PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE MEDICINA

CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICO CLÍNICO

Estandarización de la técnica de PCR para la detección de co-resistencias en cepas invasivas de *Klebsiella pneumoniae KPC* positivas pertenecientes a Hospitales de la Red Pública Integral de Salud del Ecuador (RPIS) entre los años 2013 - 2015.

Alumno:

David Israel Córdova Peñaherrera

Director:

Magister José Eduardo Villacís Acuña

QUITO, 2016

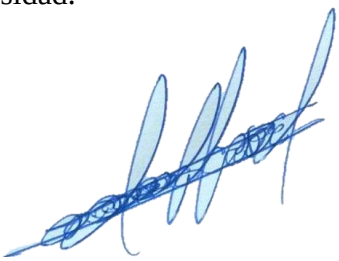
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **DAVID ISRAEL CÓRDOVA PEÑAHERRERA C.I. 0502709744** autor del trabajo de graduación intitulado**: "Estandarización de la técnica de PCR para la detección de co-resistencias en cepas invasivas de *Klebsiella pneumoniae KPC* positivas pertenecientes a Hospitales de la Red Pública Integral de Salud del Ecuador (RPIS) entre los años 2013 - 2015."**, previa a la obtención del grado académico de **BIOQUÍMICO CLÍNICO** en la **ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.



DAVID ISRAEL CÓRDOVA PEÑAHERRERA

C.I. 0502709744

DEDICATORIA

A mis padres por el cariño y apoyo eterno,

A mis familiares por su preocupación y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

A mis padres.

A la PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR, en especial a la ESCUELA DE BIOANÁLISIS por la formación académica.

Al Doctor Santiago Escalante y al Doctor Carlos Flores, por la instrucción y el tiempo brindado en la lectura de la disertación.

Al INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA QUITO, en especial al laboratorio de Resistencia a los Antimicrobianos; y, de manera particular al Máster Eduardo Villacís, por su guía y confianza en la investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I **1**

1.1 INTRODUCCIÓN **1**

1.2 JUSTIFICACIÓN **4**

1.3 OBJETIVOS **7**

1.3.1 Objetivo General **7**

1.3.2 Objetivos Específicos 7

CAPÍTULO II **8**

2. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL **8**

2.1 Antecedentes 8

2.2 *Klebsiella pneumoniae* 9

2.3 Taxonomía 10

2.4 Características microbiológicas y hábitat 10

2.5 Características metabólicas 12

2.6 Factores de virulencia 12

2.7 Mecanismo de acción de los antibióticos 12

2.8 Mecanismos de resistencia a antibióticos 14

2.9 Enzimas y genes implicados en la resistencia antimicrobiana 16

2.10 Resistencia natural 21

2.11 Resistencias adquiridas a betalactámicos 21

2.12 Co-resistencias tipo BLEE en *Klebsiella pneumoniae* 22

2.13 Ensayos fenotípicos para la detección de BLEE 23

2.14 Ensayos fenotípicos para la detección de AmpC 25

2.15 Pruebas moleculares para la detección de resistencias a betalactámicos 27

2.16 *Primers* para la detección de genes de resistencia. 29

2.2 MARCO CONCEPTUAL **31**

2.2.1 Definición de conceptos....31
2.3 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES....34
2.3.1 Operacionalización de variables....34
CAPÍTULO III....35
3. MARCO METODOLÓGICO....35
3.1.1 Tipo de Estudio....35
3.1.2 Tipo de Muestreo....35
3.1.3 Tamaño de la muestra....35
3.1.4 Criterios de Inclusión:....37
3.1.5 Criterios de Exclusión....37
3.4 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO....38
3.2.1 Materiales y reactivos....38
3.3 METODOS....41
3.3.1 Fase I. Análisis Bacteriano....41
3.3.2 Fase II. Determinación fenotípica de resistencia bacteriana....42
3.3.3 Fase III. Determinación genotípica de resistencia bacteriana....43
3.3.4 Fase VI. Análisis y recolección de datos....46
3.4 Control de Calidad....46
CAPÍTULO IV....48
4.1 RESULTADOS....48
4.1.1 Variables clínicas epidemiológicas....48
4.1.2 Perfil de susceptibilidad....50
4.1.3 Interpretación del antibiograma e identificación de resistencias....52
4.1.4 Resistencia bacteriana....52
4.2 DISCUSIÓN....65
4.3 CONCLUSIONES....71
4.4 RECOMENDACIONES....73

5. BIBLIOGRAFÍA 74

6. ANEXOS 82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la técnica de Reación en Cadena de la Polimerasa (PCR)……...29

Figura 2. Tipo de muestra..... 49

Figura 3. Dependencia Hospitalaria. 50

Figura 4. Tipos de co-resistencia. 54

Figura 5. Nivel de detección de los primers 57

Figura 6. Reproducibilidad para el gen blaTEM (800pb) 58

Figura 7. Reproducibilidad para el gen blaSHV-1 (713pb) 59

Figura 8. Reproducibilidad para el gen blaCTX-M (688pb)..... 59

Figura 9. Especificidad para los genes blaTEM (800pb) y blaSHV (713pb)..... 60

Figura 10. Especificidad para el gen blaCTX-M (688pb)..... 61

Figura 11. Porcentaje de genes de resistencia……63

Figura 12. Corrida electroforética para blaTEM, blaSHV, y blaCTX-M……...……64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Primers para la detección de genes de resistencia. 30

Tabla 2. Variables clínico-epidemiológicas 48

Tabla 3. Porcentaje de los perfiles de susceptibilidad 51

Tabla 4. Fenotipos de resistencia 53

Tabla 5. Fórmula de la solución Master Mix 55

Tabla 6. Condiciones de la PCR 55

Tabla 7. Genotipos de resistencia 62

ANEXOS

Anexo 1. Aislamiento de cepas e identificación de *Klebsiella pneumoniae*. 82

Anexo 2. Protocolo para la realización del antibiograma y pruebas fenotípicas..... 83

Anexo 3. Método de Jarlier. Difusión de doble disco para BLEE. 84

Anexo 4. Identificación de AmpC. Método del ácido 3-aminofenil borónico. 85

Anexo 5. Extracción de ácidos nucleicos por calentamiento. 86

Anexo 6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 87

Anexo 7. Matrices de trabajo..... 90

LISTA DE SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APB	Ácido 3-phenil-borónico
ATCC	American Type Culture Collection
BLEA	Betalactamasa de espectro ampliado
BLEE	Betalactamasa de espectro extendido
CLSI	Clinical Laboratory Standars Institute
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
IAAS	Infecciones asociadas a la atención en Salud
INSPI-Q	Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública - Quito
MDR	Multidrug Resistance
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDR	Pan-drug Resistance
UCI	Unidad de cuidados intensivos
XDR	Extensive Drug Resistance

RESUMEN

La resistencia de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* a los antimicrobianos en pacientes hospitalizados, es una realidad presente en los servicios de salud, que ha tenido un aumento acelerado, asociado tanto a tasas de mortalidad como a diseminación hospitalaria. Se destaca la presencia de cepas multirresistentes en áreas hospitalarias como la Unidad de Cuidados Intensivos, Unidad de Hemodiálisis, Unidades Hemato-oncológicas, entre otras, lo que acarrea una gran preocupación debido a la presencia de sus co-resistencias, dificultando un tratamiento efectivo.

Acorde a estos precedentes, el objetivo del estudio plantea, estandarizar el método de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), con el fin de identificar los genes (*SHV, TEM*, *CTX-M, CMY, DHA*), productores de resistencia a betalactámicos y cefalosporinas en 66 cepas invasivas de *Klebsiella pneumoniae KPC* positivas, pertenecientes a la red de Hospitales asociados al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, entre los años 2013 - 2015. Las cepas fueron analizadas fenotípicamente mediante la identificación de perfiles de susceptibilidad por la técnica de Kirby Bauer y genotípicamente mediante la técnica molecular de PCR en el laboratorio de Resistencias a los Antimicrobianos. En cuanto a la identificación fenotípica de betalactamasas de espectro extendido BLEE, se realizó la técnica de difusión de doble disco para observar la sinergia entre el inhibidor de betalactamasas y una cefalosporina de tercera generación. Para la detección fenotípica de Amp-C se observa la sinergia entre una cefalosporina de tercera generación y un disco de ácido fenil-borónico, asociada a la resistencia al cefoxitin.

Los aislamientos, provienen de 14 servicios hospitalarios diferentes: un 32% de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI); y, un 17%, de Pediatría. Con relación al tipo de muestra, se enfocó el estudio a muestras invasivas, observando que un 64% provienen de sangre y el restante se divide entre los líquidos estériles.

Los perfiles de susceptibilidad presentes en los microorganismos, los clasifican dentro de las categorías de extremadamente resistentes (XDR). En los resultados, se comprobó que el total de las cepas presentan el gen SHV; además, el 92,4% el gen TEM, ambos productores de resistencia a betalactámicos; y, que el 45,5% de cepas presentaron el gen CTX-M, betalactamasa de espectro extendido que confiere resistencia a cefalosporinas.

