, el pilus se retrae, juntando las dos células permitiendo la transferencia de una de las cadenas de ADN plasmídico lineal (centro). Finalmente, ambas células construyen la segunda cadena para sus respectivas copias del plásmido R mediante circularización y síntesis de ADN. De este modo, ambas se convierten en células donantes (inferior) que promueven la propagación de la resistencia a los antibióticos.

Esto toma relevancia cuando las bacterias son sometidas a altas presiones selectivas, como la presencia de antibióticos, por lo que se ven en la necesidad de diversificar genomas para aumentar su aptitud y su probabilidad de supervivencia [20]. Por ejemplo, se ha reportado que, al exponer especies Gramnegativas a concentraciones inhibitorias mínimas de dos antibióticos (kanamicina y estreptomycin, o gentamicina y cloranfenicol) aumenta la conjugación entre ellas [22, 23]. No obstante, también se ha visto que existen otros factores estimulantes de la conjugación, como el estado fisiológico de las células y

la disponibilidad de energía [24]. Al ser un mecanismo aún no comprendido en su totalidad, se plantea que los antibióticos actúan como señales químicas que modulan la transferencia de ADN [20].

1.4. Uso de genes de resistencia antimicrobiana como marcadores de RAM

En general, el uso de marcadores genéticos permite asociar el gen a evaluar con alguna enfermedad o condición que se desee investigar [25]. En el contexto de la resistencia antibiótica, estos genes son objeto de análisis en diversas investigaciones para evaluar la extensión del problema y como marcadores de transmisión, incluso en situaciones donde no hay cultivos bacterianos disponibles.

1.4.1. *blaCTX-M-15*

La enzima betalactamasa *CTX-M-15* es predominante en la familia *CTX-M* y se categoriza como BLEE. Esta enzima deriva de *CTX-M-3*, con un cambio en su estructura (la posición 240 del aminoácido Asp a Gly) originando la enzima *CTX-M-15* [26]. La familia *CTX-M* es mayormente resistente a los antibióticos betalactámicos, principalmente hidrolizan a la cefotaxima. Asimismo, debido al cambio en su estructura, se ha observado que la *CTX-M-15* tiene una fuerte actividad sobre ceftazidima [27]. Las bacterias que presentan el gen de resistencia *blaCTX-M-15*, mediante la expresión de la enzima *CTX-M-15*, logran hidrolizar a las penicilinas, cefalosporinas de tercera generación y monobactamas [28].

Actualmente, *blaCTX-M-15* ha sido encontrado en distintos aislados tanto de muestras provenientes de animales como de humanos. Un estudio detectó *E. coli* portadora del gen *blaCTX-M-15* obtenido de ganado, aves de corral, cerdos, e incluso alimentos cárnicos como carne de pavo, lo que sugiere que estos son de origen animal [29, 30]. Otros aislados que fueron colectados de hospitales demuestran que la mayoría de bacterias eran resistentes a fluoroquinolonas o cefalosporinas de amplio espectro mediada principalmente por *CTX-M-15* [30].

Por su parte, el estudio de Brisse *et al.* [31] buscó probar si la distribución de los aislados productores de *CTX-M* y los aislados que no producen BLEE difería entre los principales grupos de *E. coli*. Por lo que, clasificaron 304 aislados seleccionados en los grupos A,

B1, B2 y D; y demostraron que el gen *blaCTX-M-15* fue el más prevalente a comparación de otros *blaCTX-M* y presentó alta frecuencia en cepas *E. coli*. (Figura 2)

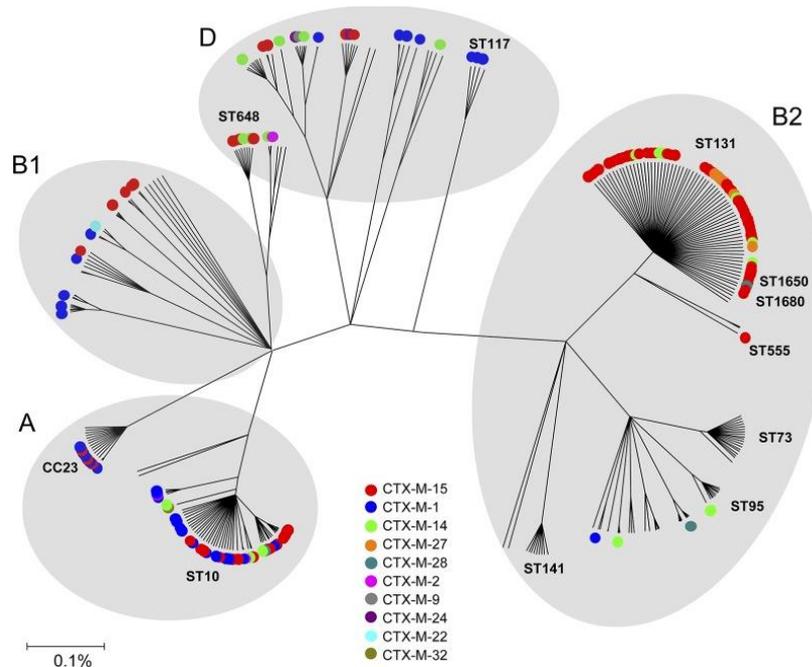


Figura 2. Distribución filogenética de las enzimas *CTX-M* en *E. coli* [31]

Los aislados productores de *CTX-M* se indican mediante círculos coloreados de acuerdo con el tipo de enzima *CTX-M*; siendo *CTX-M-15* la de mayor predominancia (color rojo).

La implementación de nuevas tecnologías de monitoreo mediante genes resistencia antimicrobiana proporciona un rastreo más eficaz [32]. Si bien existen pocas investigaciones sobre el uso de *blaCTX-M-15* como marcador genético, la investigación de Carvalho *et al.* [19] demostró que existe una relación entre el desarrollo de sepsis neonatal y la presencia de genes de resistencia en la microbiota intestinal de madres y sus bebés, utilizando el gen *blaCTX-M-15* como marcador para la presencia de BLEE.

De la misma manera, Ramadan *et. al* [33] observaron que, entre 198 aislados clínicos multirresistentes, 179 (90,4%) contenían al menos un gen *blaCTX-M*, de los cuales el 86,6% fueron positivos para *blaCTX-M-15*; y que la mayoría de los aislados positivos a dos genes *blaCTX-M* (*M-1* y *M-15*) se encontraban dentro de los grupos altamente resistentes fenotípicamente. En consecuencia, lograron asociar la presencia genotípica y fenotípica del gen *blaCTX-M-15*.

Todo ello, nos muestra la importancia de continuar estudiando la presencia de los tipos de *blaCTX-M*, en específico *blaCTX-M-15* como biomarcador, el cual se encuentra altamente distribuido. Asimismo, el desarrollo de un mayor monitoreo de este gen de

resistencia antimicrobiana a nivel de salud nos permitirá conocer mejor las rutas y causas de su transmisión [27].

1.4.2. *floR*

El florfenicol es un antibiótico análogo estructural del cloranfenicol, utilizado para el tratamiento de infecciones bacterianas (Grampositivas, Gramnegativas, e incluso parte de clamidia y rickettsia) en el ámbito veterinario. Las bacterias resistentes a cloranfenicol logran inactivarlo a través de una enzima que acetila los 3 grupos hidroxilos en su estructura; no obstante, la diferencia estructural del florfenicol evita esta inactivación, por lo que florfenicol resulta ser más efectivo [34]. Cabe destacar que el gen *floR* y sus análogos se han identificado principalmente en bacterias gramnegativas, mientras que los otros genes de resistencia al florfenicol se han detectado principalmente en bacterias grampositivas [35, 36]. Por otra parte, Wang *et al.* [36] demostró que el mecanismo desarrollado por el gen de resistencia *floR* (el cual confiere resistencia a florfenicol y cloranfenicol) en aislados de *E. coli* recolectados de mastitis bovina, sucede mediante el uso de una bomba de expulsión, la cual elimina las sustancias que reconoce como “tóxicas” hacia afuera de la célula; es decir, elimina el antibiótico.

Se han identificado siete genes de resistencia al florfenicol (*floR*, *fexA*, *fexB*, *pexA*, *cfr*, *oprA* y *estDL136*), siendo *floR* el más correlacionado a la resistencia al florfenicol que los otros genes [37, 38]. En el estudio de Li, P *et al.* [37] se analizó un total de 106 bacilos gramnegativos resistentes al florfenicol y demostraron que alrededor del 91,51% de las cepas mostraron resultados positivos para este gen; mientras que solo el 4,72 % fueron positivos para el gen *cfr*, y no se detectaron otros genes conocidos de resistencia al florfenicol como *fexA*, *fexB* y *oprA* [37]. Asimismo, Ying, Y. *et al.* aislaron cepas de la familia *Enterobacteriaceae* de muestras fecales anales obtenidas en granjas productoras de animales de alimentos y encontraron resultados positivos de genes de resistencia *floR* y *cfr*, siendo el 64,4% positivos para *floR*, mientras que *cfr* sólo se identificó en tres cepas de *Proteus* (1,0%) [38].

Por otra parte, el florfenicol es utilizado en premezclas de alimentos comerciales para el tratamiento de enfermedades entéricas y respiratorias en la crianza de aves de corral; sin embargo, se cree que su uso indiscriminado es uno de los factores principales para el

desarrollo y diseminación de la RAM [6, 39]. El estudio de Moawad *et al.* [40] que tuvo como objetivo describir la resistencia antimicrobiana de *E. coli* aislada de pavos sanos reportó que, de los genes asociados con la resistencia al cloranfenicol el 65,4 % fueron *floR*. En general, parte de la urgencia de investigar *floR* es su capacidad para convivir con otros GRA, ya que se ha observado que 34 cepas de *E. coli floR*-positivas fueron resistentes a más de siete medicamentos [37]. Las investigaciones mencionadas anteriormente demuestran que *floR* tiene alta incidencia en aves de corral; no obstante, *floR* también se ha detectado en el material genético de *E. coli* en bovinos y cerdos [41, 42].

Sin embargo, algunos estudios han demostrado la presencia de *floR* en humanos. En la investigación de Murray *et al.* [6] se reportó que, a pesar de que florfenicol no se usa en humanos, la resistencia a este antibiótico fue mayor en humanos asociados al comercio de pollos en mercados que en otro grupo de humanos estudiado; además que el gen *floR* se encontró tanto en colonias aisladas de animales y humanos. Por ende, se cree que la resistencia al florfenicol en humanos puede producirse a través de la colonización por cepas *floR*-positivas de origen animal o la conjugación plasmídica de cepas animales en comensales humanos, ambas facilitadas por la manipulación inadecuada de la carne de pollo, tanto por vendedores como por consumidores [6]. Asimismo, en la investigación de Miranda *et al.* [43], se encontró el gen *floR* en las muestras fecales de personas con enfermedad renal crónica (ERC) etapa 3, 4 y 5. Estos resultados evidencian la presencia de *floR* en humanos, a pesar de que florfenicol es de uso exclusivo veterinario y el cloranfenicol se usa de manera restringida en personas. Además, Lu *et al.* [44] investigaron *floR* en aislamientos de *K. pneumoniae* de muestras de pacientes en un hospital de China, encontrando que el 7.01% (23/328) de los aislamientos fueron positivos para *floR* de los cuales, el 95.65% mostraron valores altos de CIM (concentración mínima inhibitoria) para florfenicol. Por lo tanto, al ser uno de los genes más relacionados con la resistencia al florfenicol (antibiótico de uso exclusivo en animales), es posible el uso del gen *floR* como biomarcador; pudiendo rastrearse directamente hasta el uso de antibióticos en animales [6].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACIÓN

La principal consecuencia de que existan cada vez más cepas resistentes a antibióticos es la limitación a las terapias de primera línea, dejando en mayor uso a los de “último recurso” [6]. Por ello, es necesario investigar cuáles son las causas del incremento de la resistencia a antibióticos, especialmente en las primeras etapas de vida.

Es alarmante que, desde los primeros meses de vida, los bebés sean portadores de aquellos genes que los convierten en multidrogoresistentes. Existen algunos estudios realizados en niños menores de 2 años que muestran proporciones moderadas a elevadas de bacterias resistentes. Por ejemplo, Murray *et al.* [6] estudiaron la prevalencia de genes de resistencia en grupos de personas con diferente grado exposición a la venta de pollo en mercados (bebés de 0 a 2 años, adultos que no eran vendedores y vendedores de pollo) en el distrito de Villa el Salvador, Lima. Encontrando así que los aislados de *E. coli* de bebés presentaron altos niveles de resistencia a los antibióticos tetraciclina, trimetoprima/sulfametoxazol, amoxicilina, azitromicina, cloranfenicol, cefalotina, cefotaxima y gentamicina.

Las bacterias pueden transmitirse de madre a hijo, aunque la vía exacta y la magnitud de esa transferencia no está muy clara todavía. En la investigación de Carvalho *et al.* [19] se asoció la presencia de genes *blaCTX-M-15* o *blaNDM* en muestras de los niños cuyas madres portadoras tenían un lavado de manos ocasional, en comparación con aquellas que lo hacían de manera frecuente. De esta manera, se brinda evidencia a la posibilidad de transferencia de genes de resistencia desde la madre a su niño por mala higiene o la falta de salubridad en países de ingresos bajos y medianos. Sin embargo, se han sugerido otras fuentes para la propagación de estos genes de resistencia como el parto o lactancia, conllevando a una transmisión intrahogar, o alguna otra fuente común en el hogar como son los alimentos [13-15]. En efecto, en estas investigaciones, realizadas en países de África y el sur de Asia, se observan similitudes entre la microbiota intestinal de madres y bebés; y consideran alguna patología específica (por ejemplo, sepsis neonatal) [19]. Con justa razón, hace falta investigar la dinámica de transmisión de los genes de resistencia desde un enfoque intrahogar; relacionado entre las cuidadoras y sus bebés.

Por ello, determinar la concordancia en la presencia de genes específicos en muestras pareadas de heces de madres e hijos sería importante para investigar la transmisión intrahogar durante las primeras etapas de vida. Asimismo, se ha propuesto los genes *blaCTX-M-15* como potencial biomarcador de antibióticos de uso humano y *floR*, de antibióticos de uso animal. De esta manera, en este estudio se evalúa la presencia de los genes *blaCTX-M-15* y *floR* y la concordancia en muestras de heces de madres y sus hijos. Los hallazgos de este estudio ayudarán a plantear hipótesis sobre la posible transmisión madre-bebé, destacando la relevancia de biomarcadores compartidos en las muestras de ambos grupos.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe concordancia entre la presencia de genes de resistencia a antibióticos (*blaCTX-M-15* y *floR*) en las muestras de heces de madres y sus bebés menores de 2 años del distrito de Villa El Salvador, Lima-Perú entre febrero 2016 y mayo del 2019?

4. HIPÓTESIS

Existe una concordancia entre la presencia de los genes *blaCTX-M-15* y *floR* de resistencia en las muestras de heces de madres y sus bebés menores de 2 años.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe concordancia entre la presencia de genes de resistencia a antibióticos (*blaCTX-M-15* y *floR*) en las muestras de heces de madres y de sus bebés menores de 2 años en zonas urbano-marginal en el distrito de Villa El Salvador, Lima-Perú entre febrero 2016 y mayo del 2019.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Identificar la presencia de genes de resistencia (*blaCTX-M-15* y *floR*) en las muestras fecales de las madres y sus bebés
- b. Evaluar la concordancia de la presencia de los genes *blaCTX-M-15* y *floR* en las muestras fecales de las madres y sus bebés.
- c. Establecer las características de los bebés relacionadas a la concordancia de la presencia de los genes *blaCTX-M-15* y *floR* en las muestras fecales de las madres y sus bebés.

7. METODOLOGÍA

7.1. Diseño

El presente estudio observacional analizó parte de las muestras obtenidas de la investigación “La infección natural de norovirus y sapovirus en una cohorte de nacimiento en una comunidad periurbana del Perú” (Código SIDISI: 65178), a la cual se le denominará estudio madre. En el presente estudio, se seleccionaron muestras mensuales (recolectadas entre febrero de 2016 y mayo de 2019), de parejas madre-bebé provenientes del distrito de Villa El Salvador, durante 3 meses consecutivos. De esta manera, se escogió la muestra de cada bebé de acuerdo a la fecha de toma de muestra de la madre, de manera que sea la misma fecha de recolección para ambos. Por ende, se tuvo un total de 3 muestras por cada sujeto, una por mes. Cabe destacar que, las muestras se analizaron de forma aleatoria y ciega.

Para determinar la presencia de los genes de resistencia a antibióticos en las muestras, se planteó extraer el material genético seguido de la verificación de la calidad del ADN obtenido por medio de espectrofotometría ultravioleta. Se realizó la amplificación de los genes de resistencia *blaCTX-M-15* y *floR* mediante PCR, seguido de la detección del amplicón por CRISPR/Cas12a. Finalmente, se evaluó la concordancia mediante métodos estadísticos como el Índice de Kappa y Coeficiente de correlación de Spearman, los cuales serán detallados en el punto *7.7 Análisis estadístico*.