La presencia de los tres genes de resistencia mencionados, en el 45,5% de las cepas analizadas, determinan una afectación a más de una familia de antibióticos, esto sugiere una posible escasez en el tratamiento y prevención de infecciones hospitalarias, así como la posible transmisión de un microorganismo multirresistente entre los diferentes departamentos de salud.

La PCR demostró la presencia de genes de resistencias tipo BLEE, en casi el 50% de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* KPC+, con un alto porcentaje del gen CTX-M del 45,5%; y a su vez, una co-resistencia entre los genes TEM, SHV, CTX-M y KPC en 30/66 cepas analizadas.

Palabras clave

Co-resistencia; muestras invasivas; *Klebsiella pneumoniae*; BLEE; TEM; CTX-M; SHV; PCR.

ABSTRACT

The resistance of the bacterium *Klebsiella pneumoniae* to the antimicrobials in hospitalized patients is a reality in the health services which has had a rapid rise, associated to rates of mortality and hospital dissemination. The presence of multiresistant strains in hospital areas such as Intensive Care, Hemodialysis unit, Hematology-Oncology units, among other highlights, entails a major concern due to the presence of their co-resistance hindering effective treatment.

Due to the mentioned precedents, the objective of this study was to standardize the method of PCR with the purpose of identifying the genes (*SHV, TEM, CTX-M, CMY, DHA*) resistance producers to beta-lactams and cephalosporins in 66 stumps invasive strains of *Klebsiella pneumoniae* positive *KPC* belonging to the net of Hospitals associated to the National Institute of Investigation in Public Health in a period of time that consists among the years 2013 to 2015. Strains were analyzed phenotypically by identifying susceptibility profiles by Kirby Bauer technique and genotypic by PCR in molecular laboratory antimicrobial resistance. As for the phenotypic identification of beta-lactamase BLEE a spread spectrum diffusion double disc was made, and synergy was observed between the beta-lactamase inhibitor, and a cephalosporin of third-generation. For phenotypic detection AMP-C, is observed a synergy between a cephalosporin of third generation and a phenylboronic acid disc, associated to the resistance to cefoxitin.

The isolations come from 14 hospital different services finding in more percentage to the Unit of Intensive Cares with 32% and Pediatrics with 17%, as for the sample type, the study focuses on invasive samples, noting that 64% come from blood and the rest is divided between sterile liquids. Susceptibility profiles present in microorganisms classify within the categories of extremely resistant (XDR). It was found that the total strains have

the SHV gene, also 92.4% the TEM gene, both producers of resistance to beta-lactams, and 45.5% of strains were CTX-M gene, beta-lactamase of extended spectrum that confers resistance to cephalosporins, information that is revealed as almost the total average.

The presence of the three resistance genes mentioned in 45,5% of the analyzed strains determines an affectation to more than a family of antibiotics, suggesting a possible shortage in the treatment and prevention of hospital infections, as well as the possible transmission of multi-resistant microorganism among different health departments.

PCR demonstrated the presence of BLEE type resistors genes in almost half of *Klebsiella pneumoniae* KPC+ strains, concluding a high percentage of gene CTX-M 45.5% and also a co-resistance among genes TEM, SHV CTX-M and KPC in 30/66 analyzed strains.

Key words

Co-resistance; invasive samples; *Klebsiella pneumoniae*; BLEE; TEM; CTX-M; SHV; PCR; Quito

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Klebsiella pneumoniae es un bacilo Gram-negativo, no móvil, que pertenece a la familia denominada Enterobacterias; posee una cápsula como factor determinante de virulencia, que protege a la bacteria de los factores bactericidas séricos y de la fagocitosis por los polimorfo nucleares, inhibiendo el complemento, de manera principal. (Lopez & Echeverri, 2010).

Se han asociado complicaciones del tracto urinario y neumonía por presencia de *Klebsiella pneumoniae* en personas con buenas condiciones inmunológicas; lo que contrapone al criterio de que la mayoría de infecciones por *Klebsiella pneumoniae,* se adquieren en el ambiente hospitalario o en pacientes inmunodeprimidos, presentando infecciones como: bacteriemias generalizadas, infecciones de la zona quirúrgica, peritonitis, meningitis, infecciones del tracto biliar. (Echeverri & Cataño, 2010).

A pesar de que, *Klebsiella pneumoniae* es un microorganismo transitorio en la flora bacteriana humana y se presenta con mayor frecuencia en el ambiente, las principales causas de transmisión son las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), a través del manejo del personal que está al cuidado del paciente, lo que causa entre el 3% y 7% de todas las infecciones bacterianas hospitalarias, convirtiéndose en uno de los ocho patógenos intra-hospitalarios más importantes en la última década. (Seral, Gude, & Castillo, 2012).

De forma natural, se considera que dicha bacteria posee una enzima clasificada como plasmídica, que confiere resistencia a ciertos antibióticos betalactámicos denominada SHV-1, que se caracterizó por primera vez en Alemania, en el año 1983,

identificándose como el primer reporte de resistencias transferibles frente a cefalosporinas de tercera generación en *Klebsiella pneumoniae*; y, años después, en 1985, se reporta la mutación de SHV-1, produciendo la enzima SHV-2, que confiere resistencia a cefalosporinas de amplio espectro. (Galas & WHONET-Argentina, 2013).

Las modificaciones enzimáticas de las betalactamasas de amplio espectro, SHV-1 y TEM-1, y la formación o creación de una nueva betalactamasa de espectro extendido (BLEE), que hidroliza la cefotaxima denominada CTX-M, produjeron la formación de diversos tipos de BLEE o fenotipos de resistencia. (Lopez & Echeverri, 2010).

Para profundizar en el estudio de *Klebsiella pneumoniae,* en el año 2003 se revelan datos que ubican a esta bacteria, como el cuarto patógeno dentro de la prevalencia, en un análisis desarrollado en 14 hospitales, por el Grupo de Estudio de la Resistencia de Bogotá (GREBO), en el que se determinó un porcentaje del 5,7% de infección nosocomial. Por su parte, el Grupo de Estudio de la Resistencia Microbiana de Medellín (GERMEN), ejecutó entre los años 2007 y 2008 un estudio en 14 hospitales de la ciudad, determinando a *Klebsiella pneumoniae* como el tercer microorganismo que se aisló en todos los departamentos hospitalarios. (Echeverri & Cataño, 2010).

La manifestación de casos de *Klebsiella pneumoniae* de alta complejidad, asociado a tasas elevadas de mortalidad y de diseminación hospitalaria han generado una preocupación a nivel mundial, debido a la formación de resistencias a diversos antibióticos impidiendo tratamientos alternativos. (Gutiérrez, Labarca, Román, & Sanhueza, 2011).

Casi el 60% de infecciones asociadas a la atención de la salud, producidas en Estados Unidos, han sido ligadas a bacterias multirresistentes, porcentaje similar o menor al encontrado en países del tercer mundo. (Pacheco, Osorio, Correa, & Villegas, 2014).

Uno de los antibióticos de preferencia para tratar infecciones producidas por cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes productoras de BLEE (Betalactamasa de espectro extendido) y AMP-C, son los carbapenémicos; no obstante, existe un incremento alarmante en la resistencia de estos, manifestando el aumento en la co-resistencia asociada a diversas familias de antibióticos utilizados para tratar infecciones hospitalarias, considerándose como un gran problema para la salud a nivel mundial. (Melgarejo, Martinez, Franco, & Falcón, 2013).

La diseminación geográfica y clonal de este tipo de resistencias bacterianas, se debe a que los diversos genes que producen la resistencia pueden ser transportados de un microorganismo a otro, por medio de componentes genéticos móviles (plásmidos), fenómeno denominado conjugación. Lo que evidencia, que dicha conjugación provoca que los microorganismos tengan la capacidad de compartir información genética de resistencia entre especies e incluso entre familias de bacterias. (Gutiérrez, Labarca, Román, & Sanhueza, 2011).

Con el fin de lograr una vigilancia temprana de la infección a lo largo de los años se han realizado estudios de cepas productoras de genes de resistencia mediante técnicas de identificación fenotípica y genotípica. (Pacheco, Osorio, Correa, & Villegas, 2014).

Por todo lo mencionado el presente estudio responde la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son las co-resistencias presentes en cepas invasivas de *Klebsiella pneumoniae KPC* positivas pertenecientes a Hospitales de la Red Pública Integral de Salud del Ecuador?