7.2. Población de estudio

La población del estudio madre consta de parejas de madres y sus hijos menores de 2 años procedentes de zonas recientemente pobladas de Villa El Salvador. Los criterios de inclusión y exclusión para la cohorte se detallan a continuación:

7.2.1. Criterios de inclusión de los bebés:

- Haber nacido dentro de los 28 días al reclutamiento
- Vivir en el área de estudio
- Cuyo padre / tutor legal haya dado su consentimiento informado

7.2.2. Criterios de exclusión de los bebés:

- Presencia de una enfermedad grave que requiere hospitalización o cualquier otra condición que sea grave o crónica informada o documentada, incluyendo, enfermedad renal, enfermedad hepática, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad maligna, tuberculosis.
- Enfermedades congénitas
- Enfermedad neonatal mayor definida como una estancia hospitalaria > 1 mes
- VIH / SIDA en la madre o el niño
- Fibrosis quística diagnosticada por médico
- Enteropatías diagnosticadas por el médico
- Embarazo múltiple
- Peso al nacer <1500 gramos
- Aceptar parcialmente la participación en el muestreo o entrevista al reclutamiento
- Incapacidad de los padres / tutor legal para dar su consentimiento informado
- Si la madre no está dispuesta a participar.

7.2.3. Criterios de inclusión para las madres:

- madre del niño, capaz de proporcionar un consentimiento informado o consentimiento si es menor de 18 años de edad.

7.2.4. Criterios de exclusión para las madres:

- Planear mudarse de la comunidad dentro de los 6 meses siguientes
- Aceptar parcialmente la participación en el muestreo o entrevista en el reclutamiento
- Incapacidad de los padres / tutor legal para dar su consentimiento informado si es menor de 18 años de edad.

Cabe resaltar que, durante el proceso de reclutamiento de los menores, se aseguró el consentimiento de la madre o del cuidador principal, según sea el caso. Asimismo, se

brindó la información detallada del estudio a realizar. En el *Anexo 1* se encuentra la ficha socio económica extraída del estudio madre.

7.3. Colección de datos y muestras en el estudio madre

Para la selección y colección de muestras, las trabajadoras de campo del estudio madre visitaron cada hogar preguntando por mujeres embarazadas. Los datos de las mujeres interesadas en participar en el estudio fueron anotados, junto con la fecha posible de parto para posteriormente informar la fecha del reclutamiento en el estudio.

Las muestras de heces de los bebés fueron recolectadas semanalmente; mientras que las de las madres fueron mensualmente entre los años 2016 y 2019. Una vez obtenidas, estas fueron colocadas en hielo, transportadas al lugar de procesamiento, alícuotadas y almacenadas a -70°C en la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Este proceso fue realizado previamente por los investigadores del proyecto (Código SIDISI: 65178).

7.4. Identificación y cuantificación de los genes en las muestras de heces

7.4.1. Extracción de ADN

Este estudio planteó identificar la presencia de los genes de resistencia a antibióticos (*blaCTX-M-15* y *floR*) en muestras de heces de madres y bebés. Para ello, se comenzó con la extracción del ADN mediante el uso del kit de extracción de ADN (QIAamp® DNA - Investigator® Kit), de acuerdo al protocolo mostrado en el *Anexo 2* [45].

7.4.2. Cuantificación por espectrofotometría UV-visible

La cuantificación del material genético aislado se realizó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro UV-visible. Esta técnica permite estimar la calidad del ADN extraído, midiendo la absorbancia de interferentes como proteínas o ARN de la muestra. Se consideró importante cuantificar el ADN después del aislamiento, puesto que, compuestos como proteínas, fenoles, sales, entre otros, podrían interferir en el desarrollo de la técnica [46]. Asimismo, este procedimiento nos proporcionó la concentración de ADN extraído, lo cual fue importante conocer antes de llevar a cabo el siguiente procedimiento, puesto que altas concentraciones de ADN pueden acelerar la acumulación de productos no específicos en la PCR [47]. Por ello las muestras se

trabajaron a una concentración de ADN de 5 a 17 ng/uL, tras realizar las diluciones correspondientes.

7.4.3. PCR - CRISPR/Cas12a

La detección de los genes de resistencia se realizó mediante la reacción acoplada de PCR-CRISPR-Cas12a. El protocolo fue tomado por Vargas [48].

En primer lugar, se realizó la reacción PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) que permitió la amplificación de las secuencias genéticas específicas. La primera etapa consistió en la denaturación inicial la cual se realizó a una temperatura de 95 °C por 3 minutos. Luego, se realizaron 30 ciclos de las siguientes etapas, todas por 30 segundos: denaturación (95°C), anillamiento (59 °C) y extensión (72 °C). Finalmente, se sometieron a una extensión final a 72°C por 5 minutos. Cabe resaltar que estas condiciones fueron las mismas para ambos sets de primers (*blaCTX-M-15* y *floR*).

Para este procedimiento se utilizó las secuencias de cebadores descritos en el *Anexo 3*. Además, se realizó la mezcla maestra de la PCR previamente estandarizada en el *Anexo 4*.

El presente estudio realizó el análisis de PCR por separado; es decir, primero se evaluó la reacción acoplada PCR-CRISPR/Cas12a para uno de los genes y, posteriormente, se repitió la reacción para el otro gen con los cebadores correspondientes.

A manera de un ensayo preliminar, se realizó electroforesis en gel de agarosa (1.4%) de los amplicones de PCR para ambos genes, que es un tamizaje que logra separar los fragmentos de acuerdo a su tamaño. La visualización fue posible por medio de la tinción del producto de ADN amplificado a partir de la adición de bromuro de etidio al gel de agarosa y que, al exponerse a luz UV, mostró los productos PCR de color fluorescente mediante un transluminador UV. También se realizó un on-off de la reacción acoplada de PCR-CRISPR Cas para estandarizar la metodología y verificar que la reacción se de correctamente.

Posteriormente, se realizó la reacción CRISPR/Cas12a para determinar la presencia de *blaCTX-M-15* y *floR*. Este sistema puede actuar como una plataforma de detección molecular específica, para lo cual necesita de dos componentes principales: ARNcr y la proteína Cas12a. Las secuencias del ARN guía (ARNcr) se describen en la *Tabla 1* [48].

Tabla 1. Constructo del ARNcr para los genes de resistencia

Gen	<i>scaffold sequence</i> + secuencia guía
<i>blaCTX-M-15</i>	TAATTTCTACTAAGTGTAGATGTCTCCAGCTGTCGGGCGAACG
<i>floR</i>	TAATTTCTACTAAGTGTAGATTGCCAACCGTCCTGAGGGTGTCTG

En primer lugar, se realiza el reconocimiento del ADN, en donde ocurre la hibridación del ARNcr-ADN (emparejamiento de bases). Con esta unión, la enzima Cas12a se activa y sufre cambios conformacionales que le permiten cortar el ADN, comenzando con el corte tipo *cis*, específico para el ADN objetivo, seguido del corte *trans*, que corta el ADN de manera inespecífica en secuencias de ácido nucleico de una sola hebra, como el reportero fluorescente. De esta manera, la presencia del gen específico se ve determinada a partir de la emisión de fluorescencia por parte de la sonda [48].

El protocolo se muestra en la *Figura 3* y se extrajo de la investigación de Vargas, M. [48]. La formulación para la preparación del complejo 10 x Cas12a y la reacción CRISPR/Cas12a se muestran en el *Anexo 5*.

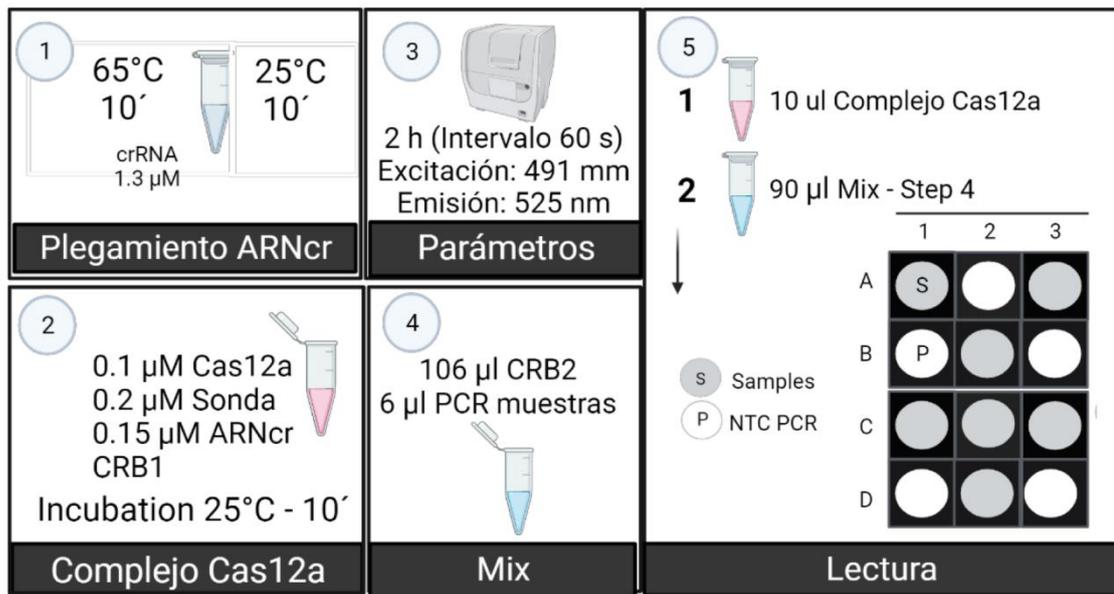


Figura 3: Protocolo para la detección de los genes *blaCTX-M-15* y *floR* mediante el sistema PCR-CRISPR-Cas12a [48]

La lectura de resultados se realizó por medio de un lector de microplacas en unidades relativas de fluorescencia (RFU, por sus siglas en inglés). La fluorescencia de las muestras fue normalizada con la fluorescencia del NTC (del inglés Non Template Control) PCR. Esto resulta de la división entre la fluorescencia de la muestra entre la fluorescencia del NTC PCR. Las condiciones del lector de microplacas (Tecan Infinite 200 Pro) fueron:

- Temperatura de 25°C
- Paso cinético Runtime 2H
- Intervalo 1 minuto
- Método de lectura: Intensidad de fluorescencia
- Tipo de lectura: Punto final/cinético
- Tipo de óptica: Monocromadores
- Excitación (nm) 491
- Emisión (nm) 525
- Ganancia 80
- Altura de lectura 7 mm

Asimismo, los resultados fueron visualizados de manera directa o conocido como *Naked-eyed detection* mediante un transiluminador UV.

7.5. Operacionalización de variables

A continuación, se presentan las variables y su operacionalización para los análisis realizados (*Tabla 2*).

Tabla 2. Operacionalización de variables

Variable	Definición operacional	Valores posibles	Tipo y escala	Fuente
Tipo de nacimiento	Tipo de parto por el cual nació el bebé	Vaginal Cesárea Sin información	Cualitativa - nominal	Encuesta del estudio madre
Sexo del bebé	Sexo con el que nació el bebé	Femenino Masculino	Cualitativa - nominal	Encuesta del estudio madre
Edad del bebé	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la fecha de toma de muestra	0-7 meses 8-16 meses	Cualitativa - ordinal	Encuesta del estudio madre
Lactancia del bebé	El bebé se encontraba recibiendo lactancia materna en los 5 días más cercanos a la toma de muestra (± 5 días)	Sí No	Cualitativa - nominal	Encuesta del estudio madre
Alimentación complementaria del bebé	El bebé recibía alimentación complementaria en los 5 días más cercanos a la toma de muestra (± 5 días)	Sí No	Cualitativa - nominal	Encuesta del estudio madre
Evento de diarrea del bebé	El bebé presentó algún episodio de diarrea en los 5 días más cercanos a la toma de muestra (± 5 días)	Sí No	Cualitativa - nominal	Encuesta del estudio madre
Concordancia	Presencia / ausencia del gen en cada par estudiado	Concordancia positiva (presencia del gen en ambas muestras) Concordancia negativa (ausencia del gen en ambas muestras) No concordancia (presencia del gen en sólo una muestra de cada par)	Cualitativa - nominal	Resultado de la reacción acoplada PCR-CRISPRCas12a del presente estudio

7.6. Tamaño de muestra

Del banco de muestras del proyecto madre se seleccionaron muestras fecales de 33 madres durante 3 meses consecutivos, lo que resultó en 99 muestras. Estas se emparejaron con muestras de sus hijos, añadiendo otras 99 muestras. En total, se analizaron 198 muestras, resultando en 1 muestra mensual por sujeto. Asimismo, cabe destacar que se analizaron las muestras por separado en cada mes; ello para observar la concordancia de la presencia de genes de resistencia en ambos durante un periodo de tiempo. Dado que contábamos con un número determinado de muestras, se quiso verificar si este era adecuado tanto para la prueba de kappa como para el coeficiente de Spearman. Para ello realizamos cálculos de tamaño de muestra [49] asumiendo distintos escenarios (*Anexo 6*) y verificamos que:

- a) Para estimar si un valor dado de índice de kappa es estadísticamente distinto de cero, con una potencia del 80% y un nivel de significancia del 5%, el número de muestras con que contamos fue suficiente para determinar que un índice de kappa de hasta 0.3 es estadísticamente distinto de cero; si se obtiene un índice de kappa superior, el tamaño de muestra es suficiente.
- b) Para estimar un coeficiente de correlación de Spearman de 0,3 que es estadísticamente distinto de cero, con una potencia de 80% y nivel de significancia del 5%, se necesita un mínimo de 89 pares y por lo tanto el tamaño de muestra es suficiente. Esto fue estimado de acuerdo a las recomendaciones de May *et al* [50]. En el *Anexo 7* se muestran las curvas correspondientes al coeficiente de Spearman (r_s) y el tamaño de muestra requerido; siendo $n = 89$ mínimo que justificaría al menos un $r_s = 0,3$.

7.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos son de dos tipos: cualitativos (presencia/ausencia) determinados por la visualización de fluorescencia, y cuantitativos (ratio de RFU) medidos en el fluorómetro.

Para evaluar la concordancia se utilizaron dos pruebas estadísticas. En primer lugar, se utilizó el índice de Kappa para medir la concordancia en la presencia/ausencia de los

genes de resistencia entre madres e hijos, debido a que este índice considera la concordancia por azar entre los individuos y brinda un valor más cercano a la realidad. De esta manera, un valor alto representa una alta concordancia en la presencia de los genes estudiados en ambos grupos y, por el contrario, un valor de cero significa que no hay concordancia [51].

$$k = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e} = 1 - \frac{1 - p_o}{1 - p_e} \quad [51]$$

donde:

p_o : acuerdo relativo observado entre los evaluadores.

p_e : la probabilidad hipotética de acuerdo al azar

En segundo lugar, para evaluar la correlación en la presencia de estos genes de resistencia medida por el ratio de RFU en las muestras de heces de madres y bebés, se utilizó el Coeficiente de Correlación de Spearman debido a que dicha variable no sigue una distribución normal, y llegada una cierta concentración, la enzima LbCas12a se satura; por ende, es más apropiado utilizar esta prueba no paramétrica. Esta prueba se expresa mediante el " r_s ", el cual se calcula de la siguiente manera:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{n(n^2 - 1)} \quad [52]$$

donde:

n = Cantidad de sujetos que se clasifican,

x_i = El rango de sujetos i con respecto a la variable

x , y_i = El rango de sujetos i con respecto a la variable y ,

$d_i = x_i - y_i$ es la diferencia de entre los rangos X y Y

Este coeficiente de correlación de rangos de Spearman (r_s) nos indica si no hay correlación ($r_s = 0$); o de lo contrario, si es positiva ($r_s = 1$) o negativa ($r_s = -1$). Se consideró un valor de significancia estadística $\alpha = 0.05$ y todos los análisis se realizaron utilizando STATA [53].

Finalmente, para evaluar posibles características relacionadas a la concordancia, se realizó un análisis estadístico bivariado por medio de la prueba de chi-cuadrado o exacta de Fisher (este último sólo para aquellos casos donde la frecuencia esperada fue menor a 5) con las variables descritas a continuación, comparando su frecuencia entre los

grupos concordantes positivos, negativos y discordantes [54]. Las siguientes variables se clasificaron según la existencia de concordancia: edad, sexo y tipo de parto de los bebés, además del tipo de alimentación que recibían (lactancia y alimentación complementaria). Para el sexo del bebé y el tipo de parto por el que nació, variables que no cambian en el tiempo (a diferencia del periodo de lactancia o alimentación complementaria), se realizó el análisis por muestra; es decir, se utilizó a la muestra como unidad de análisis asumiendo independencia. Finalmente, la edad se categorizó de acuerdo a la edad promedio en la cual los bebés suelen cambiar su patrón de alimentación de lactancia exclusiva a alimentación complementaria; es decir, 6 meses [13].

7.8. Consideraciones éticas

El estudio madre evaluado y aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código SIDISI: 65178), mantuvo la información personal de los participantes en anonimato al identificarlos mediante códigos. Por lo que, la presente investigación se realizó con las muestras codificadas sin adquirir información personal de los participantes; además que se sometió a la evaluación por el CIEI (Código SIDISI 212020). Revisar *Anexo 8*.

8. RESULTADOS

8.1. Descripción de la población

Las características de los bebés analizados ($n = 33$) se detallan en la *Tabla 3*. En donde, se evaluaron edad, sexo y tipo de nacimiento (parto normal, cesárea o no hay información) del bebé. La edad de los bebés en la primera muestra se encontró en un rango de 0 a 14 meses de vida, con un promedio de 7 (el valor de la mediana también fue 7). Se evaluaron bebés del sexo masculino ($n = 17$) y femenino ($n = 16$). En relación al tipo de nacimiento, el más frecuente fue el parto vaginal (51,52%, $n = 17$), aunque sólo se obtuvo información de 21 bebés.

Tabla 3. Características de los bebés ($n = 33$)

Característica	n	%
Edad de la primera muestra en meses (promedio [rango])	7 [0-14]	-
Sexo		
Masculino	17	51,52
Femenino	16	48,48
Tipo de parto		
Parto vaginal	17	51,52
Cesárea	4	12,12

En la *Tabla 4* se detallan las características de los bebés que variaron en los 3 periodos de muestreo. En la mayoría de los casos, los bebés se encontraban aún lactando durante el periodo de la toma de muestra (98,99%); otros presentaron alimentación complementaria (70,71%). Asimismo, una minoría de las muestras de bebés presentaron diarrea en un periodo cercano a la toma de muestra (5,05%).

Tabla 4. Características de los bebés en los 3 periodos de muestreo*

Bebés (n =33)							Muestras bebés (n = 99)	
	Primera muestra		Segunda muestra		Tercera muestra		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Lactancia	33	100	33	100	32	96,97	98	98,99
Alimentación Comp.	20	60,61	24	72,73	26	78,79	70	70,71
Evento de diarrea	2	6,06	1	3,03	2	6,06	5	5,05

* Características determinadas dentro de los 5 días (± 5) de la muestra evaluada.

8.2. Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN de las 198 muestras, donde la concentración tuvo un rango de 5,3 y 573,5 ng/ μ L. Las medidas de estadística descriptiva con respecto a la concentración y calidad del ADN se muestran en el *Anexo 9*. Las muestras se utilizaron en un rango de 5,3 - 17 ng/ μ L, de acuerdo a una previa optimización del sistema PCR-CRISPR-Cas12a.

8.3. Ensayos preliminares

Se realizaron ensayos preliminares de PCR y electroforesis a algunas muestras positivas y negativas para *blaCTX-M-15* y *floR* (*Figura 4*) para estandarizar nuestra metodología y de esta manera, asegurarnos de que la prueba funciona correctamente. Con el mismo objetivo, se realizó un ensayo preliminar de PCR-CRISPR/Cas12a, teniendo un control positivo, un control negativo y una muestra positiva (*Figura 5*). Debido a que los ensayos resultaron exitosos, se comenzó a analizar las muestras.

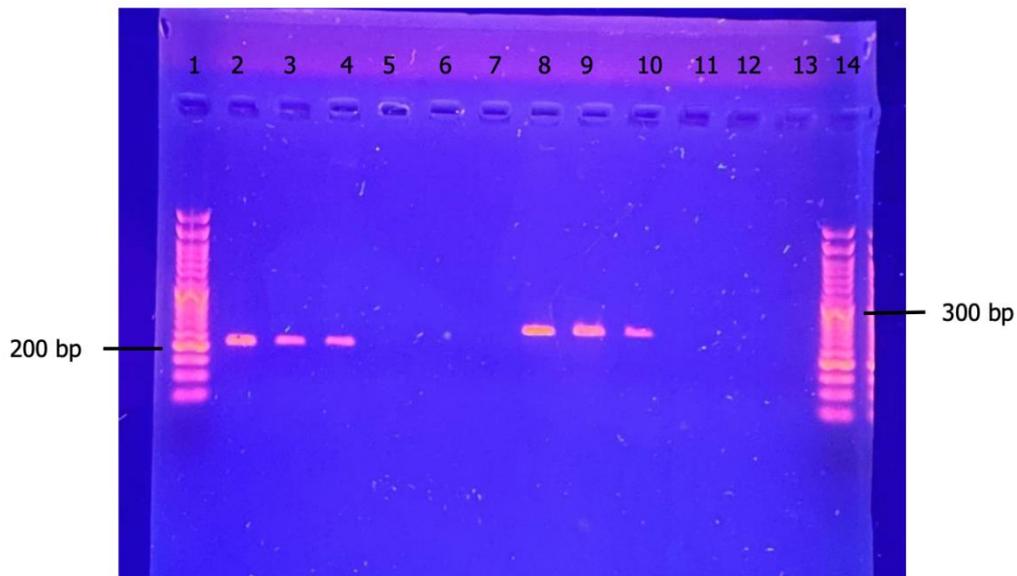


Figura 4.- Gel de electroforesis de agarosa (1.4%) en TBE 0.5X. de genes de resistencia *blaCTX-M-15* (216 bp) y *floR* (270 bp). Los carriles 1 y 14 corresponden al marcador de tamaño de ADN 100 pb y se especifican las bandas en 200 bp y 300 bp. Los carriles 2 y 7 corresponden al control positivo y control negativo respectivamente para el gen *blaCTX-M-15*; los carriles 3 y 4 a muestras positivas; y los carriles 5 y 6 a muestras negativas de este mismo gen. Los carriles 8 y 13 corresponden al control positivo y control negativo respectivamente para el gen *floR*; los carriles 9 y 10, resultaron pertenecer a muestras positivas; y los carriles 11 y 12, a muestras negativas de este mismo gen.

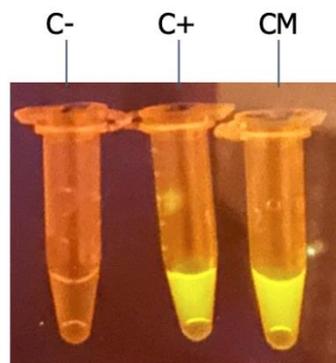


Figura 5: ON/OFF del procedimiento PCR-CRISPR/Cas12a para comprobar el protocolo a utilizar. C-: control negativo; C+: control positivo; CM: muestra positiva correspondientes al gen *bla-CTX-M-15*. Se observa que el control positivo y la muestra positiva fluorescen.

8.4. Prevalencia de los genes estudiados en las muestras de heces

Las prevalencias en toda la población (madres y bebés) de los genes *bla-CTX-M-15* y *floR* fueron de 31,31% (62/198) y 54,55% (108/198), respectivamente; es decir, se encontró una mayor prevalencia de *floR*.

En la *Tabla 5*, se resume la presencia de los dos genes de resistencia analizados por sujetos de estudio y por muestras (3 muestras por sujeto de estudio debido al periodo de seguimiento de 3 meses). De las muestras *bla-CTX-M-15* positivas (n = 62), 31 corresponden a madres de familia y 31 a los bebés; mientras que, de las muestras que resultaron *floR*-positivas (n = 108), 53 y 55 corresponden a madres y bebés, respectivamente. Esto nos lleva a una proporción similar de positivos en ambos grupos de estudios para ambos genes; es decir, no se demostró una diferencia importante sobre la presencia de estos genes entre madres y bebés.

Tabla 5. Presencia de genes de resistencia en los sujetos estudiados

<i>blaCTX-M-15</i>						
	Bebés			Madres		
Periodo de muestreo	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
1	25 (75,76%)	8 (24,24%)	33	26 (78,79%)	7 (21,21%)	33
2	20 (60,61%)	13 (39,39%)	33	22 (66,67%)	11 (33,33%)	33
3	23 (69,7 %)	10 (30,3%)	33	20 (60,61 %)	13 (39,39%)	33
Total	68 (68,69%)	31 (31,31%)	99 (100%)	68 (68,69%)	31 (31,31%)	99 (100%)
<i>floR</i>						
	Bebés			Madres		
Periodo de muestreo	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
1	19 (57,58%)	14 (42,42%)	33	17 (51,52%)	16 (48,48%)	33
2	13 (39,39%)	20 (60,61%)	33	14 (42,42%)	19 (57,58%)	33
3	12 (36,36%)	21 (63,64%)	33	15 (45,45%)	18 (53,54%)	33
Total	44 (44,44%)	55 (55,56%)	99 (100%)	46 (46,46%)	53 (53,54%)	99 (100%)

Asimismo, se resalta el cambio ascendente de la presencia de ambos genes de resistencia en los sujetos de estudio del primer al segundo y tercer periodo de muestreo (Figura 6). Cabe destacar que, se encontró la presencia de al menos uno de los dos genes de resistencia en 63/99 (63,64%) muestras tanto de madres como de bebés.

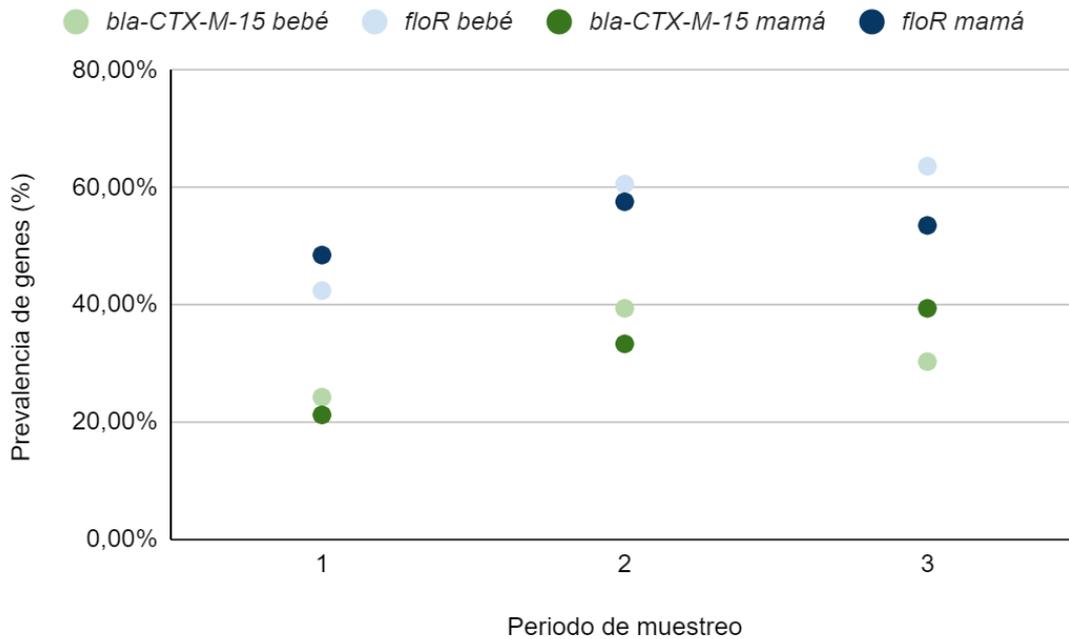


Figura 6. Prevalencia de los genes de resistencia *bla-CTX-M-15* y *floR* en los tres periodos de muestreo.

Por otro lado, de las 198 muestras analizadas, se detectó la presencia de ambos genes en 44 de ellas (22,22%); es decir, que en una misma muestra se encontraron los genes *blaCTX-M-15* y *floR*. De estas, 21 correspondieron a muestras de madres; mientras que 23 a muestras de bebés.

Finalmente, se encontró que algunas muestras de un mismo bebé tienen resultados variables en los tres meses evaluados. Tanto para el gen *blaCTX-M-15* como para *floR*, se presentaron muestras que en un inicio eran positivas y luego cambiaron a ser negativas durante el periodo de estudio, ya sea para el segundo o tercer mes de la toma de muestra, dando así un total de 25/132 cambios (15/66; 22,73% - *blaCTX-M-15* y 10/66; 15,15% - *floR*) (Figura 7).

a) *blaCTX-M-15*

b) *floR*

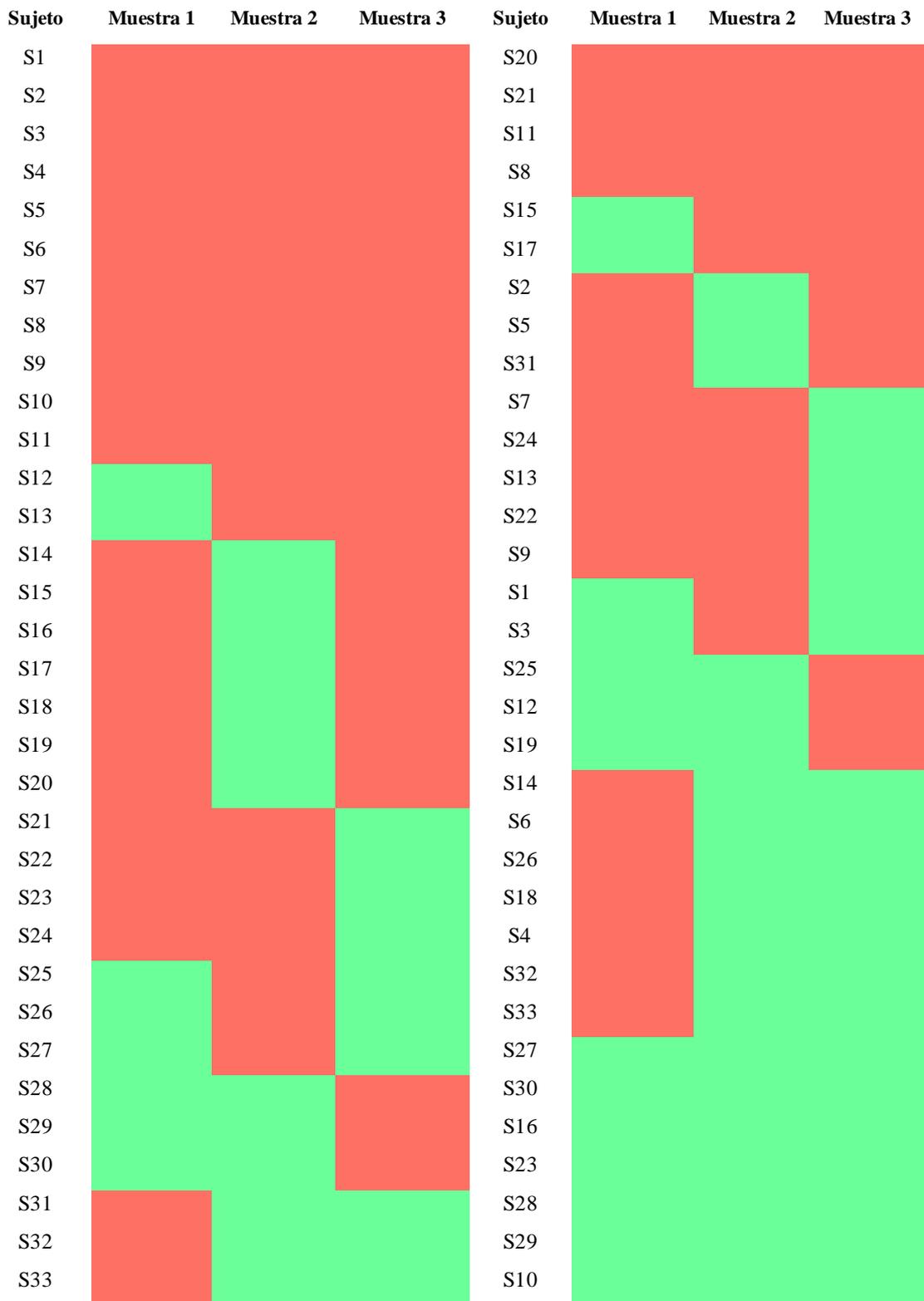


Figura 7. Mapa de calor de la presencia de los genes de resistencia en las tres muestras consecutivas de los bebés (rojo: negativo; verde: positivo) (a) *blaCTX-M-15* (b) *floR*

8.5. Concordancia de los genes estudiados en los pares madre-bebé

Se analizó la concordancia de los genes de resistencia en los tres periodos de muestreo para las madres y los bebés. La *Tabla 6* muestra concordancia en 15 pares de muestras madre - bebé positivas y 52 pares de muestras madre - bebé negativas para el gen *blaCTX-M-15*. En este sentido, las muestras de madres y bebés coincidieron 67/99 veces (67,68%) para la presencia del gen *blaCTX-M-15*.

Por otro lado, el gen *floR* presentó una concordancia global menor, al presentar 55/99 (55,56%) pares concordantes. Se evidenció 32 pares de muestras madre - bebé positivas y 23 pares de muestras madre - bebé negativas.

Tabla 6. Concordancia entre la presencia de genes de resistencia en las parejas de las madres y sus bebés.

<i>blaCTX-M-15</i>		madre		Total
		Negativo	Positivo	
Bebé	Negativo	52	16	68
	Positivo	16	15	31
Total		68	31	99
Totalconcordancia		67 (67,68 %)		
<i>floR</i>		madre		Total
		Negativo	Positivo	
Bebé	Negativo	23	21	44
	Positivo	23	32	55
Total		46	53	99
Totalconcordancia		55 (55,56 %)		

El valor de kappa de concordancia para el gen de resistencia *blaCTX-M-15* fue de 0,25 ($p = 0,007$). Por lo que, se tuvo un grado de concordancia bajo, pero significativo para la presencia de este gen en las muestras de madres y sus bebés. Por otro lado, para el gen de resistencia *floR* el valor de kappa fue de 0,10 ($p = 0,150$); lo cual mostró que no existe concordancia en la presencia de este gen entre las muestras de madres y sus bebés (*Tabla 7*) [55].

Tabla 7. Índice de kappa global de la presencia de los genes de resistencia en las parejas estudiadas.

	Concordancia	Concordancia esperada	Kappa (95% CI)	Error estándar	Z	valor p
<i>blaCTX-M-15</i>	67,68%	56,98%	0.249 (0.047 - 0.450)	0,101	2,470	0,007
<i>floR</i>	55,56%	50,39%	0.104 (-0.092 - 0.300)	0,100	1,040	0,150

En la *Tabla 8* se muestran los valores de kappa para las parejas de muestras analizadas por cada periodo de estudio, donde se observó que hay una concordancia mayor en el tercer periodo de muestreo.