1.2 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad las resistencias a los antibióticos presentes en las instituciones de salud, se ha convertido en un problema, incrementado con rapidez en las dos últimas décadas, donde se describe a la resistencia a b-lactámicos, como el mecanismo más común en bacilos Gram-negativos, que por su diversidad y su continua adición de inhibidores, se presenta como una alerta mundial; por otra parte, el mecanismo de resistencia a cefalosporinas en los bacilos mencionados se ha observado como una emergencia con valores significantes, presentando cepas denominadas ESBL o tipo BLEE que poseen un espectro de resistencia frente a cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima, ceftriaxona y cefotaxima), sumándose a estos el aztreonam. (Dallenne, Da Costa, Decre´, Favier, & Arlet, 2010).

Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes, presentan enzimas que causan hidrólisis de varios antibióticos como: penicilinas, monobactámicos, cefalosporinas, cefamicinas y carbapenémicos; valorando esta investigación, tanto el IDSA (Infectious Diseases Society of America) como la OMS (Organización mundial de la Salud), han emprendido campañas para crear nuevos medicamentos antibacterianos en contra de la resistencia microbiana. (Paciel, Seija, Prieto, Vignol, Media, & Savio, 2011).

Por otro lado, en la última década se reporta un incremento en la resistencia de la familia denominada *Enterobacterias*, con énfasis en la bacteria *Klebsiella pneumoniae*, describiendo entre las principales enzimas implicadas en la inhibición de varios antimicrobianos a las betalactamasas tipo TEM, SHV, CTX-M, OXA, VEB, KPC, VIM y GES, que conforman un amplio espectro de resistencias, deduciendo tipos como betalactamasas, cefalosporinasas y carbapenemasas. (Marcano, De Jesús, Hernandez, & Torres, 2011).

La aparición de estas nuevas enzimas de resistencia y la amplia diversidad evolutiva que se ha demostrado en tan corto periodo de tiempo, han alertado a la epidemiología mundial, realizando estudios que examinen tanto la frecuencia enzimática de resistencia, como la distribución hospitalaria; y, principalmente los mecanismos de resistencia que cada bacteria produce, evitando diseminaciones y desenlaces fatales. (Moreno K. , 2013).

Estudios realizados en la región de Sudamérica, describen un incremento en los casos de infecciones de difícil tratamiento por *Klebsiella pneumoniae,* con afección variada en: pulmones, tracto urinario, tejidos, áreas quirúrgicas y sepsis. (Echeverri-Toro, Rueda, Maya, & otros, 2012)

De estudios desarrollados en Medellín – Colombia, se presentan datos epidemiológicos de varias instituciones de salud, en los cuales se evidencia que el mayor riesgo a desarrollar infecciones se presenta en el área de cuidados intensivos; además, se ubica a *Klebsiella pneumoniae*, en el tercer lugar de infección en muestras invasivas, lo que evidencia, una complicación con la estancia hospitalaria prolongada. (Echeverri & Cataño, 2010)

En el Ecuador, a pesar de existir reportes de cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes, su prevención y control en las instituciones de salud se dificulta, esto debido a que existen limitaciones en los laboratorios en su detección de rutina, sobre la expresión de fenotipos variables, ya que requiere técnicas de mayor complejidad y costo, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). (Pacheco, Osorio, Correa, & Villegas, 2014).

La estandarización de las técnicas e implementación de protocolos, para la detección de genes productores de múltiples resistencias en *Klebsiella pneumoniae,* podrá contribuir a las diversas instituciones de salud, con el fin de realizar un análisis efectivo

de resistencias en las infecciones asociadas a la atención de la salud, de allí que, se podrá detectar de manera temprana la existencia de cepas bacterianas multirresistentes, y prevenir diseminaciones a nivel hospitalario e infecciones bacterianas progresivas que podrían conllevar desenlaces letales.

La ejecución de estudios sobre la eficacia del control de infecciones hospitalarias, aplicado en los Estados Unidos desde el año 1970, ha permitido alcanzar la efectividad de la reducción significativa de las infecciones poniendo en práctica una vigilancia intensiva; situación que puede ser replicada en el resto de países como medidas de prevención y control a partir de la problemática que se presenta en cada uno, con el fin de alcanzar sistemas de vigilancia efectivos. (Briceño, Correa, Valencia, Torres, & Julián, 2010)

Por lo tanto, se considera indispensable la estandarización de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), para la identificación de los distintos genes de resistencia propuestos en el presente estudio; tomando en cuenta, tanto: la sensibilidad a los antibióticos, como la determinación de mecanismos de resistencia, siguiendo los lineamientos del CLSI 2015 (Clinical Laboratory Standards Institute) (Pacheco, Osorio, Correa, & Villegas, 2014).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Estandarizar el método de PCR para la caracterización de genes de resistencia a betalactámicos y cefalosporinas (*CTX-M, SHV, TEM, CMY, DHA*), en cepas invasivas de *Klebsiella pneumoniae KPC* positiva pertenecientes a Hospitales de la Red Pública Integral de Salud, analizadas en el INSPI-Q entre los años 2013 – 2015.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Identificar las resistencias fenotípicas en cepas invasivas de *Klebsiella pneumoniae* mediante pruebas de susceptibilidad a antibióticos utilizando la técnica de difusión en disco.
- Desarrollar protocolo para la amplificación de los genes $_{bla}$*CTX-M,* $_{bla}$*SHV,* $_{bla}$*TEM, CMY* y *DHA,* mediante la técnica de PCR.
- Identificar la presencia de los genes $_{bla}$*CTX-M,* $_{bla}$*SHV,* $_{bla}$*TEM, CMY* y *DHA* en cepas invasivas de *Klebsiella pneumoniae* KPC positiva mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1 Antecedentes

Se describen reportes a nivel de Sudamérica que evidencian un incremento en los casos de cepas bacterianas multirresistentes, enfocandose de manera principal en la familia denominada Enterobacterias; es así que, en Colombia se realiza un estudio sobre la evolución de la resistencia microbina de bacilos GRAM negativos en unidades de cuidados intensivos entre los años 2009 y 2012, el cual determina a *Klebsiella pneumoniae* como el microorganismo aislado con mayor frecuencia en el año 2012, evidenciando un aumento significativo a lo largo de los 4 años; se presenta además, un porcentaje sin cambio de tendencia en los asilamientos de *Klebsiella pneumoniae* en sangre, disminuyendo de un 28% en el año 2009 hasta un 22,5% en el año 2012.(Hernández-Gómez, et al., 2014)

En otro estudio efectuado por el Centro Internacional de Entrenamiento en Investigaciones Médicas (CIDEM), en ocho hospitales ubicados en el tercer nivel de atención, de tres ciudades principales de Colombia (Cali, Medellín y Bogotá), se presentó que, el 32,6% de las cepas de *Klebsiella pneumoniae,* provenían del servicio de UCI o cuidados intensivos; además, describen que el 29,8% fue determinado como BLEE positivas, con un predominio de la enzima CTX-M en cepas provenientes de otros servicios hospitalarios. (Echeverri & Cataño, 2010)

En el año 2011 en Venezuela se realiza un estudio sobre un brote de *Klebsiella pneumoniae* en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal aisladas de muestras sanguíneas, que describe además, la presencia de cepas bacterianas en soluciones parenterales que son

suministradas a los recién nacidos, con la expresión de genotipos de BLEE denominados TEM y SHV; lo que indica como posible causa de infección a la utilización de dichas soluciones, deduciendo como medio de transporte al personal encargado de la atención de los pacientes. (Gonzáles, et al., 2011)

Un estudio similar se realiza en Argentina en el año 2012 en cepas de Enterobacterias sin AmpC indusible, evidenciando en *Klebsiella pneumoniae* la presencia de enzimas tipo BLEE, con porcentajes del 54% de aislados con CTX-M y SHV; 21% solo SHV; 18% solo CTX-M; y 2% con una co-resistencia entre CTX-M, SHV y PER-2, lo que suguiere una facilidad de *Klebsiella pneumoniae* para adquirir genotipos de reistencia. (Nastro, et al., 2012)

Como se indica, las tasas de infección de *Klebsiella pneumoniae,* han aumentado a lo largo de los años, al igual que, la morbilidad y mortalidad de pacientes hospitalizados ligados a bacteremias. (Echeverri-Toro, Rueda, Maya, & otros, 2012).