Tabla 8. Índice de kappa de la presencia de los genes de resistencia en las parejas estudiadas por cada periodo de muestreo.

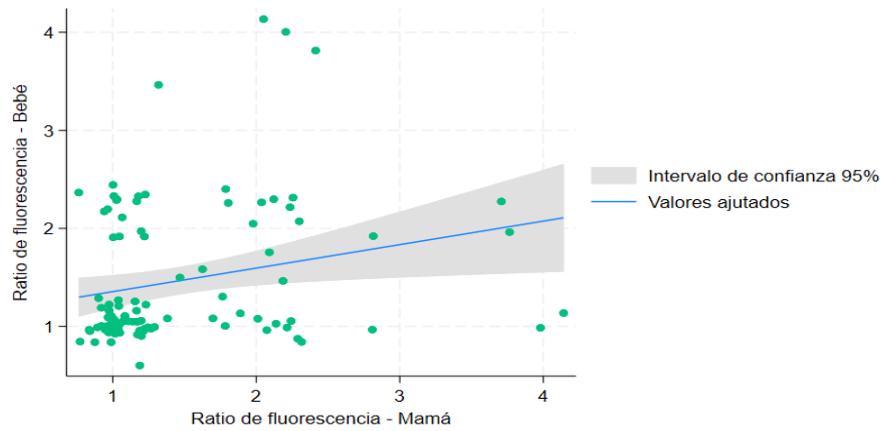
<i>blaCTX-M-15</i>						
Periodo de muestreo	Concordancia	Concordancia esperada	Kappa	Error estándar	Z	valor p
1	72,73%	64,83%	0,225	0,173	1,290	0,098
2	57,58%	53,54%	0,087	0,173	0,500	0,307
3	72,73%	54,18%	0,405	0,171	2,370	0,009
<i>floR</i>						
1	51,52%	50,23%	0,026	0,173	0,150	0,441
2	48,48%	51,61%	-0,065	0,174	-0,370	0,645
3	66,67%	51,24%	0,316	0,171	1,850	0,032

Por otra parte, se calculó el coeficiente de Spearman para evaluar la correlación del ratio de RFU en las parejas madre-bebé, mostrado en la *Tabla 9* y en la *Figura 8*. Se obtuvo una correlación ligeramente positiva para ambos genes ($s = 0,2523$ y $s = 0,0178$; *blaCTX-M-15* y *floR*, respectivamente); no obstante, sólo es estadísticamente significativo para el primer gen ($p = 0,0119$).

Tabla 9. Coeficiente de Spearman para evaluar la correlación de la presencia de los genes de resistencia *blaCTX-M-15* y *floR* a partir del ratio de fluorescencia emitido por la reacción acoplada PCR-CRISPR-Cas12a en las parejas estudiadas.

<i>blaCTX-M-15</i>	
Coeficiente de Spearman	0,2523
valor p	0,0119
<i>floR</i>	
Coeficiente de Spearman	0,0178
valor p	0,8611

(a) Gen *blaCTX-M-15*



(b) Gen *floR*

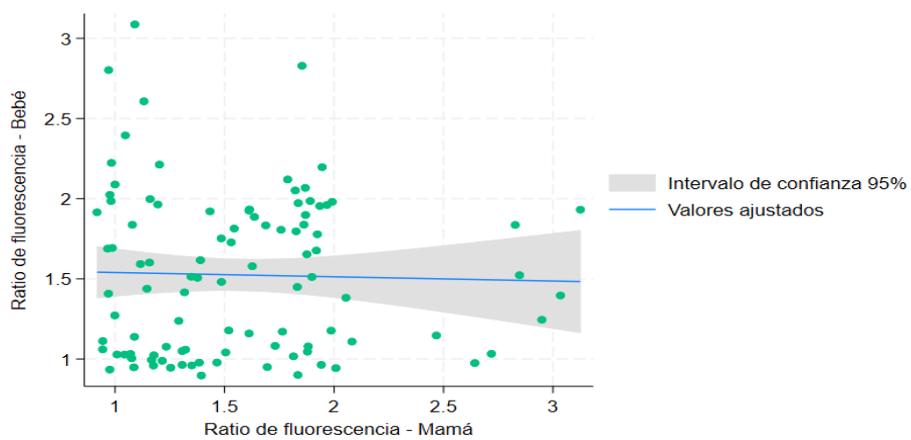


Figura 8. Gráficas de dispersión de los ratios de fluorescencia resultantes de las muestras de madres y sus bebés. Nota: el cálculo de valores ajustados (línea de tendencia azul y su intervalo de confianza) se basa en una regresión lineal, sin embargo, permite observar gráficamente la tendencia. (a) Gen *blaCTX-M-15* (b) Gen *floR*.

8.6. Características de los bebés y la concordancia del gen *blaCTX-M-15* en los pares madre-bebé

Se evaluó la posible relación de las características de los bebés (edad en la primera muestra, sexo, lactancia, alimentación complementaria y tipo de parto) con la concordancia positiva (presencia de los genes estudiados en ambos sujetos), concordancia negativa (ausencia de los genes estudiados en ambos sujetos) y discordantes (aquellos donde no había concordancia), lo cual se muestra en la *Tabla 10*.

Se obtuvieron 67/99 pares de muestras concordantes, 15 pares concordantes positivos y 52 pares concordantes negativos. Si bien no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las características entre parejas madre-bebé con presencia del gen *blaCTX-M-15* comparado con las parejas madre-bebé sin la presencia de los genes; se notó un valor de p marginalmente significativo ($p = 0,061$) para la variable lactancia.

A pesar de ello, se mostraron algunas relaciones interesantes sobre la distribución de la concordancia positiva y negativa con respecto a las variables analizadas. Por ejemplo, los bebés que presentaron una concordancia negativa con sus madres fueron, en su mayoría, bebés de 0-7 meses; mientras que la concordancia positiva sucedió, mayormente, en los bebés de 8 a 16 meses. En relación al tipo de parto, el parto vaginal fue el más frecuente y no se encontró una diferencia entre los pares concordantes negativos y los pares concordante positivos, sin embargo, el tipo de parto vaginal es más frecuente en aquellos donde hay discordancia. En el caso del sexo del bebé, se logró observar que, aquellos bebés que demostraron concordancia con sus progenitoras (ya sea positiva o negativa) eran del sexo masculino; mientras que, para el caso de los pares discordantes, mayormente eran del sexo femenino.

Tabla 10. Características de los bebés según la concordancia de los genes estudiados en las 198 muestras analizadas.

<i>blaCTX-M-15</i>						
Características		Concordancia positiva	Concordancia negativa	No concordancia	Total	valor p*
Edad	0 - 5 meses	6 (40,00%)	16 (30,77%)	14 (43,75%)	36	0,462
	6 - 16 meses	9 (60,00%)	36 (69,23%)	18 (56,25%)	63	
	Total	15	52	32	99	
Sexo	Masculino	9 (60%)	28 (53,85%)	14 (43,75%)	51	0,517
	Femenino	6 (40%)	24 (46,15%)	18 (56,35%)	48	
	Total	15	52	32	99	
Lactancia	Si	14 (93,33%)	52 (100%)	32 (100%)	98	0,152
	No	1 (6,67%)	0	0	1	
	Total	15	52	32	99	
Alimentación comp.	Si	11 (73,33%)	37 (71,15%)	22 (68,75%)	70	0,945
	No	4 (26,67%)	15 (28,85%)	10 (31,25%)	29	
	Total	15	52	32	99	
Tipo de parto	Vaginal	5 (71,43%)	22 (73,33%)	24 (92,31%)	51	0,115
	Cesárea	2 (28,57%)	8 (26,67%)	2 (7,69%)	12	
	Total	7	30	26	63	

*El valor de p fue obtenido a partir de la prueba chi cuadrado para todas las variables, excepto para las variables lactancia y tipo de parto, que se obtuvieron a partir de la prueba exacta de Fisher.

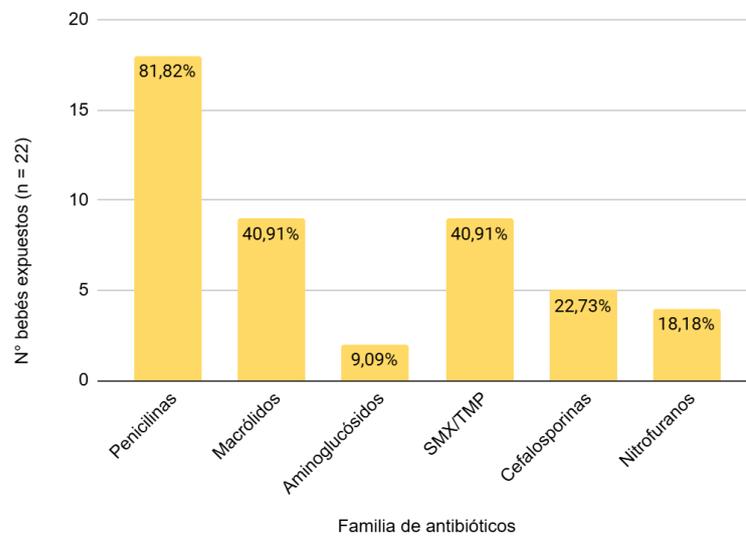
8.7. Otras características relacionadas a la presencia de los genes estudiados en los bebés

8.7.1. Consumo de antibióticos en los bebés

Se describió el consumo de antibióticos en los bebés y la presencia de genes *blaCTX-M-15* y *floR*. En donde, 2/3 de los bebés reportaron haber tomado antibióticos antes o durante la toma de muestras estudiadas. Asimismo, se observó que los bebés estuvieron expuestos a antibióticos en más de una ocasión, siendo 7 (1/22; 4,55%) el número máximo de

ocasiones en las que un bebé ingirió antibióticos y 18,18% el porcentaje de bebés expuestos a 6 ocasiones de consumo de antibióticos en su corta vida. Por otra parte, el 13,64% de los bebés consumieron 4 familias diferentes de antibióticos en el período descrito. En la *Figura 9* se exponen estas familias de antibióticos y se observa que la familia a la que más estuvieron expuestos fue Penicilinas (81,82%).

Figura 9. Gráfica de las familias de antibióticos a los que estuvieron expuestos los bebés (n = 22) antes o durante la toma de muestras.



Por otra parte, en la *Tabla 11* se observa que el porcentaje de las muestras que resultaron positivas para *blaCTX-M-15* que pertenecían a bebés que consumieron y que no consumieron antibióticos fueron 31.8% y 30.3%, respectivamente. Por otro lado, se observó que el porcentaje de las muestras que resultaron positivas para *floR* que pertenecían a bebés que consumieron y que no consumieron antibióticos fueron 54.5% y 57.8%, respectivamente.

Tabla 11. Consumo de antibióticos en los bebés y la presencia de *blaCTX-M-15* y *floR* en las muestras analizadas (n = 99).

<i>blaCTX-M-15</i>		Presencia del gen		Total
		Positivo	Negativo	
Consumo de antibióticos	Si	21 (31,82%)	45 (68,18%)	66
	No	10 (30,30%)	23 (69,70%)	33
Total		31	68	99

<i>floR</i>		Presencia del gen		Total
		Positivo	Negativo	
Consumo de antibióticos	Si	36 (54,55%)	30 (45,45%)	66
	No	19 (57,58%)	14 (42,42%)	33
Total		55	44	99

8.7.2. Hábitos de higiene

El estudio madre recopiló algunos datos, referentes a la frecuencia de hábitos higiénicos que presentaron las madres en relación a algunas de las actividades principales en la dinámica intrahogar como la preparación de alimentos, entre otros. La *Tabla 12* muestra que todas las madres afirman lavar las frutas y verduras crudas antes de comerlas y que, la mayoría indica tener buenos hábitos de higiene.

Tabla 12. Frecuencia de los hábitos de higiene de las madres

Hábito de higiene		Frecuencia		
		Siempre	A veces	Nunca
Lavado de manos	Antes de preparar los alimentos	96,97 %	3,03 %	0
	Antes de dar de comer a su bebé	96,97 %	3,03 %	0
	Después de ayudar al hijo a defecar	96,97 %	3,03 %	0
	Después de ir al baño	96,97 %	3,03 %	0
Lavado de frutas y verduras	Antes de cocinarlas	96,97 %	3,03 %	0
	Antes de comerlas	100,00 %	0	0

8.7.3. Crianza de animales (pollos)

Asimismo, se cuenta con información de las familias acerca de la presencia de ciertos animales en casa, por lo que se pudo evaluar si las familias convivían con pollos y con cuántos de estos. Las familias que reportaron tener pollos en casa fueron 8/33. La *Tabla 13* muestra la relación de la crianza de pollos con la presencia de los GRA estudiados, en donde se muestra que el porcentaje de las muestras positivas para los genes *blaCTX-M-15* y *floR* que pertenecían a bebés en cuyas casas había presencia de pollos fue similar a aquellos sin presencia de pollos.

Tabla 13. Crianza de pollos y la presencia de *blaCTX-M-15* y *floR* en las muestras analizadas (n = 99).

<i>blaCTX-M-15</i>		Presencia del gen		Total
		Positivo	Negativo	
Crianza de pollos	Si	9 (37,50%)	15 (62,50%)	24
	No	22 (29,33%)	53 (70,67%)	75
Total		31	68	99
<i>floR</i>		Presencia del gen		Total
		Positivo	Negativo	
Crianza de pollos	Si	14 (58,33%)	10 (41,67%)	24
	No	41 (54,67%)	34 (45,33%)	75
Total		55	44	99

9. DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo principal determinar si existe concordancia entre la presencia de genes de resistencia a antibióticos (*blaCTX-M-15* y *floR*) en 3 muestras consecutivas mensuales de heces de 33 pares de madres y sus bebés menores de 2 años con la finalidad de generar evidencia sobre la existencia de una posible transmisión materna-infantil de estos genes en una etapa temprana, basándonos en la presencia de alguno de estos biomarcadores en las muestras de ambos sujetos de estudio.

9.1. La prevalencia de *floR* fue mayor que la de *blaCTX-M-15*

La presencia del gen *floR* (53,54% en madres y 55,56% en bebés) fue mayor que la de *blaCTX-M-15* (31,31% en madres y bebés); contrariamente a lo esperado, puesto que, la incidencia de *floR* se ha reportado mayormente en animales; mientras que *blaCTX-M-15* se encuentra mayormente distribuido en humanos. En el estudio de Ramadan H *et al.* [56] se analizó la presencia de múltiples GRA en muestras provenientes de humanos, carne de pollo y carne molida, incluyendo a los genes *blaCTX-M* y *floR*, demostrando, significativamente ($p < 0,001$), que en la carne de pollo se encontró mayor presencia de *floR* (86,9%) con respecto a *blaCTX-M* (63,9%); mientras que, de las muestras de humanos reportaron lo contrario, siendo la presencia de *blaCTX-M* (18,8%) superior a la de *floR* (6,3%).

Se ha demostrado que *blaCTX-M-15* es uno de los genes de resistencia más comunes y con alta prevalencia. Según el estudio de Mazumder R, *et al.* [57], la mayoría de los aislados productores de BLEE analizados albergaban al gen *blaCTX-M-15* (55 aislados que portaban el gen *blaCTX-M-15* de 65 *E. coli* productoras de BLEE; 84,6%). Curiosamente, en este estudio el gen con mayor prevalencia entre los dos genes analizados fue *floR* tanto en las muestras de madre como de bebé.

Se ha reportado la presencia de *floR* en humanos. Por ejemplo, Lu *et al.* [44] reportaron la presencia del gen *floR* en el 7.01% (23/328) de aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de humanos. Asimismo, Murray *et al.* [6] encontraron el gen *floR* en 17/130 genomas de *E. coli* de pollos y en 5/150 de humanos, lo cual indica que, entre estos dos grupos estudiados, *floR* prevalece en animales. Dichos resultados demuestran la existencia de una baja prevalencia de *floR* en humanos; es decir, si bien se ha logrado

encontrar su presencia en muestras humanas, no se encuentra ampliamente distribuido en este grupo. De acuerdo a los resultados, la prevalencia del gen *floR* fue mayor al 50% en ambos miembros de los pares estudiados, por lo que podría ser alarmante la propagación de la RAM en humanos a causa de este gen.

9.2. Concordancia de los genes estudiados en los pares madre-bebé

Encontramos una baja concordancia, pero significativa entre madre y bebé en nuestra investigación para *blaCTX-M-15* ($k = 0,25$; $p = 0,007$); mientras que para *floR* no se demostró una concordancia estadísticamente significativa ($k = 0,10$; $p = 0,150$) [55]. Sin embargo, en el tercer mes se evidenció una concordancia para ambos genes $k = 0,40$ y $k = 0,32$; para *blaCTX-M-15* y *floR* respectivamente, estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Por lo que surge la hipótesis de una mayor compartición de estos genes de resistencia al pasar el tiempo. Estos resultados fueron concordantes con la correlación positiva significativa para *blaCTX-M-15* ($s = 0,2523$; $p < 0,05$) en muestras de madres y sus bebés y la ausencia de correlación para el gen *floR*. Los presentes resultados sugieren la posibilidad de una transmisión materno-infantil, con mayor fuerza estadística, para el gen *blaCTX-M-15*.