Pero es fundamental tomar en cuenta que la prevalencia de cepas de *Klebsiella pneumoniae* varía geográficamente; y, que un factor común tanto dentro como fuera de ciertas instituciones de salud, es la administración indiscriminada de antibióticos, lo que contribuye al aumento de la resistencia microbiana, considerando como fundamental una identificación exacta de estos patrones de resistencia. (Gonzáles, Nieves, Solórzano, Cruz, Puig, & Moreno, 2013)

2.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es una bacteria bacilar, Gram-negativa, descrita por primera vez en 1875 por el bacteriólogo Edwing Klebs, en muestras de heridas de soldados y exudados bronquiales de personas fallecidas con enfermedades neumónicas; pero es hasta 1882 que el científico Friedländer, fundamenta mediante estudios

etiológicos una descripción de dichas bacterias, en pacientes con neumonía lobar. (Ling Toledo, 2012)

2.3 Taxonomía

Estudios detallan la clasificación taxonómica bacteriana según el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey´s, donde se ubica a las bacterias GRAM negativas, anaerobias facultativas, cuya pared se encuentra formada por una doble capa de peptidoglucano y poseen un espacio periplásmico envuelto por una membrana externa, dentro del grupo #5, a la que pertenecen las familias Enterobacteriaceae y Vibrionaceae. Continuando con la clasificación, el género *Klebsiella* perteneciente a la familia Enterobacteriaceae posee 5 especies: *Klebsiella oxytoca, Klebsiella terrigena, Klebsiella planticola, Klebsiella ornithinolytica* y *Klebsiella pneumoniae,* la que contiene 3 subespecies que incluyen *pneumoniae pneumoniae, pneumoniae ozaenae y pneumoniae rhinoscleromatis*. (Xu, Li, Chen, & Zhou, 2010)

2.4 Características microbiológicas y hábitat

Klebsiella pneumoniae posee forma bacilar, con una longitud de 0,6 μm a 6 μm y un diámetro de 0,3 μm a 1 μm, no posee movilidad, su citoplasma se encuentra envuelto por una membrana que sirve como barrera osmótica y como centro metabólico por la cantidad abundante de proteínas, posee una estructura formada por polímeros de amino azúcares que mantiene la forma celular y ayuda a conservar la ósmosis denominada peptidoglicano; entre sus membranas existe un espacio nombrado periplasma, cuya función es la captación de solutos, la transformación de compuestos y ayuda a controlar la presión osmótica. (Murray, 2009)

La membrana externa delimita con el periplasma y recubre a la capa de peptidoglicano constituida por proteínas estructurales, porinas y un lípido especial en su

capa más externa, denominado lipopolisacárido, que presenta tres regiones: el lípido A con función de endotoxina y de anclaje a la membrana, la región central unida al núcleo denominada *core* y un polisacárido antigénico nombrado *antígeno O*; la carga negativa presente en los extremos de su superficie evita la acción de los fagocitos y del complemento, efectuando una barrera de permeabilidad; además, posee una estructura exterior a la membrana, que se denomina cápsula, constituida por una capa laxa e hidratada de polisacáridos que le dan el aspecto mucoso y viscoso de las colonias observadas en cultivo, posee características antigénicas, siendo mediadora de interacciones celulares y receptora de virus, teniendo como su principal acción la resistencia ante los fagocitos u otros agentes antibacterianos y la determinación de la capacidad de invasión. Adicionalmente posee fimbrias, que son estructuras de proteínas filamentosas, cuya función es la adhesión a superficies (fimbrias tipo I y tipo III) e interactuar en el proceso conjugativo como fimbrias sexuales (fimbrias F). (Echeverri & Cataño, 2010)

Se localiza a *Klebsiella pneumoniae* de manera normal en el medio ambiente, comunmente en superficies de plantas, agua y tierra; además forma parte de la flora normal en la mucosa de algunos mamíferos, de manera principal, en animales de granga como caballos y cerdos. (Lopez & Echeverri, 2010)

En el humano se ubica específicamente en la mucosa intestinal y en la nasofaringe, observando una tasa de detección en adultos portadores en materia fecal de entre 5% a 38% y en nasofaringe de entre 1% a 6%; se menciona que la tasa de colonización en el área hospitalaria tiende a un aumento de hasta tres veces, directamente proporcional a la presión selectiva de los antibióticos en la flora normal y a la permanencia en la estancia hospitalaria, por ello se considera como factores principales para la transmisión hospitalaria de la bacteria al personal al cuidado del paciente por contacto directo y al

tracto gastrointestinal de las personas hospitalizada; adicionando se presenta como la segunda causa de infecciones bacterianas por cepas Gram-negativas, debido a que comúnmente es factor primordial en infecciones del tracto urinario. (Bailón & Sacsaquispe, 2013)

2.5 Características metabólicas

Se la considera anaerobia facultativa, debido a que su metabolismo es fermentativo y respiratorio, puede fijar el nitrógeno en procesos de anaerobiosis, utilizan citrato y glucosa como única fuente de carbono, fermentan el inositol, hidrolizan la úrea y no produce H2S, ni ornitina descarboxilasa. Su temperatura óptima de crecimiento varía entre 30ºC a 37ºC, y algunas cepas suelen presentarse como lisogénicas, además de producir enterotoxinas lábiles, bacteriocinas (klebecinas) y exotoxinas. (Bailón & Sacsaquispe, 2013)

2.6 Factores de virulencia

Algunas estructuras morfológicas descritas anteriormente se presentan como factores de virulencia, destacando: el antígeno O u antígeno somático perteneciente a la pared celular, constituido por el antígeno O, el core y el lípido A; el antígeno F o antígeno fimbrial mediado por fimbrias; y, el antígeno K o antígeno capsular presente únicamente en cepas con cápsula. (Echeverri & Cataño, 2010)

2.7 Mecanismo de acción de los antibióticos

Los betalactámicos representan a una gran variedad de moléculas con actividad antibiótica, cuya característica se basa en la presencia de una *lactama* de cuatro miembros; su núcleo betalactámico está unido a un segundo anillo que difiere entre grupos, como ejemplo, las penicilinas poseen un anillo de thiazolidina, y las cefalosporinas un anillo de thiazina en su estructura, mientras que los monobactámicos

carecen de dicho anillo. Según su estructura nuclear se clasifican en: penicilinas (penam, penem, clavam, clavem, carbapenam y carbapenem), cefalosporinas (cefam, cefem, oxacefam, carbacefam y carbacefem) y monobactámicos. (Gayosso Cerón, 2012)

Dentro de los antibióticos utilizados con más frecuencia en el área clínica tenemos:

- Penicilinas: bencilpenicilina (Penicilina G), isaxozalilpenicilinas (Oxacilina), aminopenicilinas (Ampicilina, amoxicilina), Carboxipenicilinas (Carbenicilina, ticarcilina), acilureidopenicilinas (Azclocilina, mezclocilina) y temocilina (temocilina).
- Cefalosporinas: 1ª generación (Cefazolina, cefalotina), 2ª generación (Cefoxitina, cefuroxima), 3ª generación (Cefotaxima, ceftazidima) y 4ª generación (Cefpiroma, cefepime).
- Carbamenémicos: imipenem, meropenem y ertapenem.
- Monobactámicos: aztreonam.

La capacidad de unión covalente a la enzima y su permanencia con el fin de bloquearla y saturarla hace que un antibiótico betalactámico se considere óptimo; en cuanto a los betalactámicos, existen dos mecanismos de acción descritos que intervienen directamente: la inhibición de las proteínas PBPs y la lisis mediada por autolisinas. (Gayosso Cerón, 2012)

Las proteínas de unión a la penicilina o PBPs son el blanco de unión entre el residuo de serina y los residuos de acil-D-alanil-D-alanina del peptidoglicano, sus funciones se presentan como transpeptidasas y carboxipeptidasas, inhibiendo de manera general y específica a las PBPs; se producen tres reacciones donde la unión se presenta de carácter reversible: al formar un complejo no covalente en el momento de reconocer

la enzima PBP al sustrato, formando una unión covalente con enlace tipo éster entre el antibiótico y la enzima al adicionar un grupo acilo con residuo de serina a la enzima en su centro activo, y al producirse una reacción que libera la enzima y consigo un producto de la inactivación antibiótica. (Murray, 2009)

Las autolisinas, por su parte intervienen en: la separación de las células por división, en la liberación de fagos, en los procesos de transformación genética y en el crecimiento celular, generando rupturas en la estructura del peptidoglicano; se considera que una vez bloqueado el crecimiento por inhibición de las PBPs la acción lítica de las autolisinas culmina con el proceso. (Echeverri & Cataño, 2010)

2.8 Mecanismos de resistencia a antibióticos

La resistencia de un microorganismo es su capacidad para soportar los efectos que produce un antibiótico en este, dicha resistencia se presenta de dos tipos: de manera natural, es decir propia del género y especie; y adquirida mediante efectos bioquímicos que se codifican en los cromosomas, o debido a la transmisión por estructuras móviles como plásmidos o transposones. (Paciel, Seija, Prieto, Vignol, Media, & Savio, 2011)

La clasificación de la resistencia a los antimicrobianos se presenta de acuerdo a la cantidad de antibióticos inhibidos, obteniendo tres grupos de bacterias clasificadas de acuerdo a su espectro de acción enzimática:

- Las bacterias Multirresistentes (MDR) que son resistentes por lo menos a 3 de los antibióticos que se sabe presenta sensibilidad,
- Las Extensamente resistentes (XDR) que poseen sensibilidad máxima a 2 antimicrobianos,

- Las Panresistentes (PDR) que presentan una resistencia total a los antimicrobianos comercialmente disponibles. (Paciel, Seija, Prieto, Vignol, Media, & Savio, 2011)