El estudio de Danino D, *et al.* [58] tuvo como objetivo identificar parejas de madres y sus bebés (ingresados a la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal) que alberguen colonización por BLEE de la misma cepa y reportaron que 28/71 (39,4%) neonatos colonizados eran hijos de madres colonizadas. De estos, 25 pares madre-bebé, incluyendo 2 pares de gemelos, estaban colonizados por la misma cepa bacteriana (11 *Klebsiella spp.* y 14 *E. coli*) haciendo referencia a una transmisión materno-infantil [58].

Si bien, la concordancia obtenida, particularmente para el gen *blaCTX-M-15* es modesta, en el presente estudio se quiso explorar, describir y comparar algunas características de los bebés que podrían resultar características relacionadas a la concordancia y posible transmisión de estos genes madre-bebé. Probablemente, debido al número de sujetos no se tuvo el poder estadístico suficiente para encontrar diferencias significativas; sin embargo, analizar estas características nos podría dar un indicio de la propagación de la RAM intrahogar.

9.2.1. Tipo de parto y concordancia de *blaCTX-M-15* en los pares madre-bebé

Múltiples investigaciones han debatido el impacto del tipo de parto (vaginal o cesárea) sobre la microbiota del recién nacido. Existen diferencias durante la colonización inicial de la microbiota intestinal de los bebés dependiendo del parto vaginal (predominando especies como *Bifidobacterium* y *Bacteroides*), o cesárea (*Staphylococcus*, *Enterococcus*). Sin embargo, se ha reportado que los bebés nacidos por cesárea o vía vaginal fueron colonizados casi por la misma especie bacteriana al cabo de 6 meses [59-61]. De la misma manera, el enfoque del tipo de parto centrado en la adquisición de GRA no ha detectado diferencias significativas. El estudio de Danino *et al.*, a pesar de la identificación de la misma cepa en ambos miembros familiares, no logró encontrar diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,4$) con respecto al parto vaginal; por lo que, no lo consideran como factor de transmisión de BLEE [58]. Asimismo, Zhang *et al.* [62] descartaron en su investigación la adquisición de genes de resistencia en neonatos por medio del parto vaginal.

En la presente investigación, las muestras de los bebés se encontraban en un rango de edad entre 0 y 16 meses (es decir, para algunas muestras de bebés ha pasado más tiempo desde el parto). A pesar de que no se pudo obtener la información del tipo de parto de todos los bebés, es resaltante que, en los tres casos analizados (concordancia positiva, concordancia negativa y discordantes), la mayoría de los bebés nacieron por parto vaginal. Sin embargo, la mayoría de aquellos que nacieron por cesárea pertenecieron a pares concordantes negativos. No obstante, no se evidenció una significancia estadística ($p = 0,115$); por lo que, hay correspondencia con las investigaciones mencionadas anteriormente sobre la no relación del tipo de parto del bebé con la concordancia positiva en la presencia de GRA entre las madres y sus bebés.

9.2.2. Sexo del bebé y concordancia de *blaCTX-M-15* en los pares madre-bebé

Las personas de diferentes sexos tienen diferentes riesgos de sufrir infecciones bacterianas, por tanto, podrían estar afectados de distinta manera por la RAM [63]. El estudio de Sosa-Moreno *et al.* [64] evaluó ciertas características clínicas de mujeres embarazadas y lactantes, entre ellas el sexo del bebé. Sin embargo, el análisis de las

muestras de bebés, en el que reportaron que los hombres tuvieron un mayor número de genes de resistencia antimicrobiana que las mujeres, no fue estadísticamente significativo ($p = 0,06$).

Asimismo, en el presente estudio, entre aquellos que presentaron concordancia positiva, el 60% fueron varones; mientras que, entre aquellas parejas concordantes negativas, los varones representaron el 53,85%; sin embargo, entre los pares discordantes, la mayoría pertenecen al género femenino (56,35%). A pesar de ello, no se reporta una relación significativa ($p > 0,05$) entre el sexo del bebé con la concordancia positiva para este gen en los pares madre-bebé.

9.2.3. Edad del bebé, lactancia y concordancia de *blaCTX-M-15* en los pares madre-bebé

Durante los primeros meses de vida, los bebés se alimentan de leche materna. Zhang, *et al.* [62] encontraron que los genes de resistencia en los recién nacidos pueden originarse a partir del calostro, logrando detectar GRA en el 85,4% del calostro, coincidiendo con los GRA en las heces de recién nacidos de 3 días. En contraste, la investigación de Nadimpalli, *et al.* [65] determinó que la lactancia materna confiere una protección significativa contra la colonización intestinal incidente de los niños con BLEE-*E coli*. Por lo que, sugieren continuar con la lactancia después de los 6 meses de vida. Esta protección puede explicar la poca prevalencia de estos GRA en los bebés menores de este estudio.

En la presente investigación se clasificaron a los bebés de acuerdo a la edad estimada del periodo de destete (menores y mayores de 6 meses) y se observó que, de los pares concordantes positivos, fueron los bebés menores de 6 meses quienes representaron la menor proporción (40,00%). A pesar del amplio rango de edad, la mayoría de los niños todavía lactaban, y probablemente debido a esta falta de variabilidad; no se encontró diferencias significativas en relación a la lactancia materna sobre la concordancia positiva en la presencia de ambos genes ($p = 0,152$). Por ende, sería interesante seguir investigando la variable lactancia y su relación con la concordancia de ARGs entre madres y sus bebés.

9.2.4. Edad del bebé, alimentación complementaria y concordancia de *blaCTX-M-15* en los pares madre-bebé

Cuando el bebé deja de recibir lactancia materna y empieza a recibir alimentación complementaria, la microbiota de este mismo suele parecerse más a la de la madre a cabo de los 3 años de edad [66]. Esto se debe al aumento de la ingesta de macromoléculas como proteínas, carbohidratos, lípidos y fibras. En un ensayo de control aleatorio, Qasem *et al.* [67] demostraron que la introducción de alimentos sólidos condujo a un aumento en la diversidad de la microbiota intestinal. Por otra parte, la presencia de bacterias relacionadas a la leche materna como *Bifidobacterium* y *Lactobacillaceae* se reduce, mientras que en el destete aparecen bacterias como *Bacteroides* y *Ruminococcus*, que son capaces de fermentar y digerir los nutrientes más complejos [60, 68].

Este patrón de alimentación se ve alterado conforme la edad del bebé aumenta. Además, si bien el impacto de la edad no era estadísticamente significativo en el presente estudio, se muestra una mayor proporción de pares concordantes positivos en los bebés mayores de 6 meses con respecto a los menores. En los tres grupos analizados, la mayoría de los bebés recibían alimentación complementaria (73,33%, 71,15% y 68,75%, respectivamente). Sin embargo, al realizar el análisis estadístico, se obtuvo un valor $p = 0,954$; por ende, se rechaza una posible relación entre la alimentación complementaria por parte del bebé con una concordancia positiva entre la presencia de este gen en el par madre - bebé.

9.3. Presencia simultánea de ambos genes

En la presente investigación, se reporta la presencia de ambos genes de resistencia simultáneamente en una misma muestra; y esto sucedió en 44/198 casos (22,22%).

Recientemente, se ha reportado la presencia de especies de BLEE en simultáneo con *floR* en el ADN de las muestras [69-71]. En la investigación de Yuan D, *et al.* [69] tomaron *Pasteurella aerogenes* aislada de muestras de aves de corral y, en la secuencia del genoma SF190908, identificaron cuatro grupos de genes de resistencia a antibióticos, uno de los cuales contenía el gen *blaVEB* (BLEE); además de un plásmido (pRCAD0752PA-1) que contenía el gen *floR*.

Asimismo, se ha reportado más específicamente la presencia simultánea de *blaCTX-M* y *floR* [70, 71]. Se ha postulado que los bacteriófagos también estarían involucrados en la propagación de genes de resistencia, por lo que, al comparar la abundancia de estos en ADN plasmídico y del bacteriófago proveniente de muestras fecales de pollo, se encontró la presencia de doce genes de resistencia a antibióticos, entre ellos, *blaCTX-M* y *floR* [70]. Por otra parte, al analizar muestras fecales de gansos, se reportó un aislado que albergaba el plásmido pZPK-H5 con los genes *blaCTX-M-1* y *floR* [71].

Los estudios anteriores reflejan la convivencia *blaCTX-M* y *floR* en muestras provenientes de animales. Sin embargo, a pesar de que *blaCTX-M-15* ha demostrado alta prevalencia en humanos, no se ha encontrado una amplia evidencia de la coexistencia entre *blaCTX-M* y *floR* en muestras provenientes de humanos. El estudio de Wu, *et al.*, notificaron un caso de coexistencia entre *blaCTX-M* y *floR* en una cepa de *K. pneumoniae* extremadamente resistente (LSK16), perteneciente a un paciente varón de 73 años hospitalizado en el Hospital Central de Lishui en China [72].

Como se mencionó anteriormente, este estudio evidenció la coexistencia de estos genes de resistencia en muestras tanto de madres como de bebés. Aunque su presencia se reportó solo en el 22.22% de los casos, este hallazgo es un indicativo alarmante que sugiere la necesidad de un seguimiento más exhaustivo y de continuar investigando la dinámica de estos y otros genes de resistencia antimicrobiana (RAM).

9.4. Variabilidad de la presencia de los genes estudiados en las muestras de bebés

Reportamos que, en 25/132 oportunidades, hubo una variación en la presencia de los genes de resistencia en los bebés, cambiando de positivo a negativo. Estos cambios se mostraron más en *blaCTX-M-15* (22,73%) que en *floR* (15,15%). Asimismo, la *Figura 6* permite observar que el gen *floR* fue más prevalente en el tiempo, mientras que los patrones de aparición del gen *blaCTX-M-15* fueron más efímeros. A continuación, mencionamos las posibles razones de ello.

Los resultados presentados mostraron que el patrón de aparición de *blaCTX-M-15* en las muestras de bebés solían ser más efímeras; mientras que *floR* fue más prevalente en el

tiempo. Esta diferencia podría estar relacionada al tipo de bacteria en donde se alberga cada uno de los genes, independientemente. En este grupo de niños, se ha reportado la presencia de *E. coli* enterotóxica (ETEC) [73]. Asimismo, la investigación de Park *et al.* [74] en Corea, encontró que todos los aislados *E. coli* entero agregativa (EAEC) portaban el gen *blaCTX-M-14* y todos los aislados ETEC el gen *blaCTX-M-15*. Asimismo, se ha visto que la duración media de eliminación de ETEC ha sido 10.6 días (mostrando un rango de entre 1 a 37 días), independientemente si los bebés estudiados tuvieron episodios de diarrea o no [73]. Esto podría sugerir que las bacterias que albergan este gen de resistencia fueron eliminadas de la microbiota en un periodo de tiempo relativamente corto con respecto a las siguientes tomas de muestra. De esta manera, se sugiere que, si bien ambos genes han sido encontrados en cepas de *E. coli* [6, 31, 32, 40-42], puede ser que *blaCTX-M-15* tienda a encontrarse más en *E. coli* patogénica, mientras que *floR* en *E. coli* y otras bacterias comensales, por lo que ésta última permanecería más tiempo en la microbiota intestinal de los bebés.

Otra posible explicación a la aparición y desaparición de estos genes (*blaCTX-M-15* y *floR*) entre periodos de muestreo consecutivos se basa en la falta de transferencia horizontal de estos genes entre las bacterias de la microbiota. En general, se cree que los genes de resistencia han evolucionado gradualmente a partir de genes con otras funciones [75]. A partir de este gen cromosómico inmóvil, normalmente hay una evolución gradual que conduce a la resistencia adquirida en un patógeno, donde el gen debe reubicarse en un elemento que pueda moverse de forma autónoma entre las células, como un plásmido [76]. Entonces, puede que en el momento del muestreo el gen de resistencia no se haya encontrado en un plásmido capaz de movilizarse hacia otra bacteria y continuar con el fenómeno de resistencia adquirida.

9.5. Otras características relacionadas a la presencia de los genes estudiados en los bebés

9.5.1. Consumo de antibióticos de los bebés

El uso excesivo de antibióticos genera cambios en el microbioma, lo que lo convierte en un reservorio de bacterias portadoras de GRA [5]. El estudio de Kalter *et al.* [9] determinó que el uso de antibiótico por parte de los niños en los 3 meses anteriores aumentó el riesgo

de ser portadores de *E. coli* resistente a la ampicilina, y el uso de sulfamidas mostró una relación dosis-respuesta con la resistencia al sulfametoxazol. Esto se torna relevante en este estudio debido a la presencia de muestras de bebés positivas para los genes de resistencia estudiados en bebés que consumieron antibióticos antes o dentro del periodo del presente estudio..

Por otro lado, en otros estudios, se ha reportado que el uso de antibióticos por parte de los miembros de la familia aumentó el riesgo de resistencia en los bebés; probablemente provocado por una contaminación del hogar con bacterias resistentes [9, 11]. Esto podría relacionarse con aquellas muestras positivas pertenecientes a bebés que no estuvieron expuestos a antibióticos hasta el momento de la toma de muestra. Asimismo, en ese caso se podría inferir que estos GRA se adquirieron mediante otro factor.

En Perú, los antibióticos se pueden adquirir sin receta médica [9], es por ello es necesario que se conozcan las consecuencias del uso indiscriminado de antibióticos. Además, reducir su uso en niños y miembros familiares podría ser una medida de protección importante.

9.5.2. Hábitos de higiene

Un estudio en Perú evidenció que cepas de *E. coli* cultivadas de las manos de las madres fueron más frecuentemente resistentes a la ampicilina, sulfametoxazol y ciprofloxacino en Chíncha [9]. Asimismo, Carvalho *et al.* [19] demostró que aquellas madres portadoras que tenían un lavado de manos solamente ocasional se relacionaron con la presencia de *blaCTX-M-15* o *blaNDM* en muestras fecales de sus bebés. Por lo que, los hábitos de higiene tienen un rol importante en la prevención de la adquisición de GRA.

En este estudio, se observa que la mayoría de las madres reportan tener buenos hábitos de higiene en relación al lavado de manos y de alimentos. Por otro lado, la edad promedio de los bebés estudiados fue de 7 meses, edad en la cual estos comienzan a tener una mayor movilidad (por ejemplo: gatear y jugar), entrando así en mayor contacto con su entorno y, exponiéndose a una posible adquisición de GRA, en casos de hogares con saneamiento básico deficiente.

Cabe destacar que, al ser un tema de higiene personal, es difícil de corroborar la veracidad de las respuestas brindadas.

9.5.3. Crianza de animales (pollos)

Se ha descrito anteriormente la presencia de GRA en aves de corral [6, 29, 30, 37, 40], principalmente para el gen *floR*. En este sentido, se analizó la crianza de pollos como portadores de GRA, puesto que son animales de consumo habitual y de crianza para algunos hogares.

El uso de antibióticos en la crianza de pollos es un punto crítico en la adquisición de GRA para estos mismos y su entorno. Se ha evidenciado que el florfenicol se emplea con fines terapéuticos [39] y como promotor del crecimiento, y está disponible en varias premezclas de alimentos comerciales, lo cual se ha relacionado con la presencia del gen *floR* en pollos [6]. Otro estudio, reportó que la portación de *E. coli* resistente a fármacos en gallinas de mercado fue significativamente mayor que en las gallinas domésticas [9].

En la presente investigación se tuvieron pocos hogares con presencia de pollos; y el porcentaje de muestras de bebés que resultaron positivas tanto en hogares con crianza y sin crianza fue similar. Sin embargo, no se reportó información referente de los cuidados en la crianza de los pollos, es decir, si es que fueron tratados de manera doméstica o para fines de producción avícola; por ende, no se conoce el estado de uso de antibióticos en estos. Por lo que, con la información disponible, no se pudo establecer una relación entre la crianza de pollos en el hogar y la presencia de los GRA estudiados en las muestras de los bebés.

10. CONCLUSIONES

1. El presente estudio logró identificar la presencia de genes de resistencia (*blaCTX-M-15* y *floR*) en las muestras fecales de las madres y sus bebés menores de 2 años; siendo *floR* el gen más prevalente (55,56% en bebés y 53,54% en madres); mientras que para *blaCTX-M-15* la prevalencia fue menor (31,31% para ambos sujetos estudiados).
2. Asimismo, se determinó una concordancia ligeramente positiva entre la presencia del gen *blaCTX-M-15* en muestras de heces de madres y sus bebés menores de 2 años ($p = 0,007$). En el caso del gen *floR*, no se identificó una concordancia significativa ($p = 0,150$).
3. Se establecieron las características de los bebés relacionadas a la concordancia de *blaCTX-M-15* (tipo de parto, sexo, edad, lactancia, alimentación complementaria), sin embargo, no se asoció significativamente con ninguna de las características analizadas (valor de $p > 0,05$; en todos los casos).

11. FORTALEZAS

El presente estudio evaluó la presencia de 2 GRA en muestras de heces pareadas de madres y sus bebés, con el fin de determinar una posible concordancia. La principal fortaleza de la investigación ha sido el emparejamiento de muestras de heces de madres y sus bebés durante 3 meses continuos.

Por otra parte, debido a que se tuvo disponible información de ciertas características relacionadas al bebé como el tipo de parto, sexo, patrón de alimentación y la edad, se pudo realizar un análisis estadístico para evidenciar una posible relación con la concordancia de la presencia de los GRA estudiados en los pares de madre-bebé y, de esta manera, realizar un análisis más completo del perfil de estos sujetos ante *blaCTX-M-15* y *floR*.

Finalmente, consideramos que la detección de los genes de resistencia antimicrobiana *blaCTX-M-15* y *floR* por medio de la técnica CRISPR Cas12a es un método eficaz debido a su alta sensibilidad, especificidad y rapidez, a comparación de otras técnicas de detección, además de su capacidad de brindar datos cualitativos y cuantitativos. Todo ello siendo útil en la vigilancia epidemiológica para controlar la propagación de la RAM.

12. LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES

Durante esta investigación, si bien se realizó el emparejamiento de las muestras de madres y sus bebés, no se tuvo acceso a las posibles colonias involucradas en la transferencia de genes para ambos sujetos de estudio, lo cual pudo haber complementado la información de la microbiota intestinal que pueden compartir las madres y sus bebés. Por ende, se recomienda realizar secuenciamiento de ADN y genotipificación de los GRA para obtener una visión más profunda del panorama.

Por otra parte, las muestras utilizadas fueron parte de un estudio madre, específicamente muestras recolectadas entre 2016 y 2019; por lo que, a pesar de considerarse medianamente antiguas, no desencadenó mayores inconvenientes para el objetivo de esta investigación. No obstante, hubiera sido ideal obtener muestras más recientes para evaluar las prevalencias actuales de *blaCTX-M-15* y *floR* en la población estudiada.

Asimismo, se reconoce que es complicado la recolección de muestras de heces en la población debido a una incomodidad y vergüenza de por medio. Es por ello, que se complicó obtener un seguimiento mensual a largo plazo. Por ejemplo, hubo madres de las cuales se tenían muestras de dos meses consecutivos, pero no se contaba con la muestra del tercer mes; por lo que, los pares en cuestión fueron descartados para el estudio. De esta manera, se recomienda realizar un seguimiento con un diseño más apropiado con respecto a la incidencia acumulada de los GRA en los sujetos de estudio con el fin de comprender mejor las fluctuaciones en la microbiota intestinal materna y de sus lactantes.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol.* 2020 Jan;88(1):26-40. DOI: 10.1007/s00239-019-09914-3.
2. World Health Organization. Antimicrobial resistance. 17 november 2021. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
3. Lasemi, E., Navi, F., Lasemi, R., & Lasemi, N. Complications of antibiotic therapy and introduction of nanoantibiotics. In *A Textbook of Advanced Oral and Maxillofacial Surgery Volume 3.* IntechOpen.(2016). DOI: 10.5772/63907
4. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet.* 2022;399(10325):629–55. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
5. Anthony WE, Burnham CAD, et. al. The Gut Microbiome as a Reservoir for Antimicrobial Resistance. *The journal of infectious diseases (Online University of Chicago Press)/The Journal of infectious diseases [Internet].* 2020;223:S209–13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8206794/>
6. Murray MJ, Salvatierra G, Dávila-Barclay A, Ayzanoa B, Castillo-Vilcahuaman C, Huang M, et al. Market Chickens as a Source of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in a Peri-Urban Community in Lima, Peru. *Frontiers in Microbiology.* 2021 Mar 2. DOI: 10.3389/fmicb.2021.635871
7. Alzamora MC, Echevarría AC, Ferraro VM, et al. Resistencia antimicrobiana de cepas comensales de *Escherichia coli* en niños de dos comunidades rurales peruanas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.* 2019 Sep 1. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v36n3/a12v36n3.pdf>
8. Calderón D, Cardenas P, Belén Prado-Vivar, Graham JP, Trueba G. A longitudinal study of dominant *E. coli* lineages and antimicrobial resistance in the gut of children living in an upper middle-income country. *Journal of global antimicrobial resistance.* 2022;29:136–40. DOI: 10.1016/j.jgar.2022.03.002
9. Kalter, Henry D., Robert H. Gilman, Lawrence H. Moulton, et al. Risk Factors for Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Carriage in Young Children in Peru: Community-Based Cross-Sectional Prevalence Study. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2010;82(5):879-888. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0143>
10. PAHO. Infographic. Causes of antibiotic resistance; 2015. Disponible en: <https://www.paho.org/en/documents/infographic-causes-antibiotic-resistance-2015>
11. Lietzau S, Raum E, H. von Baum, Marre R, Brenner H. Household contacts were key factor for children’s colonization with resistant *Escherichia coli* in community setting. *Journal of Clinical Epidemiology.* 2007 Nov 1. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2007.01.016
12. Li W, Terhi Tapiainen, Brinkac LM, Lorenzi H, Moncera KJ, Tejesvi MV, et al. Vertical Transmission of Gut Microbiome and Antimicrobial Resistance Genes in Infants Exposed to Antibiotics at Birth. *The Journal of Infectious Diseases.* 2021 Oct 1. DOI: 10.1093/infdis/jiaa155
13. Wei W, Endang Sutriswati Rahayu, See TT, Sherwin Kuah, Salminen S, Nakayama J, et al. Indonesian children fecal microbiome from birth until weaning was different from microbiomes of their mothers. *Gut microbes.* 2020;12(1):1761240–0. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1761240>

14. Tanaka M, Masafumi Sanefuji, Seiichi Morokuma, et al. The association between gut microbiota development and maturation of intestinal bile acid metabolism in the first 3 y of healthy Japanese infants. *Gut microbes*. 2020;11(2):205–16. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1650997>
15. Nilsen M, Asima Lokmic, Inga Leena Angell, et al. Fecal Microbiota Nutrient Utilization Potential Suggests Mucins as Drivers for Initial Gut Colonization of Mother-Child-Shared Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2021;87(6). DOI: 10.1128/AEM.02201-20
16. Reh binder E, Carlsen KH, Anne Cathrine Staff, Inga Leena Angell, Landrø L, Hilde K, et al. Is amniotic fluid of women with uncomplicated term pregnancies free of bacteria? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2018;219(3):289.e1–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.05.028>
17. Lital Ashtamkar Matok, Azrad M, Leshem T, Anan Abuzahya, Thanaa Khamaisi, Smolkin T, et al. Mother-to-Neonate Transmission of Antibiotic-Resistant Bacteria: A Cross-Sectional Study. *Microorganisms*. 2021; 9(6): 1245. DOI: 10.3390/microorganisms9061245
18. Dh rati Patangia, Ryan C, Dempsey EM, Stanton C, R. Paul Ross. Vertical transfer of antibiotics and antibiotic resistant strains across the mother/baby axis. *Trends in Microbiology*. 2022 Jan 1;30(1):47–56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.05.006>
19. Carvalho, M.J., Sands, K., Thomson, K. et al. Antibiotic resistance genes in the gut microbiota of mothers and linked neonates with or without sepsis from low- and middle-income countries. *Nat Microbiol* 7, 1337–1347 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01184-y>
20. Lerminiaux N, y Cameron A. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*. 2018; 65(1): 34-44. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
21. Giannantoni et al. Biology System Description Language (BiSDL): a modeling language for the design of multicellular synthetic biological systems. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2024;25(1). Disponible en: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-024-05782-x#citeas>
22. Zhang P, Xu P, Xia Z, et al. Combined treatment with the antibiotics kanamycin and streptomycin promotes the conjugation of *Escherichia coli*. *Fems Microbiology Letters*. 2013;348(2):149–56. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12282>
23. Xia Z, Wang J, Hu W, Liu H, Gao X, Wu Z, et al. Improving conjugation efficacy of *Sorangium cellulosum* by the addition of dual selection antibiotics. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2008;35(10):1157–63. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0395-9>
24. Lopatkin, A., Huang, S., Smith, R. et al. Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics. *Nat Microbiol* 1, 16044 (2016). DOI: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.44>
25. Gill-Langarica, Homar René, Mayek-Pérez N. Los Marcadores Moleculares en el Mejoramiento Genético de la Resistencia a Enfermedades del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Aplicaciones y Perspectivas. *Revista mexicana de fitopatología*. 2023. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092008000200009

26. Laurent Poirel, Marek Gniadkowski, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002 Dec 1. DOI: 10.1093/jac/dkf240
27. Hernández E, Araque M, Millán Y et al. Prevalencia de β -lactamasa CTX-M-15 en grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena aisladas en pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Investigación Clínica*. 2014. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332014000100005
28. Castanheira M, Simmer PJ, Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-antimicrobial resistance*. 2021 Jul 12. DOI: 10.1093/jacamr/dlab092
29. Fischer J, Rodríguez I, Baumann B, et al. bla CTX-M-15-carrying *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from livestock and food in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014. Disponible en: <https://academic.oup.com/jac/article/69/11/2951/2911267>
30. Irrgang A, Falgenhauer L, Fischer J, Ghosh H, Elisabet Guiral, Guerra B, et al. CTX-M-15-Producing *E. coli* Isolates from Food Products in Germany Are Mainly Associated with an IncF-Type Plasmid and Belong to Two Predominant Clonal *E. coli* Lineages. *Frontiers in Microbiology*. 2017 Nov 21. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02318>
31. Brisse S, Diancourt L, et al. Phylogenetic Distribution of CTX-M- and Non-Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates: Group B2 Isolates, Except Clone ST131, Rarely Produce CTX-M Enzymes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(9):2974–81. DOI: 10.1128/JCM.00919-12
32. Higgins O, Chueiri A, O'Connor L, et al. Portable Differential Detection of CTX-M ESBL Gene Variants, bla CTX-M-1 and bla CTX-M-15, from *Escherichia coli* Isolates and Animal Fecal Samples Using Loop-Primer Endonuclease Cleavage Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Microbiology spectrum*. 2022;11(1). DOI: 10.1128/spectrum.03316-22.
33. Ramadan AA, Abdelaziz NA, et al. Novel blaCTX-M variants and genotype-phenotype correlations among clinical isolates of extended spectrum beta lactamase-producing *Escherichia coli*. *Scientific Reports*. 2019 Mar 12;9(1). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39730-0>
34. Barreto F, Ribeiro C, Barcellos R, Dalla T. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2016;1449:48–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.024>
35. Couto N, et al. Acquisition of the fexA and cfr genes in *Staphylococcus pseudintermedius* during florfenicol treatment of canine pyoderma. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2016;7:126–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.08.008>
36. Wang YH, Li XN, Chen C, et al. Detection of floR gene and active efflux mechanism of *Escherichia coli* in Ningxia, China. *Microbial Pathogenesis*. 2018 Apr 1;117:310–4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.042>
37. Li P, Zhu T, Zhou D, Lu W, et al. Analysis of Resistance to Florfenicol and the Related Mechanism of Dissemination in Different Animal-Derived Bacteria.

- Frontiers in Cellular and Infection Microbiology; 2020 Jul 31;10. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00369>
38. Ying Y, Wu F, Wu C, Jiang Y, et al. Florfenicol Resistance in Enterobacteriaceae and Whole-Genome Sequence Analysis of Florfenicol-Resistant *Leclercia adecarboxylata* Strain R25. International Journal of Genomics. 2019 Oct 1;2019:1–10. DOI: 10.1155/2019/9828504
 39. BASE DE DATOS DE LAS NECESIDADES DE LMR DE LOS PAÍSES, PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS, COMITÉ DEL CODEX SOBRE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN LOS ALIMENTOS, Fao.org. 2018. Disponible en: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/ar/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fmeetings%252FCX-730-24%252FWD%252Frv24_11s.pdf
 40. Moawad AA, Hotzel H, Hafez HM, et al. Occurrence, Phenotypic and Molecular Characteristics of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Healthy Turkeys in Northern Egypt. Antibiotics. 2022;11(8):1075–5. DOI: 10.3390/antibiotics11081075.
 41. Arcangioli M, Leroy-Sétrin S, Martel JL, Chaslus-Dancla E. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. Fems Microbiology Letters. 1999;174(2):327–32. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13586.x.
 42. Bolton LF, Kelley LC, Lee MD, et al. Detection of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype typhimurium DT104 Based on a Gene Which Confers Cross-Resistance to Florfenicol and Chloramphenicol. Journal of Clinical Microbiology. 1999;37(5):1348–51. DOI: 10.1128/JCM.37.5.1348-1351.1999.
 43. Miranda M, Canales F, Paredes-Godoy O, et al. Characterization of metal(loid)s and antibiotic resistance in bacteria of human gut microbiota from chronic kidney disease subjects. Biological Research. 2022;55(1). DOI: 10.1186/s40659-022-00389-z
 44. Lu J, Zhang J, Xu L, Liu Y, et al. Spread of the florfenicol resistance floR gene among clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. Antimicrobial Resistance and Infection Control 2018 Nov 1;7(1). DOI: <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0415-0>
 45. QIAamp® Fast DNA Stool Mini Handbook. QIAGEN. Qiagen.com. 2020. Disponible en: <http://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=2a3f2c0b-2e8a-49fd-b442-829108ae1a4a&lang=en>
 46. Hirak Ranjan Dash, Shrivastava P, Das S. Principles and Practices of DNA Analysis: A Laboratory Manual for Forensic DNA Typing. SpringerLink. 2020.
 47. PCR Troubleshooting. Caister.com. 2024. Disponible en: <https://www.caister.com/highveld/pcr/pcr-troubleshooting.html#:~:text=The%20amount%20of%20total%20DNA,of%20la rge%20Taq%20polymerase%20molecules.>
 48. Vargas M, PCR acoplada a CRISPR-Cas12A para la detección de los genes de resistencia CTX-M-15 y floR en *Escherichia coli*: prueba de concepto [Tesis de Maestría]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2023. Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/15029>

49. Mohamad Adam Bujang, Nurakmal Baharum. Guidelines of the minimum sample size requirements for Cohen's Kappa. ResearchGate. unknown; 2017. DOI:10.2427/12267
50. May J, Looney S. Biometrics & Biostatistics Sample Size Charts for Spearman and Kendall Coefficients;11(2):2020. DOI: 10.37421/jbmbms.2020.11.440
51. Kilic S. Kappa Test. ResearchGate. ScopeMed Publishing; 2015. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/283870850_Kappa_Test
52. Díaz Andrea M, Celis Juliana O, Hernández Bulmaro J, Mendoza Mixtli V, León César D. Aplicación del coeficiente de correlación de Spearman en un estudio de fisioterapia. Disponible en: <https://www.fcfm.buap.mx/SIEP/2021/Extensos%20Carteles/Extenso%20Juliana.pdf>
53. StataCorp. 2019. Stata Statistical Software: Release 16. College Station, TX: StataCorp LLC.
54. Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 8: Qualitative data - tests of association. Critical Care. 2003;8(1):46–6. doi: 10.1186/cc2428
55. BERGERI, Michel R. POUR TOUT SAVOIR OU PRESQUE SUR LE COEFFICIENT KAPPA. ResearchGate. unknown; 2002. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/237658832_POUR_TOUT_SAVOIR_OU_PRESQUE_SUR_LE_COEFFICIENT_KAPPA
56. Ramadan H, Jackson CR, Frye JG, Hiott LM, Samir M, Awad A, et al. Antimicrobial Resistance, Genetic Diversity and Multilocus Sequence Typing of Escherichia coli from Humans, Retail Chicken and Ground Beef in Egypt. Pathogens. 2020 May 8;9(5):357–7. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9050357>
57. Mazumder R, et al. High Prevalence of blaCTX-M-15 Gene among Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Escherichia coli Isolates Causing Extraintestinal Infections in Bangladesh. Antibiotics. 2020;9(11):796–6. DOI: 10.3390/antibiotics9110796
58. Danino D, et al. Mother-to-child transmission of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. The Journal of hospital infection/Journal of hospital infection. 2018;100(1):40–6. DOI: 10.1016/j.jhin.2017.12.024
59. Shao Y, et al. Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. Nature. 2019;574(7776):117–21. DOI: 10.1038/s41586-019-1560-1
60. Biagioli V, et al. From Birth to Weaning: A Window of Opportunity for Microbiota. Nutrients. 2024;16(2):272–2. DOI: 10.3390/nu16020272
61. Rutayisire E, et al. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. BMC gastroenterology. 2016;16(1). DOI: 10.1186/s12876-016-0498-0
62. Zhang K, et al. Antibiotic resistance genes in gut of breast-fed neonates born by caesarean section originate from breast milk and hospital ward air. BMC Microbiology. 2022;22(1). DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02447-8>
63. Gautron JMC, et al. Using intersectionality to study gender and antimicrobial resistance in low- and middle-income countries. Health policy and planning. 2023;38(9):1017–32. DOI: 10.1093/heapol/czad054