El conocimiento de los mecanismos mediante los cuales las bacterias poseen la capacidad de resistir la acción de los antibióticos es fundamental dentro del estudio bacteriológico, debido al gran aumento de casos de bacterias con resistencias combinadas transmitidas por elementos móviles principalmente. (Lopez & Echeverri, 2010)

Estas bacterias realizan contacto mediante la adherencia al hospedero mediadas por proyecciones filamentosas llamadas pillis, y a pesar que el mecanismo de resistencia inmune de los factores séricos relacionado con la activación del complemento aún se presenta desconocida, se presume una ocultación de los lipopolisacárido de la cápsula bacteriana evitando la activación del complemento; dichos microorganismos producen agentes quelantes denominados sideróforos (enterobactinas y aerobactinas) para la obtención de hierro de las células del hospedero, sustancia indispensable para el desarrollo bacteriano; además el género *Klebsiella* describe la producción de hemolisinas, enterotoxinas y citotoxinas, factores que poseen un menor lugar en la patogenicidad. (Murray, 2009)

2.8.1 ***Cambios en la permeabilidad de la membrana:*** las bacterias a más de tener la capacidad de provocar cambios en la bicapa lipídica, también producen una alteración en las porinas, elementos que forman canales introducidos en la membrana, que se encuentran llenos de agua y permiten la entrada de varios elementos, por lo que al producirce el cierre de dichas estructuras la permeabilidad se pierde. (Moreno K. , 2013)

2.8.2 ***Bombas de expulsión:*** la bacteria opera mediante un mecanismo que le permite tomar al antibiótico del espacio periplásmico y lo expulsa hacia el exterior

de la membrana celular, evitando la unión con su sitio de acción. (Moreno K. , 2013)

2.8.3 ***Alteraciones del sitio de acción:*** las bacterias poseen la capacidad de alterar el sitio en el que el antibiótico actúa, se produce una alteración en las proteínas de unión a la penicilina (PBP), las cuales están involucradas en las etapas finales de la síntesis de peptidoglucano, principal componente de la pared celular de las bacterias, principalmente en Gram-negativas. (Moreno K. , 2013)

2.8.4 ***Modificación enzimática:*** la bacteria posee la capacidad de producir enzimas que provocan cambios estructurales en el antibiótico, alteración que provoca una pérdida de su funcionalidad. (Moreno K. , 2013)

2.9 Enzimas y genes implicados en la resistencia antimicrobiana

2.9.1 *Betalactamasas*

Las betalactamasas o "penicilin (cefalosporin) amido-betalactam hidrolasas" son enzimas con capacidad de hidrolizar el anillo betalactámico, dando como resultado compuestos sin actividad antibacteriana debido a que pierden la capacidad de unión de las PBPs. (Navarro & Miró, 2010)

Se clasifica a las betalactamasas según una propuesta que unifica criterios de clasificación descrita por Bush, Jacoby y Medeiros, obteniendo 4 grupos:

- En el grupo 1 se encuentran según su secuencia de aminoácidos las clasificadas en clase C, hidrolizan cefalosporinas, presentan un residuo de serina en su centro activo y no se inhiben por el ácido clavulánico. Se incluyen las betalactamasas cromosómicas inducibles y constitutivas tipo AmpC y las betalactamasas plasmíticas tipo AmpC.

- En el grupo 2 según su secuencia de aminoácidos se encuentran las pertenecientes a las clases A o D, presentan un residuo de serina en su centro activo, son inhibidas por ácido clavulánico e incluyen penicilinasas cromosómicas y plasmíticas de bacterias GRAM positivas, betalactamasas plasmíticas clásicas (TEM-1-2 y SHV-1), betalactamasas plasmídicas modificadas de las descritas anteriormente, betalactamasas resistentes a inhibidores de betalactamasas, betalactamasas cromosómicas de *K. pneumoniae, K. oxytoca, P. vulgaris,* oxacilinas clásicas y de espectro extendido tipo plasmíticas de *P. aeruginosa* y carbapenemasas cromosómicas.

- En el grupo 3 se ubican según su secuencia de aminoácidos las que pertenecen a la clase B o metalobetalactamasas, hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, no son inhibidas por ácido clavulánico e incluyen betalactamasas plasmíticas IMP de *K. pneumoniae, S. marcensens y P. aeruginosa.*

- En el grupo 4 se encuentras las penicilinasas no inhibidas por el ácido clavulánico, cuya caracterización final está por realizarse. (Bush & Jacoby, 2010)

2.9.2 *Betalactamasas resistentes a inhibidores de betalactamasas (IRT)*

Las betalactamasas IRT o Betalactamasa resistentes a inhibidores de betalactamasas por sus siglas en inglés, fueron descritas en la década de los 90, mediante análisis que presentaron inhibición por el ácido clavulánico; su secuencia de nucleótidos revela variantes de betalactamasas TEM-1 o TEM-2, existiendo 19 sub-tipos diferentes en la actualidad. (Bush & Jacoby, 2010)

2.9.3 *Betalactamasas cromosómicas*

Las betalactamasas cromosómicas son sintetizadas por casi todas las bacterias, en poca cantidad y generalmente sin conferir resistencia; sin embargo, se evidencia en

algunas un incremento en la síntesis de la enzima, observando un aumento en su grado de expresión. (Bush & Jacoby, 2010)

La enzima AmpC puede conferir resistencia a todas las penicilinas, las cefalosporinas de primera y segunda generación y algunas de tercera, además pierden la sensibilidad con las asociaciones de inhibidores de betalactamasas, manteniendo sensibles cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos. (Navarro, Calvo, Cantón, Fernandez, & Mirelis, 2011)

Otras betalactamasas cromosómicas con perfil hidrolítico amplio son las metaloenzimas o de clase B, que afectan a cefalosporinas, penicilinas y carbapenémicos; además no son inhibidas por el ácido clavulánico, se producen en microorganismos multirresistentes y se las denomina carbapenemasas. (Navarro & Miró, 2010)

2.9.4 *Betalactamasas plasmídicas*

Existe una amplia difusión de betalactamasas plasmídicas en bacterias Gram-negativas, y su incidencia se refleja según la especie a tratar; se encuentran codificadas por genes localizados en elementos móviles, como plásmidos o transposones, se diferencian por su peso molecular, y su espectro de inhibición, además poseen actividad hidrolítica de amplio espectro. (Navarro & Miró, 2010)

Su clasificación está basada en el espectro de acción y en la clase molecular de cada enzima, obteniendo:

2.9.4.1 Enzimas de resistencia relacionadas a TEM y SHV

- Las enzimas de amplio espectro de clase molecular A y D, que engloban los grupos 2b, 2c y 2d de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros; descrbiendo, debido a su importancia cuantitativa y capacidad de difusión a TEM-1, TEM-2 y

SHV-1 de entre las relevantes, e incluyen varias del grupo 2b, 2d o enzimas de tipo OXA y 2c.

- Las enzimas de espectro ampliado derivadas de TEM y SHV que forman el grupo 2be de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros. Como característica no alteran la sensibilidad frente al imipenem y son inhibidas por el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam; se las nombra con las iniciales de la betalactamasa seguido de un número de orden y se han descrito hasta SHV-37 y TEM-96. En su mayoría, dichas enzimas han sido aisladas a nivel hospitalario en cepas de *Klebsiella pneumoniae.*

- Las enzimas de espectro ampliado con resistencia a los inhibidores de betalactamasas derivadas de TEM y SHV que conforman el grupo 2br de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros, incluyendo las betalactamasas SHV-10 y las TEM-30 a 41, 44, 45, 50, 51, 58 y 59.

2.9.4.2 Enzimas de resistencia no relacionadas con TEM y SHV

- Donde se destacan algunas variantes pertenecientes a la clase molecular A, donde se presentan dos grupos, las enzimas que hidrolizan con preferencia cefotaxima denominadas cefotaximasas (CTX-M, Toho-1 y Toho-2), con mayor actividad por las cefalosporinas de tercera generación, y las enzimas que hidrolizan preferentemente ceftazidima denominadas ceftazidimasas (variantes de PER y VEB-1).

- Las metalo-b-lactamasas se ubican en la clase molecular B y se caracterizan por conferir resistencia a carbapenémicos, que incluyen las enzimas IMP-1 y CcrA.

- Las enzimas presentes en la clase molecular C son codificadas por plásmidos, que poseen genes AmpC cromosómicos, causando resistencia frente a betalactámicos

con excepción de carbapenemasas, incluyen las variantes CMY, FOX, LAT, MOX, MIR-1, ACT-1, BIL-1, FEC-1 y MOR-1.

- Las enzimas situadas en la clase molecular D que incluye las variantes OXA-11 a 17, condicionando resistencia a cefalosporinas de tercera generación, demostrando hidrólisis de cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y aztreonam. (Morejón García, 2013)

2.9.5 *Betalactamasa tipo CTX-M*

Se describe que las *ß*-lactamasas tipo CTX-M poseen una actividad altamente hidrolítica frente a cefalosporinas, clasificándolas según la secuencia de aminoácidos que poseen en cinco grupos filogenéticos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25, con variantes descritas en cada grupo; dicho gen deriva de *ß*-lactamasas cromosómicas de *Kluyvera*. Algunas variantes de CTX-M-1 se han descrito que actúan específicamente sobre varias cefalosporinas, así se detalla a, CTX-M-3 que hidroliza cefotaxima y CTX-M-15 que inhibe la ceftazidima. (Ripoll, 2014).

2.9.6 *Betalactamasas tipo AmpC*

Las *ß*-lactamasas tipo AmpC se encuentra en la clase C de la clasificación estructural de Ambler y al grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros, se caracterizan por su actividad frente a penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, oximinocefalosporinas y monobactámicos, con excepción de carbapenémicos y cefalosporinas de cuarta generación; sin embargo, su expresión es de bajo nivel, está mediada por el operon *amp* y se induce como respuesta de la exposición a *ß*-lactámicos. (Seral, Gude, & Castillo, 2012)

2.9.7 *Betalactamasas tipo CMY*

La diferencia en las secuencias de aminoácidos han dado lugar a 6 familias de enzimas de resistencia tipo AmpC que pueden ser transportadas por elementos móviles como plásmidos, encontrando como las variantes más comunes las denominadas CIT que incluye los grupos CMY y LAT, mismas que poseen dos orígenes, tanto relacionada con *Aeromonas spp*., indicando tres variantes de CMY (1, 8, 9) y con *Citrobacter freundii* determinándose como única variante a CMY-2. (Seral, Gude, & Castillo, 2012).

2.9.8 *Betalactamasa tipo DHA*

Las enzimas tipo AmpC descritas como DHA, se encuentran categorizadas como DHA-1 y DHA-2, dichos tipos derivan del gen bla_{AmpC} de *Morganella morganii* considerada como una enzima inducible. (Seral, Gude, & Castillo, 2012).

2.10 Resistencia natural

Estudios indican que las cepas de *Klebsiella pneumoniae,* ostentan como única resistencia natural, la presencia de bajos niveles de una Betalactamasa, considerada en los textos como plasmídica de amplio espectro, BLEA en sus siglas en inglés, descrita como SHV-1. A pesar de los bajos niveles de enzima producidos, dicha bacteria, presenta una resistencia natural contra amino y carboxipenicilinas, inhibiendo principalmente ampicilina, amoxicilina, carbecilina y ticarcilina; no obstante se puede presentar sensibilidad a los antibióticos mencionados, debido a que la poca cantidad de enzima podría no ser suficiente para actuar frente al antimicrobiano. (Galas & WHONET-Argentina, 2013).

2.11 Resistencias adquiridas a betalactámicos

A lo largo de los años se han descrito varias cepas de *Klebsiella pneumoniae* con

resistencia a betalactámicos, diversos análisis se han desarrollado a nivel mundial y regional, demostrando la capacidad de dicha bacteria para adquirir resistencias y diseminarse a nivel hospitalario.

Un estudio realizado en India por Sharma, Sharma y Ray (2010), en 100 aislados de *Klebsiella pneumoniae*, demostró que 56% de las cepas obtuvieron positividad para el gen TEM y 60% para el gen SHV. Mientras que, en el mismo año en Irán, se presentó un análisis de 200 aislados provenientes de hospitales públicos y privados, donde se evidenció la presencia de los genes *bla*SHV con un 23%; *bla*CTX-M con un 22,5%; *bla*TEM con un 16%; y, *bla*PER con un 7,5% de positividad. (Nasehi, Shahcheraghi, Sadat, & Nematzadeh, 2010)

En Colombia, Pulido, Mantilla y otros (2011), presentaron un estudio que comprendió en el análisis de 177 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, demostrando la detección de 107 aislamientos con CTX-M-1, de 170 cepas con positividad para SHV y 128 con presencia del tipo TEM.

Finalmente, en el año 2012 en Ecuador, se presenta un estudio de caso clínico donde detallan la primera cepa de *Klebsiella pneumoniae* con positividad para la carbapenemasa tipo KPC-2. (Iñiguez, Zurita, Alcocer, Ortega, Gómez, & Maldonado, 2012)

2.12 Co-resistencias de betalactamasas de espectro extendido en *Klebsiella pneumoniae*

Se describen co-resistencias bacterianas en varios estudios a nivel mundial en cepas relacionadas a la atención de la salud.

En el año 2011, en Trinidad y Tobago se realiza la detección molecular y epidemiología de genes de betalactamasas en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*,

obteniendo que el 84,3% de cepas contenían el gen TEM, 34,5% el gen SHV y el 58,8% el gen CTX-M. (Akpaka, Legal, & Padman, 2010)

En un estudio realizado en Colombia en el año 2011, se presentan combinaciones entre los tres genes analizados (TEM, SHV y CTX-M) en un 52% de los 177 aislados de *Klebsiella pneumoniae*, con una relación más particular entre el gen CTX-M-1 y SHV en un 5,6%; y, la combinación entre el gen CTX-M-1 y TEM en 4% de las cepas. (Pulido, Mantilla, Valenzuela, Reguro, & Gonzalez, 2011)

Otro estudio similar, realizado en Valledupar, Colombia, en el año 2012 presenta 5 cepas de *Klebsiella pneumoniae* que evidencian corresistencia, de las cuales, dos poseen los genes TEM, SHV y CTX-M, dos manifiestan una combinación entre BLEE y AmpC, y la restante únicamente los genes TEM y SHV. (Martinez, Garzón, & Mattar, 2012)

2.13 Ensayos fenotípicos para la detección de BLEE

Para los ensayos fenotípicos de resistencia se realiza el método de difusión por disco siguiendo los puntos de corte del CLSI 2015 con el fin de observar tanto el perfil de susceptibilidad bacteriano en el halo de inhibición, como la presencia de genes de resistencia antimicrobiana por medio de los efectos de inhibición presentes al exponer a la bacteria frente a discos antibióticos combinados. (Patel, et al., 2015).

Esta prueba se realiza en un agar Mueller-Hinton con previa suspensión bacteriana 0,5 Mc Farland. (Nicola, Nievas, & Smayevsky, 2012)

Para la detección de BLEE el CLSI recomienda técnicas de tamiz y confirmatorias, que pueden ser realizadas por el método de difusión de disco o por el método de microdilución; la prueba de tamizaje inicial consta en enfrentar a la bacteria a 5 antibióticos con concentración conocida, y utilizando los puntos de corte se determina como BLEEs potenciales las cepas que obtengan: aztreonam $\leq$ 27mm, cefotaxima $\leq$

27mm, cefpodoxima ≤ 17mm, ceftazidima ≤ 22mm, ceftriaxona ≤ 25mm. (Patel, et al., 2015)

Como pruebas confirmatorias se presenta la diferencia existente entre una cefalosporina de tercera (cefotaxima o ceftazidima) y la misma cefalosporina combinada con un inhibidor de betalactamasas (ácido clavulánico) determinando como potenciales BLEE a las cepas resultantes en un incremento ≥ 5mm. (Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana de Bogotá, 2010)

El método de microdilución en caldo mantiene el mismo concepto de la prueba anterior, en cuanto a la utilización de antibióticos, empleando caldo de agar Muller Hinton adicionando diluciones del aislado a estudiar y de cada antibiótico. Para la prueba confirmatoria se verifica la disminución de 3 o más diluciones en la combinación de cefalosporinas más el inhibidor de betalactamasas. (Malbrán, 2012)

Otras pruebas consideradas para la detección de BLEE son: el método de E-Test y la prueba de doble disco. La prueba de E-Test consiste en realizar un inóculo de la cepa en agar Muller Hinton siguiendo los lineamientos del CLSI para difusión de disco, para posteriormente, colocar sobre dicho inóculo, una tira que contiene una concentración decreciente de una cefalosporina de tercera generación (ceftazidima) en un extremo y la combinación del mismo antibiótico con una concentración fija de ácido clavulánico en el otro, con el fin de observar la reacción entre el antibiótico y el inóculo bacteriano. (Calvo, Cantón, Fernández, Beatriz, & Navarro, 2011)

Se determina los puntos de acuerdo a la elipse de inhibición, considerando como BLEE positivas a las cepas cuya división, entre los datos del extremo con el antibiótico solo, para el extremo con el inhibidor, presenten un resultado ≥ 8. (Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana de Bogotá, 2010)

La prueba de difusión de doble disco consiste en la utilización de un disco convencional de amoxicilina/ácido clavulánico ubicado de manera céntrica y dos discos laterales de ceftazidima y cefotaxima en agar Muller Hinton con previa suspensión bacteriana, con el fin de observar una ampliación o deformación en el halo de inhibición, determinando la presencia de BLEE. (Calvo, Cantón, Fernández, Beatriz, & Navarro, 2011)