64. Sosa-Moreno A, et al. Perinatal risk factors for fecal antibiotic resistance gene patterns in pregnant women and their infants. *PloS one*. 2020;15(6):e0234751–1. DOI: 10.1371/journal.pone.0234751
65. Nadimpalli M, et al. Effects of breastfeeding on children’s gut colonization with multidrug-resistant Enterobacterales in peri-urban Lima, Peru. *Gut microbes*. 2024;16(1). DOI: 10.1080/19490976.2024.2309681
66. Schwab C. The development of human gut microbiota fermentation capacity during the first year of life. *Microbial Biotechnology*. 2022;15(12):2865–74. DOI: 10.1111/1751-7915.14165
67. Qasem W, et al. Assessment of complementary feeding of Canadian infants: effects on microbiome & oxidative stress, a randomized controlled trial. *BMC pediatrics*. 2017;17(1). DOI: 10.1186/s12887-017-0805-0
68. Arroyo G., et al. Efecto de los distintos pasos del procesamiento de la leche materna en las concentraciones de IgA, IgM y lactoferrina. *Amadrentar. Medicina*. 2017; 12 : 443–445. DOI: 10.1089/bfm.2016.0154.
69. Yuan D, et al. Emergence of a floR-carrying plasmid in extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Pasteurella aerogenes*, isolated from an avian species in China. *Poultry science*. 2022;101(12):102207–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102207>
70. Yang Y, et al. Exploring the profile of antimicrobial resistance genes harboring by bacteriophage in chicken feces. *Science of the total environment* [Internet]. 2020;700:134446–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134446>
71. Kurittu P, et al. Plasmids conferring resistance to extended-spectrum beta-lactamases including a rare IncN+IncR multireplicon carrying blaCTX-M-1 in *Escherichia coli* recovered from migrating barnacle geese (*Branta leucopsis*). *Open research Europe*. 2021;1:46–6. DOI: 10.12688/openreseurope.13529.1
72. Wu, et al. Genomic characterisation of a colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 strain co-producing KPC-2, FloR, CTX-M-55, SHV-12, FosA and RmtB causing a lethal infection. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2019;19:78–80. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.023>
73. Pajuelo MJ, L, et al. Epidemiology of enterotoxigenic *Escherichia coli* and impact on the growth of children in the first two years of life in Lima, Peru. *Frontiers in public health*. 2024;12. DOI: 10.3389/fpubh.2024.1332319
74. Park J, et al. Co-infection With Chromosomally-Located blaCTX-M-14 and Plasmid-Encoding blaCTX-M-15 in Pathogenic *Escherichia coli* in the Republic of Korea. *Frontiers in microbiology*. 2020;11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.545591
75. Morar M, Wright GD. The Genomic Enzymology of Antibiotic Resistance. *Annual review of genetics*. 2010;44(1):25–51. DOI: 10.1146/annurev-genet-102209-163517
76. Larsson J, Flach CF. Antibiotic resistance in the environment. *Nature reviews Microbiology*. 2021;20(5):257–69. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>

ANEXOS

Anexo 1: Ficha socio económica extraída del estudio madre

Versión 3: 08Nov2015

Parte B. Datos básicos

Registro de encuesta		Respuestas			
B-1	Identificación de entrevistadora (Iniciales)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
B-2	Fecha (DD-MMM-20AA)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Datos de quien responde a la encuesta		Respuestas	
B-3	Nombres completos	<input type="text"/>	
B-4	Apellidos completos	<input type="text"/>	
B-5	Sexo	01	Masculino
		02	Femenino
		<input type="text"/>	<input type="text"/>

Dirección de la vivienda		Respuestas	
B-6	Departamento	<input type="text"/>	
B-7	Provincia	<input type="text"/>	
B-8	Distrito	<input type="text"/>	
B-9	Comunidad (AA.LL.HH / PP.JJ / Urb. / Barrio)	<input type="text"/>	
B-10	Tipo de vía (Av. / Ca. / Jr. / Prtg.)	<input type="text"/>	
B-11	Manzana	<input type="text"/>	
B-12	Lote / número	<input type="text"/>	
B-13	Número teléfono/celular	<input type="text"/>	<input type="text"/>
B-14	¿Tiene planes de mudarse en el próximo año?	00	No
		01	Si
		<input type="text"/>	<input type="text"/>

GPS		Respuestas			
B-15	S	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
B-16	W	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
B-17	Altura	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	

Código del participante:

1

Parte D. Evaluación de PPI (Progress out of Poverty Index)

PPI: Miembros del hogar		Valor	Respuestas	Puntaje
<i>Instrucciones: Marque con un círculo la respuesta correcta de cada pregunta, y registre el puntaje en la última columna.</i>				
D-1	¿Cuántos miembros familiares tiene el hogar?	00	Siete o más	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		07	Seis	
		12	Cinco	
		17	Cuatro	
		22	Tres	
		27	Dos	
		34	Uno	
D-2	Durante la semana pasada: ¿Cuántos miembros del hogar de 14 años y más de edad tuvieron algún trabajo? (Sin contar los quehaceres del hogar)	00	Ninguno o uno	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		02	Dos	
		06	Tres	
		09	Cuatro o más	
D-3	¿Cuál es el último año o grado de estudios y nivel que aprobó la jefa/esposa del hogar?	00	Sin nivel, o educación inicial	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		03	Primaria incompleta	
		04	Primaria completa, o secundaria incompleta	
		06	No hay jefa/esposa del hogar	
		07	Secundaria completa, o superior no universitaria incompleta	
		13	Superior no universitaria completa o más	

PPI: Vivienda		Valor	Respuestas	Puntaje
<i>Instrucciones: Marque con un círculo la respuesta correcta de cada pregunta, y registre el puntaje en la última columna.</i>				
D-4	¿Cuántas habitaciones se usan exclusivamente para dormir?	00	Ninguno	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		02	Uno	
		04	Dos	
		08	Tres o más	
D-5	¿Cuál es el material predominante de las paredes exteriores?	00	Tapla, piedra con barro	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		00	Estera, quincha (caña con barro)	
		00	Adobe	
		00	Cartón, maderba, Panel, Nordex, Triplay, u otro	
		04	Madera	
		04	Piedra o sillar con cal o cemento	
		04	Ladrillo	
		04	Bloque de cemento	

Código del participante:

2

D-6	¿Qué tipo de combustible usa usted con mayor frecuencia para cocinar sus alimentos?	00	Carbón, Kerosene u otro: _____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		03	Leña	
		07	Gas (GLP o Natural), Electricidad, o no cocinan	

PPI: Pertenencias del hogar		Valor	Respuestas	Puntaje
<i>Instrucciones: Marque con un círculo la respuesta correcta de cada pregunta, y registre el puntaje en la última columna.</i>				
D-7	¿El hogar tiene una refrigeradora/congeladora?	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		03	SI	
D-8	¿El hogar tiene una licuadora?	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		06	SI	
D-9	¿Cuántos televisores a colores tiene el hogar?	00	Ninguno	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		05	Uno	
		09	Dos o más	
D-10	¿El hogar tiene un teléfono celular?	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		07	SI	

Código del participante:

Parte E. Vivienda

Estructura de la vivienda		Respuestas		Valor
<p><i>Instrucciones: Elija la respuesta correcta, y registre el valor en la última columna. Si el/a participante no sabe o no responde, escriba o marque con un círculo 88.²</i></p>				
E-1	¿Cuál es la tenencia de la casa?	01	Propia	<input type="text"/> <input type="text"/>
		02	Alquilada	
		03	Prestada	
		04	Cedida	
		05	Alojamiento	
		06	Guardiania	
		07	Invasión	
		08	Otro: _____	
		88	No sabe / no responde	
E-2	Área total del hogar	<p><i>Instrucciones: Escriba el número de metros cuadrados de la vivienda. Marque con un círculo 88: si no sabe / no responde.</i></p>		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> m ² 88 : NS/NR
E-3	Área techada	<p><i>Instrucciones: Escriba el número de metros cuadrados de la parte techada de la vivienda. Marque con un círculo 88: si no sabe / no responde.</i></p>		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> m ² 88 : NS/NR
E-4	Número total de habitaciones	<p><i>Instrucciones: Escriba el número de habitaciones en la vivienda, incluyendo sala, cocina, comedor, etc. Escriba 88: si no sabe / no responde.</i></p>		<input type="text"/> <input type="text"/> habitaciones
E-5	Número de ventanas	<p><i>Instrucciones: Escriba el número de ventanas afuera y adentro de la vivienda. Escriba 88: si no sabe / no responde.</i></p>		<input type="text"/> <input type="text"/> ventanas
E-6	Número de puertas	<p><i>Instrucciones: Escriba el número de puertas afuera y adentro de la vivienda. Escriba 88: si no sabe / no responde.</i></p>		<input type="text"/> <input type="text"/> puertas
E-7	Número de baños	<p><i>Instrucciones: Escriba el número de baños en la vivienda. Escriba 88: si no sabe / no responde.</i></p>		<input type="text"/> <input type="text"/> baños

Código del participante:

4

Materiales de construcción		Respuestas		Valor
<i>Instrucciones: Marque con un círculo la respuesta correcta de cada pregunta, y registre el puntaje en la última columna. Si el/la participante no sabe o no responde, escriba "00."</i>				
E-8	¿Cuál es el material predominante del techo?	01	Palmeras	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		02	Esteras	
		03	Calamina	
		04	Eternit	
		05	Plástico	
		06	Cartón	
		07	Concreto	
		08	Madera	
		09	Otro: _____	
		88	No sabe / no responde	
E-9	¿Cuál es el material predominante del piso?	01	Tierra	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		02	Arena	
		03	Ripio	
		04	Falso Piso	
		05	Madera	
		06	Cemento	
		07	Losetas	
		08	Otro: _____	
		88	No sabe / no responde	

Código del participante:

Parte F. Agua, saneamiento, e higiene

Agua		Respuestas		Valor
<p><i>Instrucciones: Marque con un círculo la respuesta correcta de cada pregunta, y registre el valor en la última columna. Si el/a participante no sabe o no responde, escriba "99."</i></p>				
F-1	¿Qué fuente de agua abastece su vivienda?	01	Río, Acequia, quebrada	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		02	Agua de Lluvia	
		03	Pilón, llave Pública	
		04	Camión Sistema	
		05	Jalada del vecino	
		06	Regalada	
		07	Pozo	
		08	Conex. Intradomiciliaria (24 horas)	
		09	Conex. Intradomiciliaria (<24 horas)	
		10	Conex. Extradomiciliaria	
		11	Otro: _____	
99	No sabe / no responde			
F-2	¿Cuántos caños hay en su vivienda?	<p><i>Instrucciones:</i> <i>Éscriba el número total de grifos surtidores de agua operativos que tiene en su vivienda.</i> <i>Éscriba 99: si no sabe / no responde.</i></p>		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> caños
F-3	<p><i>Durante los últimos dos meses:</i> ¿Cuántas veces le han cortado el agua?</p>	<p><i>Instrucciones:</i> <i>Éscriba el número de días que no tuvo abastecimiento de agua.</i> <i>Éscriba 99 si no sabe / no responde.</i></p>		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> días
F-4	<p>Quando hay un corte del servicio de agua: ¿De dónde consigue abastecerse de agua?</p> <p><i>(Instrucciones: seleccione todas las respuestas que apliquen)</i></p>	01	Agua almacenada en casa	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		02	Comprar agua comercial	
		03	Río, Acequia, quebrada	
		04	Agua de Lluvia	
		05	Pilón, llave Pública	
		06	Camión Sistema	
		07	Jalada del vecino	
		08	Regalada	
		09	Pozo	
		10	Otro: _____	
99	Nunca le han cortado el agua			
F-5	¿Cuántos recipientes usa en total para almacenar el agua?	<p><i>Instrucciones:</i> <i>Éscriba el número total de recipientes en la casa.</i> <i>Éscriba 99: si no sabe / no responde.</i></p>		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> recipientes

Código del participante:

F-6	¿Qué tipos de recipientes hay, y cuantos?	Instrucciones: Escriba el número de cada tipo de recipiente que hay en la vivienda. Si no hay, escribe "00" en los cuadritos.		
		F-6a	Pozo	<input type="text"/> <input type="text"/>
		F-6b	Poza	<input type="text"/> <input type="text"/>
		F-6c	Tanque	<input type="text"/> <input type="text"/>
		F-6d	Cilindros	<input type="text"/> <input type="text"/>
		F-6e	Bidones	<input type="text"/> <input type="text"/>
		F-6f	Baldes	<input type="text"/> <input type="text"/>
		F-6g	Tinas	<input type="text"/> <input type="text"/>
		F-6h	Galoneras	<input type="text"/> <input type="text"/>
		F-6i	Ollas	<input type="text"/> <input type="text"/>
		F-6j	Tachos	<input type="text"/> <input type="text"/>
		F-6k	Otro: _____	<input type="text"/> <input type="text"/>
F-7	¿Hace usted algo para tener agua limpia y saludable para beber?	00	No	<input type="text"/> <input type="text"/>
		01	Si	
F-8	Si la respuesta de pregunta F-7 es "SI" (01): ¿Qué hace usted para tener agua limpia y saludable para beber?	01	Hervir	<input type="text"/> <input type="text"/>
		02	Añadir lejía/cloro	
		03	Dejarla asentarse/sedimentación	
		04	Usar un filtro de agua	
		05	Otro: _____	

Código del participante:

Servicios higiénicos		Respuestas		Valor
<p><i>Instrucciones: Elija la respuesta correcta, y registre el valor en la última columna. Si el/a participante no sabe o no responde, escriba o Marque con un círculo "99."</i></p>				
F-9	¿Cómo elimina las excretas?	01	Campo Abierto	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		02	Río	
		03	Otros	
		04	Silo	
		05	Pozo ciego	
		06	Letrina compartida	
		07	Letrina Propia	
		08	Desague Intradomiciliario	
		09	Desague extradomiciliario	
		10	Otro: _____	
F-10	Con que frecuencia: ¿Usted usa papel higiénico?	00	Nunca	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	Raramente	
		02	A veces	
		03	Siempre	
F-11	¿Dónde elimina la basura o residuos sólidos de su casa?	01	Campo abierto	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		02	Queman	
		03	Entierran	
		04	Ríos	
		05	Contenedores de basura	
		06	Camión recolector de basura	
		07	Otro: _____	
F-12	En su casa: ¿Cuáles son los usos de las aguas servidas? (Instrucciones: seleccione todas las respuestas que apliquen)	01	Para el baño	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		02	Para lavar la ropa	
		03	Para lavar la casa	
		04	Para regar las plantas	
		05	Para regar la calle	
		06	Otro: _____	
		99	No hay otro uso de aguas servidas	
F-13	En su casa: ¿Cuál es el destino final de las aguas servidas?	01	Conex. Desague Intradomiciliario	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		02	Conex. Desague extradomiciliario	
		03	Campo abierto (tirar el agua a la calle o al corral)	
		04	Otro: _____	

Código del participante:

8

Higiene		Respuestas		Valor
<p><i>Instrucciones: Marque con un círculo la respuesta correcta de cada pregunta, y registre el valor en la última columna. Para pregunta F-14, también escriba la marca del producto si se aplica. Los siguientes preguntas en este módulo son relacionados al uso del producto especificado en F-14.</i></p>				
F-14	¿Qué producto se usa para limpiar las manos con más frecuencia?	00	Nada	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	Jabón: _____	
		02	Lejía/cloro: _____	
		03	Otro: _____	
F-15	Con que frecuencia: ¿Se lava las manos antes de preparar alimentos?	00	Nunca	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	Raramente	
		02	A veces	
		03	Siempre	
F-16	Con que frecuencia: ¿Se lava las manos antes de dar de comer a su bebé?	00	Nunca	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	Raramente	
		02	A veces	
		03	Siempre	
F-17	Con que frecuencia: ¿Se lava las manos después de ayudar a su hijo a defecar?	00	Nunca	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	Raramente	
		02	A veces	
		03	Siempre	
F-18	Con que frecuencia: ¿Se lava las manos después de ir al baño?	00	Nunca	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	Raramente	
		02	A veces	
		03	Siempre	

Preparación de la comida		Respuestas		Valor
<p><i>Instrucciones: Elija la respuesta correcta, y registre el valor en la última columna. Si el/a participante no sabe o no responde, escriba o Marque con un círculo "99".</i></p>				
F-19	¿Qué tipo de agua se usa para preparar los alimentos?	01	Agua del caño	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		02	Agua tratada / clorada	
		99	NA (no prepara alimentos)	
F-20	Con que frecuencia: ¿Lava las frutas y verduras de consumo crudo antes de servirlos o comerlos?	00	Nunca	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	Raramente	
		02	A veces	
		03	Siempre	

Código del participante:

9

F-21	Con que frecuencia: ¿Lava las frutas y verduras antes de cocinarlas?	00	Nunca	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	Raramente	
		02	A veces	
		03	Siempre	
F-22	¿Qué tipo de agua usa para lavar las frutas y verduras?	01	Agua del caño	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		02	Agua tratada / clorada	
		99	NA, o no lava las frutas y verduras	
F-23	Con que frecuencia: ¿Lava usted los servicios (platos y cubiertos) después de usarlos?	00	Nunca	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	Raramente	
		02	A veces	
		03	Siempre	
F-24	¿Hay recipiente para guardar los platos y cubiertos?	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	Recipiente sin tapa	
		02	Recipiente con tapa	
F-25	Con que frecuencia: ¿Lava usted los servicios (platos y cubiertos) antes de usarlos?	00	Nunca	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	Raramente	
		02	A veces	
		03	Siempre	
F-26	¿Qué tipo de agua usa para lavar los platos y cubiertos?	01	Agua del caño	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		02	Agua tratada / clorada	
		99	NA, o no lava las frutas y verduras	

Código del participante:

10

Parte G. Responsabilidades en casa

Preparación de comida		Respuestas		Valor
<i>Instrucciones: Elija la respuesta correcta, y registre el valor en la última columna. Si ella participante no sabe o no responde, escriba o Marque con un círculo "00."</i>				
G-1	Usualmente: ¿Dónde compra sus alimentos para preparar comida?	01	Mercado	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		02	Comedor popular	
		03	Restaurantes	
		04	Ambulantes	
		05	Otro: _____	
		88	No sabe / no responde	
G-2	Usualmente: ¿Cuántas veces cocina usted durante el día?	00	Nada	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	Una vez	
		02	Dos veces	
		03	Tres veces	
		04	Cuatro veces o más	
		88	No sabe / no responde	