2.14 Ensayos fenotípicos para la detección de AmpC

Para la detección de AmpC en el laboratorio, cabe destacar que no existe una técnica estandarizada por el CLSI; pero se puede utilizar la prueba de tamizaje de BLEE para presumir su presencia, aunque se debe tomar en cuenta que las enzimas AmpC plasmídicas son capaces de hidrolizar cefalosporinas de hasta tercera generación a más del clavulanato, tazobactam y sulbactam resultando en una prueba falsa para BLEE. (Seral, Gude, & Castillo, 2012)

Existen varios métodos a utilizar para la identificación de dicha resistencia:

- La prueba de discos para AmpC, se basa en un inóculo de una cepa sensible (*E. coli* ATCC 25922) según las recomendaciones del CLSI para el método de difusión de disco en agar Muller Hinton, se adiciona un disco de cefoxitin de 30ug y junto a él un disco de Tris-EDTA que permeabiliza la célula bacteriana permitiendo que la betalactamasa se libere, sobre dicho disco, se colocan diversas colonias de la cepa a estudiar. Un resultado positivo destaca la inactivación enzimática mediante un achatamiento de la zona de inhibición cercano al disco de cefoxitin. (Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana de Bogotá, 2010)
- La prueba del disco de ácido fenil borónico, basada en verificar la diferencia existente al enfrentar en un agar Muller Hinton los discos de ceftazidima y

cefotaxima, frente a los mismos discos adicionados un inóculo de 30uL de una solución de ácido fenil borónico. El resultado se presenta positivo para AmpC al encontrar una diferencia superior o igual a 5mm en los discos con el inhibidor. (Calvo, Cantón, Fernández, Beatriz, & Navarro, 2011)

- El Test tridimensional para la detección de AmpC mediada por plásmidos consiste en efectuar un inóculo con la cepa de *E. coli* ATCC 25922 en un agar Muller Hinton, se coloca un disco de cefoxitin y se realiza una hendidura de 5mm desde el borde del disco de manera radial en el que se coloca un extracto del concentrado celular de la muestra. Un resultado positivo denota un incremento en el crecimiento bacteriano en el sector en el que se intercepta la zona de inhibición y la hendidura. (Jacoby & George, 2009)
- La prueba con agar suplementado con cefoxitin permite la diferenciación de AmpC mediante un cultivo fresco en tripticasa de soya del microorganismo a estudiar, el cual se centrifuga obteniendo un extracto enzimático, la placa de agar Muller Hinton se inocula con la cepa *E. coli* ATCC 25922 y se utilizan diferentes concentraciones de cefoxitin (2, 4, 8 y 16 ug/mL), en la superficie del agar se realizan pozos circulares de 5mm de diámetro y se adiciona 30uL del extracto celular de la muestra, un resultado positivo se presenta al observar crecimiento alrededor de la periferia del pozo. (Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana de Bogotá, 2010)

2.15 Pruebas moleculares para la detección de mecanismos de resistencia a betalactámicos.

2.15.1 *PCR*

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un ensayo de biología molecular que se basa en la reproducción in vitro de varios números de copias de ADN de una región del genoma, en este caso, una amplificación del genoma bacteriano, mediante una polimerasa que soporta temperaturas elevadas de la bacteria *Thermus aquaticus,* conocido comercialmente como *taq* polimerasa. (Pérez de Castro, 2011). Dichas fases se encuentran descritas acontinuación:

- **Desnaturalización:** se basa en la separación de las hebras o cadenas de ADN a una temperatura requerida de alrededor de 94 grados centígrados. Se realiza un pre-paso, una elevación de temperatura a 94 grados centígrados por varios minutos, con el fin de activar la *taq* polimerasa.

- **Hibridación:** permite que los cebadores se unan al ADN molde mediante complementariedad provocado por un descenso en la temperatura, así, se produce el alineamiento. El termociclador reajusta la temperatura entre 40 a 60 grados centígrados, rompiendo y formando de manera constante puentes de hidrógeno (oligonucleótido-ADN) hasta formar enlaces complementarios en las uniones más estables creando una región de doble cadena. La taq polimerasa se une al segmento de doble cadena, iniciando una copia en sentido 5'--- 3'.

- **Elongación:** es la continuidad en la incorporación de los nucleótidos complementarios desde el extremo 3' libre en los cebadores hibridados y con el fragmento ya alineado, mediado por la enzima polimerasa, la temperatura dependerá del tipo de polimerasa utilizada, así, la Taq polimerasa utilizada en este

estudio opera a 72 grados centígrados, temperatura en la cual dicha enzima alcanza su máxima actividad. Finalmente, por varios minutos se realiza un proceso de elongación a 64 grados centígrados. (Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2010)

Este proceso posee varios ciclos, cada uno de los cuales se compone por las tres fases descritas anteriormente. El primer ciclo obtiene una copia de un fragmento de ADN, la polimerasa sintetizará la mayor cantidad de bases posibles, por ello, dicho fragmento no poseerá el tamaño esperado, después al repetirse de manera igual las tres temperaturas, los oligonucleótidos se unirán a un nuevo fragmento similar al del primer ciclo y a los dos fragmentos de ADN que fueron sintetizados en el primer ciclo, por tanto, el segundo ciclo obtendrá 2 fragmentos largos, copia directa del ADN y 2 fragmentos del tamaño esperado, provenientes de los oligonucleótidos ya sintetizados.

El número de ciclos continúa multiplicando los fragmentos dependiendo del tamaño del segmento de ADN que se amplificará. Un proceso de 30 ciclos con cada cambio de temperatura provocando desnaturalización, hibridación y síntesis produce en teoría una amplificación de 2^{36} veces del producto original, lo que representa 68 billones de copias. Finalmente es analizado mediante electroforesis en gel y se observan sus resultados mediante un fotodocumentador con luz ultravioleta. (Pérez de Castro, 2011). El proceso se esquematiza en la **Figura 1**.

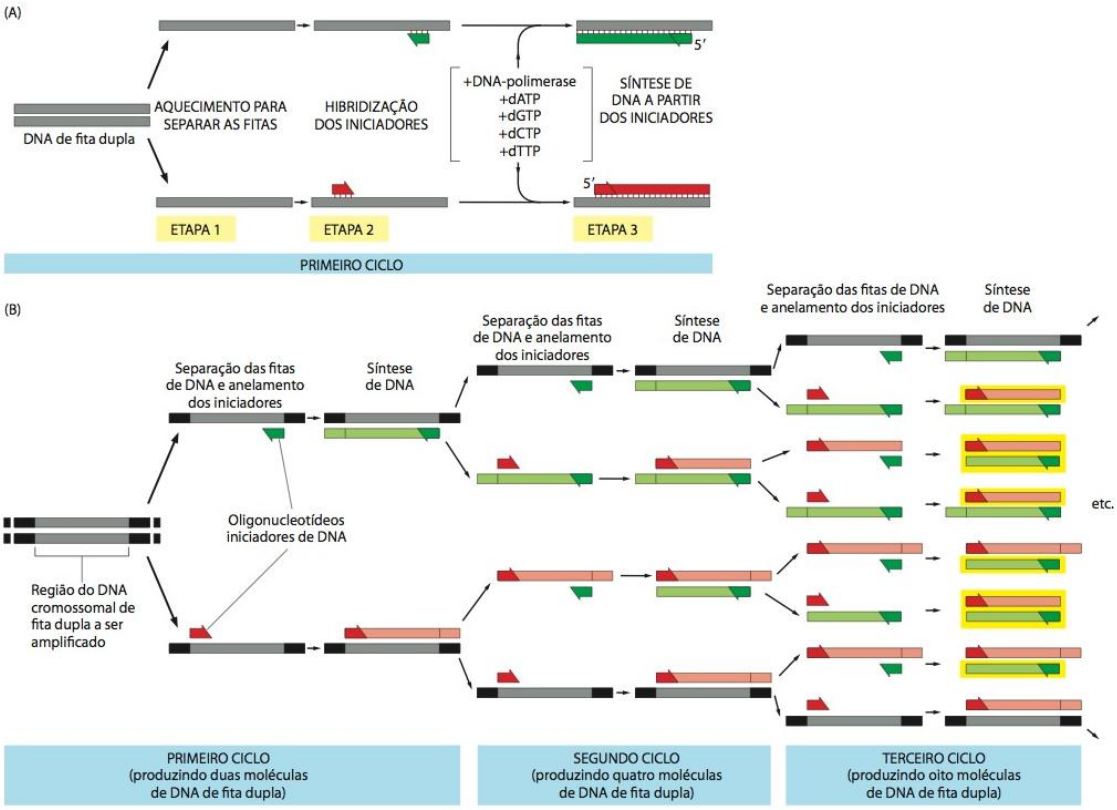


Figura 1. Esquema de la técnica de Reación en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esquema gráfico explicativo de las tres fases que componen el proceso de termociclado de la técnica de PCR. Fuente: Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). Biologia Molecular da Célula (Vol. Quinto). Sao Paulo, Brasil: Artmed.