Cuidado del niño		Respuestas		Valor
<i>Instrucciones: Elija la respuesta correcta, y registre el valor en la última columna. Se puede escoger respuestas múltiples. Si ella participante no sabe o no responde, escriba o Marque con un círculo "00."</i>				
G-3	Frecuentemente, ¿Quién(es) se hace(n) cargo del cuidado del niño que está participando en el estudio?	01	Madre del niño	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		02	Padre del niño	
		03	Abuela del niño	
		04	Hermano/a del niño	
		05	Tio/a del niño	
		06	Primo/a del niño	
		07	Vecino/a	
		08	Otro: _____	
		88	No sabe / no responde	

Código del participante:

Parte H. Observaciones del entrevistador

Orden y limpieza de la casa		Respuestas		Valor
<i>Instrucciones: No pregunte, solo registre la observación del entrevistador. Si usted no puede responder a alguna pregunta por no poder observar, escriba "99."</i>				
H-1	¿La casa tiene buena ventilación?	00	No tiene ventanas	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	Hay ventanas abiertas	
		02	Hay ventanas/contraventanas de vidrio o madera	
		99	No se pudo observar	
H-2	¿Hay orden en la casa?	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	SI	
		99	No se pudo observar	
H-3	¿Hay ropa de cama sucia?	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	SI	
		99	No se pudo observar	
H-4	¿Hay presencia de heces de animales dentro de la casa?	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	SI	
		99	No se pudo observar	
H-5	¿Hay presencia de materiales de construcción?	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	SI	
		99	No se pudo observar	

Limpieza de miembros de la familia		Respuestas		Valor
<i>Instrucciones: No pregunte, solo registre la observación del entrevistador. Si usted no puede responder a alguna pregunta por no poder observar, escriba "99."</i>				
H-6	¿Madre/participante con ropa sucia?	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	SI	
		99	No se pudo observar	
H-7	¿Niño(s) con ropa sucia?	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	SI	
		99	No se pudo observar	

Presencia de insectos y roedores en casa		Respuestas		Valor
<i>Instrucciones: No pregunte, solo registre la observación del entrevistador. Si usted no puede responder a alguna pregunta por no poder observar, escriba "99."</i>				
H-1	Pericotes	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Código del participante:

		01	SI	
H-2	Ratas	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	SI	
H-3	Cucarachas	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	SI	
H-4	Moscas	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	SI	
H-5	Arañas	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	SI	
H-6	Mosquitos	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	SI	
H-7	Otro: _____	00	No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		01	SI	

Parte I. Animales

Animales en casa		Cantidad	Respuestas Corral	Libre
<i>Instrucciones: En los espacios de las últimas tres columnas, escriba el número de cada tipo de animal que hay en la vivienda, y luego cuantos hay en corral y cuantos hay libre. Si no hay, deje el espacio vacío.</i>				
I-1	Pollos, gallinas, gallos			
I-2	Perros			
I-3	Gatos			
I-4	Cuyes			
I-5	Chanchos			
I-6	Pavos			
I-7	Conejos			
I-8	Patos			
I-9	Palomas			
I-10	Pericos, loros			
I-11	Monos			
I-12	Ovejas, cabras			
I-13	Tortugas u otro reptil			

Código del participante:

Parte J. Seguridad alimentaria del hogar (HFAS)

Seguridad alimentaria		Valor
<p>Instrucciones: En esta parte, las opciones de respuestas son las mismas para cada pregunta. Lea las frases que describen las experiencias de la familia con respecto a la los alimentos y el comer. Luego escriba la respuesta que representa con qué frecuencia se ha sentido de esta manera, durante las últimas cuatro semanas.</p> <p>Las respuestas potenciales son: 00 – Rara vez o ninguna vez (menos de 1 día) 01 – Pocas veces (1 – 2 días) 02 – Algunas veces (entre 3-10 veces) 03 – Con frecuencia (más de 10 veces) 05 – No sabe / no responde</p>		
J-1	En las últimas cuatro semanas: ¿Con qué frecuencia se preocupó que en su hogar no hubiera suficientes alimentos?	<input type="text"/> <input type="text"/>
J-2	En las últimas cuatro semanas: ¿Con qué frecuencia usted o algún miembro de la familia no pudo comer los tipos de alimentos preferidos debido a la falta de recursos?	<input type="text"/> <input type="text"/>
J-3	En las últimas cuatro semanas: ¿Con qué frecuencia usted o algún miembro de la familia tuvo que comer una variedad limitada de alimentos debido a la falta de recursos para obtener otros alimentos?	<input type="text"/> <input type="text"/>
J-4	En las últimas cuatro semanas: ¿Con qué frecuencia usted o algún miembro de la familia tuvo que comer alimentos que realmente no deseaba debido a la falta de recursos para obtener otros alimentos?	<input type="text"/> <input type="text"/>
J-5	En las últimas cuatro semanas: ¿Con qué frecuencia usted o algún miembro de la familia tuvo que comer una comida mas pequeña que lo que necesitaba porque no había suficientes alimentos?	<input type="text"/> <input type="text"/>
J-6	En las últimas cuatro semanas: ¿Con qué frecuencia usted o algún miembro de la familia tuvo que comer menos comidas diarias porque no había suficientes alimentos?	<input type="text"/> <input type="text"/>
J-7	En las últimas cuatro semanas: ¿Con qué frecuencia no hubo absolutamente ningún alimento que comer en su hogar debido a la falta de recursos para adquirirlos?	<input type="text"/> <input type="text"/>
J-8	En las últimas cuatro semanas: ¿Con qué frecuencia usted o algún miembro de la familia se fue a dormir por la noche con hambre porque no había suficientes alimentos?	<input type="text"/> <input type="text"/>
J-9	En las últimas cuatro semanas: ¿Con qué frecuencia usted o algún miembro de la familia se pasó todo el día sin comer nada debido a que no había suficientes alimentos?	<input type="text"/> <input type="text"/>

Código del participante:

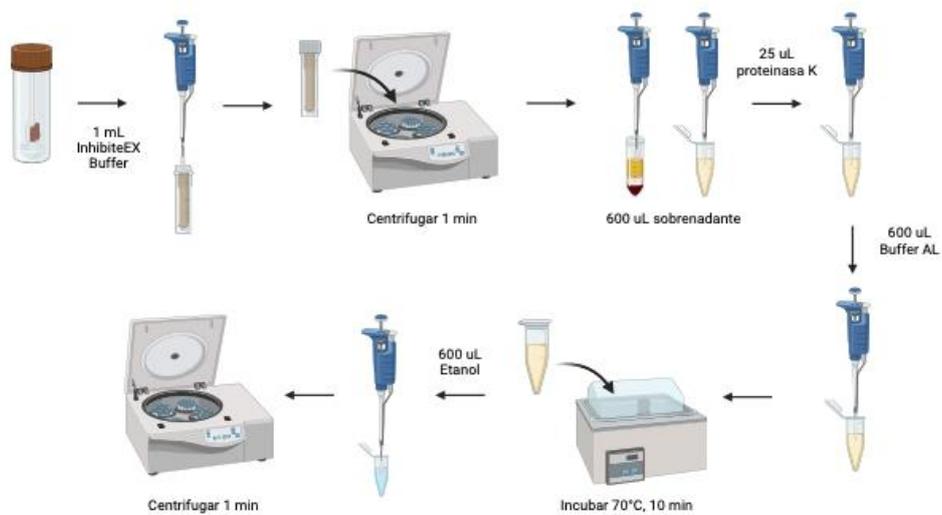
14

Anexo 2: Protocolo de extracción de ADN de las muestras de heces de las madres y de sus hijos según el fabricante (Fuente: Elaboración propia)

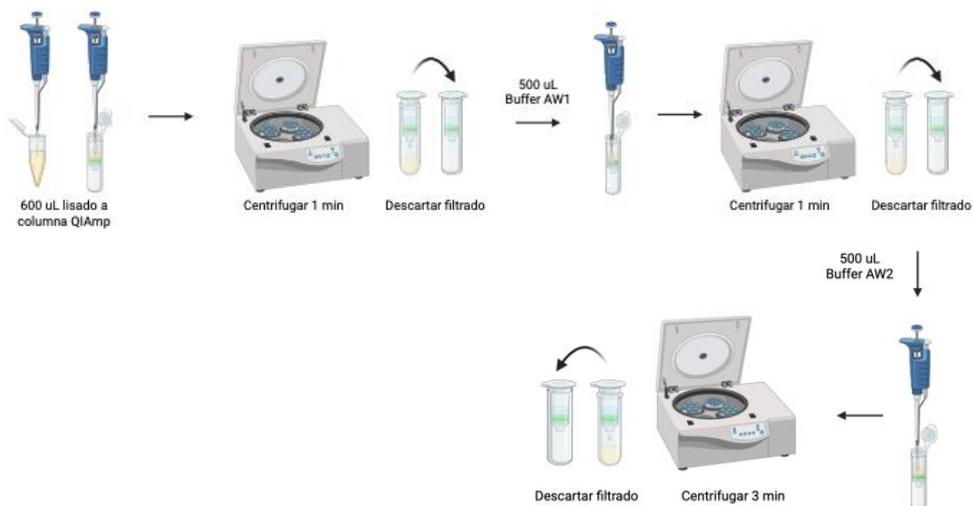
(a) Las células bacterianas y las de otros patógenos en las heces se lisan incubando el homogeneizado de heces a 70°C. (b) El ADN se lava en 2 centrifugaciones, utilizando 2 tampones para la eliminación completa de cualquier impureza residual. (c) Elución del ADN fuera de la columna hacia el tubo Eppendorf.

*En lugar de 200 uL Buffer ATE se ha utilizado 60 ul de agua libre de nucleasas para obtener un mejor rendimiento de la extracción del ADN.

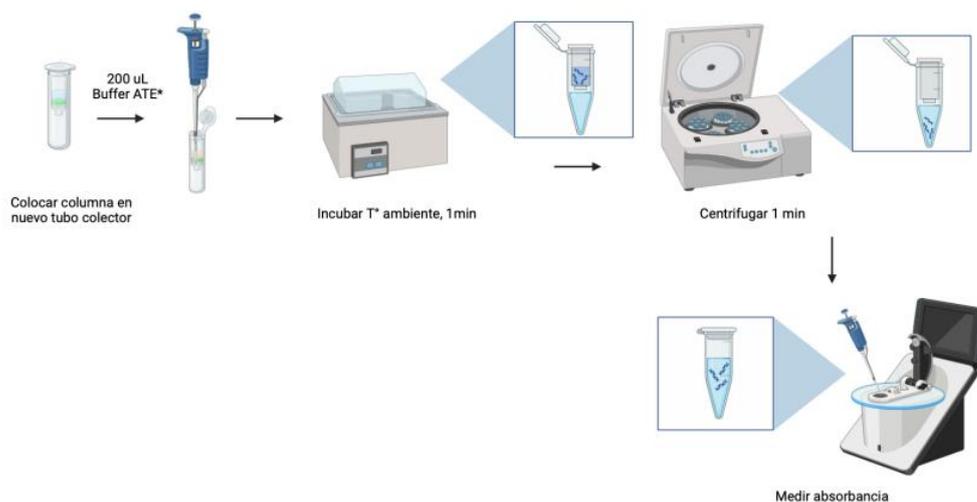
a. Lisis celular



b. Precipitación



c. Purificación o elución



Anexo 3. Set de cebadores para los genes de resistencia *blaCTX-M-15* y *floR*

Gen	Set	Tipo	Secuencia del primer	Tamaño del producto	Temperatura de Anillamiento	Referencia
<i>blaCTX-M-15</i>	1	F	GCGCTACAGTA CAGCGATAA	216 pb	50° C	Ramadan
		R	TTTACCCAGCG TCAGATTCC			
<i>floR</i>	1	F	GCGCAACGGCT TTCGTCATT	270 pb	58°C	Qian
		R	GCATCGCCAGT ATAGCCAAA			

Anexo 4. Mezcla maestra para la PCR

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Rx de 20 μ l – Taq Pol in house
Dream Taq	2X	1X	-
Buffer RPB*	5X	1X	5 μ l
dNTP (10 nM)	10 nM	0.5 nM	0.5 μ l
Taq Polimerasa	20 ng/ μ l	2 ng/ μ l	2 μ l
Primer F	5 μ M	0.2 μ M	0.8 μ l
Primer R	5 μ M	0.2 μ M	0.8 μ l
DNA			2 μ l

*Composición del buffer: 200 mM Tris-HCl (pH 8.4 25°C), 300 mM KCl, 12 mM MgCl₂, 40% trehalose, 40 mM DTT, 0.4 mM EDTA, 1.6 mM dNTP mix

Anexo 5. Componentes y mezcla maestra del complejo Cas12a para el sistema PCR-CRISPR-Cas12a

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 1X	Volumen 3X
Cas12a	2 μ M	0,1 μ M	0.5 μ l	1.5 μ l
ARNcr	1,3 μ M	0,15 μ M	1.2 μ l	3.6 μ l
Sonda	50 μ M	2 μ M	0.4 μ l	1.2 μ l
1x CrB Buffer	-	-	7.9 μ l	23.7 μ l
Total			10 μ l	30 μ l

Anexo 6. Cálculo de la estimación del índice kappa con respecto al tamaño de muestra [49]

Índice de kappa	n (número de pares de muestras de heces de madres e hijos)
0,3	85
0,4	47
0,5	29

Anexo 7. Curvas para determinar el tamaño de muestra necesario con una potencia del 80 % y significancia de 0,05 para la prueba de Spearman [50].

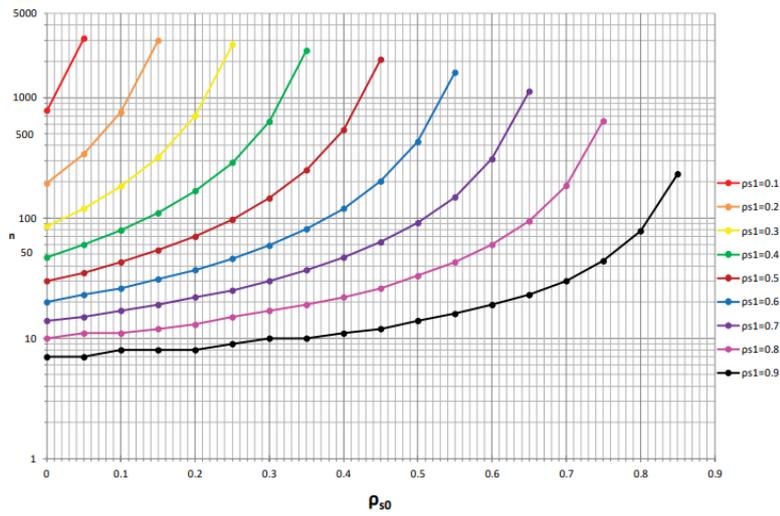


Figure 1a. Curves for finding the required sample size that will yield 80% power for a two-tailed test of a single Spearman coefficient at significance level 0.05, to be used when the alternative value ($ps1$) is greater than the null value ($ps0$). To use the chart, first locate the null value of the SCC along the x-axis. Then, draw a vertical line that intersects with the sample size curve corresponding to the desired alternative value. Finally, draw a horizontal line from the curve to the y-axis. The point of intersection with the y-axis is the required sample size.

Anexo 8. Carta de Aprobación del proyecto 212020 emitida por CIEI.



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

CONSTANCIA-CIEI-356-33-23

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité Institucional de Ética en Investigación, bajo la categoría de revisión **EXENTO**. La aprobación será informada en la sesión más próxima del comité.

Título del Proyecto : **“Concordancia de la carga de genes de resistencia a antibióticos (blaCTX-M-15 y floR) en muestras de heces de madres y sus niños menores de 2 años”**

Código SIDISI : 212020

Investigador(a) principal(es) : **Faustino Oropeza, Angela Melissa Rabanal Pazzaglia, Daniela**

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. Protocolo de investigación, versión recibida en fecha 16 de agosto del 2023.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. La categoría de **EXENTO** es otorgado al proyecto por un periodo de cinco años en tanto la categoría se mantenga y no existan cambios o desviaciones al protocolo original. El investigador está exonerado de presentar un reporte del progreso del estudio por el periodo arriba descrito y sólo alcanzará un informe final al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **16 de agosto del 2028**.

El presente proyecto de investigación sólo podrá iniciarse después de haber obtenido la(s) autorización(es) de la(s) institución(es) donde se ejecutará.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 17 de agosto de 2023.



Dr. Manuel Raúl Pérez Martinot
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación

/cr

Av. Honorio Delgado 430
San Martín de Porres
Apartado Postal 4314
319 0000 Anexo 201355
orvei.ciei@oficinas-upch.pe
cayetano.edu.pe

**Comité Institucional de
Ética en Investigación**

Anexo 9. Medidas de estadística descriptiva de la concentración y calidad del ADN.

	Concentración (ng/μL)	Calidad (Abs 260/280)
Rango	5,3 - 573,5	1,7 - 2,26
Mediana	98,5	1,97
RIC	109,125	0,0775
P10	20,71	1,95
P90	262,64	2,14

RIC = Rango intercuartílico; P10 = Percentil 10; P90 = Percentil 90