2.16 *Primers* para la detección de genes de resistencia.

Se redefinieron los parámetros a usarse en la técnica de PCR, con el fin de utilizar el mismo método para todos los genes, tanto en la preparación de la solución Máster Mix, como en el tiempo de extensión final empleado en el proceso de termociclado.

Tabla 1. *Primers* para la detección de genes de resistencia. Primers utilizados para la detección de los genes (TEM, SHV-1, CTX-M, CMY y DHA) propuestos, extraídos de un estudio hecho por Danellenne, et.al, en Francia, (2010), utulizados para analizar 66 cepas de *Klebsiella pneumoniae* KPC+ provenientes de Hopitales de la Red Pública Integral de Salud del Ecuador en los años 2013-2015.

Gen de resistencia	Variantes genéticas incluidas	Nombre del *primer*	Secuencia (5´- 3´)	Longitud de bases	Posición	Tamaño amplicón (pb)
TEM	TEM-1 TEM-2	MultiTSO-T_forward MultiTSO-T_reverse	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	22 22	13–34 812–791	800
SHV	SHV-1	MultiTSO-S_forward MultiTSO-S_reverse	AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC ATCCCGCAGATAAATCACCAC	21 21	71–91 783–763	713
CTX-M	Grupo 1 CTX-M-1 CTX-M-3 CTX-M-15	MultiCTXM Gp1_forward MultiCTXM Gp1-2_reverse	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	20 21	61–80 748–728	688
CMY	CMY-1 CMY-8 CMY-11 CMY-19 MOX-1 MOX-2	MultiCaseMOX_forward MultiCaseMOX_reverse	CAACAACGACAATCCATCCT GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA	21 22	3–23 900–879	895
DHA	DHA-1 DHA-2	MultiCaseDHA_forward MultiCaseDHA_reverse	TGATGGCACAGCAGGATATTC GCTTTGACTCTTTCGGTATTCG	21 22	113–133 1109-1088	997

CMY: gen de resistencia tipo AmpC; CTX-M: gen de resistencia frente a cefalosporinas; DHA: gen de resistencia tipo AmpC; SHV: gen de resistencia frente a b-lactámicos natural en *Klebsiella pneumoniae*; TEM: gen de resistencia frente a b-lactámicos.

Fuente: Dallenne, C., Da Costa, A., Decre´, D., et.al. (12 de enero de 2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important b-lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal Antimicrob Chemother*.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

2.2 MARCO CONCEPTUAL

2.2.1 Definición de conceptos

Amplicón: son las secuencias amplificadas del fragmento de ADN, sus límites son denominados cebadores. (Herbeg, Barcia-Macay, & Lethe, 2006).

Betalactámicos: son antibióticos que en su estructura poseen un anillo β-lactámico y actúan en la pared bacteriana. (Cavallini, Coronado, Chavarría, & García, 2005)

Cebadores: cadena de nucleótidos por medio de los que la ADN polimerasa da inicio a una nueva molécula de ADN. (López-Pueyoa, Barcenilla-Gaiteb, Amaya-Villarc, & Garnacho-Monteroc, 2011).

Diseminación: paso de la infección bacteriana de un lugar a otro, principalmente de un lugar u órgano focalizado a un sector mayor o a todo el organismo. (Puerta-García & Mateos-Rodriguez, 2010).

Enterobacterias: son bacterias GRAM negativas que reciben su nombre por su localización más frecuente en el tracto digestivo, ocupan sus nutrientes de un huésped, en este caso el humano, se encuentra en todo el mundo y algunos forman parte de nuestra flora intestinal. (Puerta-García & Mateos-Rodriguez, 2010).

Espectro de acción: se refiere a la cantidad de actividad que tiene un antibiótico frente a una bacteria, tenemos dos tipos los que actúan sobre varias especies y géneros y los que actúan sobre grupos reducidos denominados de espectro amplio y reducido respectivamente. (Seija, 2008).

Fenotipos: se denomina fenotipo a la expresión y manifestación visible del genotipo en un determinado ambiente. (Zeron, 2011).

Gen: es el fragmento más pequeño de una molécula de DNA que posee la información completa para presentar características determinadas. Un grupo de los mismos genes se denomina genotipo. (Sobrarbe, 2011).

Hidrólisis: destrucción de una sustancia debido al agua al formar compuestos alternos por destrucción de enlaces y formación de los mismos. (Sobrarbe, 2011)

Infecciones asociadas a la atención de la salud: son infecciones adquiridas por el paciente mientras recibe tratamiento por alguna condición médica o quirúrgica y que no había sido manifestada con anterioridad al ingreso a la institución de salud. (Instituto Nacional de Salud de Colombia, 2011).

Multirresistentes: es la resistencia a más de un grupo de antibióticos, debe presentarse en más de una familia o grupo antimicrobiano y que sea de relevancia clínica. (López-Pueyoa, Barcenilla-Gaiteb, Amaya-Villarc, & Garnacho-Monteroc, 2011).

Peptidoglucano: es también denominada mureína y está constituida por dos amino azúcares acetilados la N- acetilglucosamina y el ác. N-acetilmurámico. (Gutiérrez & Sanhueza, 2013).

Periplásmico: es el espacio que se encuentra entre las membranas interna y externa en las bacterias GRAM negativas y al espacio junto a la membrana interna en bacterias GRAM positivas. (Zeron, 2011)**.**

Plásmido: son moléculas de ADN extra cromosómico, se replican y transcriben de manera independiente y pueden transmitirse entre familias y especies. (Sobrarbe, 2011).

Polimerasa: es una enzima que posee la capacidad de replicar o transcribir ácidos nucleicos. (Espinosa Asuar, 2007).

Porinas: son proteínas con estructura β, las mismas que se encuentran formadas por láminas β, las que crean la funcionalidad de permitir el paso de sustancia en la membrana bacteriana. (Morejón García, 2013).

Quinolonas: son antibióticos con toxicidad selectiva que actúan sobre la ADN Girasa y la Topoisomerasa II de la bacteria. (Murray, Microbiología Médica, 2009).

Resistencia bacteriana: es la disminución de la acción o la eliminación total del antibiótico frente a las bacterias. (Murray, 2009).

Serina: es un aminoácido dentro del grupo de los 20 que componen las proteínas codificadas por el genoma. (Morejón García, 2013).

Transposones: secuencias de ADN que poseen la capacidad de moverse de manera autosuficiente entre los elementos génicos de las células. (Murray, Microbiología Médica, 2009).

2.3 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

2.3.1 Operacionalización de variables

2.3.1.1 Variable dependiente: Estandarización de la PCR para la detección de co-resistencia.

2.3.1.2 Variable independiente: cepas invasivas de *Klebsiella pneumoniae KPC* positivas pertenecientes a Hospitales de la Red Pública Integral de Salud del Ecuador.

Variable dependiente	**Definición**	**Dimensiones**	**Descripción**	**Indicadores**	**Instrumento de medida**
Co-resistencia en cepas de *Klebsiella pneumoniae KPC +*	Presencia fenotípica y genotípica de resistencias conjuntas en un mismo aislamiento. (Otto, Lorenzo, & Restrepo, 2002)	Cualitativo: Presente/Ausente	Presencia de genes que codifican varios mecanismos de resistencia y se expresa en los nuevos huéspedes bacterianos. (Morris & Champman, 2014)	Frecuencia relativa %	Identificación bioquímica bacteriana.
Variable independiente	**Definición**	**Dimensiones**	**Descripción**	**Indicadores**	**Instrumento de medida**
Edad	Tiempo que ha vivido una persona. Se definirá en grupo de edades. (Academia Española, 2014)	Cualitativo	Pediátrico: entre 0 a 18 años de edad Joven: entre 19 a 35 años de edad Adulto: de 36 a 80 años en adelante	Frecuencia relativa %	Base de datos WHONET INSPI-Q.
Sexo o genero	Diferencia entre un hombre y una mujer dada por las características sexuales. (Academia Española, 2014)	Cualitativo	Femenino Masculino	Frecuencia relativa %	Base de datos WHONET INSPI-Q.
Dependencia hospitalaria	Sector del hospital en el que el paciente se encuentra internado.	Cualitativa	Sala de internación hospitalaria.	Frecuencia relativa %	Base de datos WHONET INSPI-Q.
Identificación de las especies de *Klebsiella pneumoniae*	Determinación de especie y género en las muestras hospitalarias.	Cualitativo	Características de género y especie a nivel bioquímico.	Frecuencia relativa %	Pruebas bioquímicas de identificación
Pruebas fenotípicas específicas para la determinación de genes de resistencia	Determinación de resistencias a betalactámicos y cefalosporinas.	Cualitativo	Presencia de sinergia entre antibióticos específicos o halo de disco disminuido. (Criterio CLSI)	Frecuencia relativa %	Técnica de difusión en disco
Sensibilidad de las cepas ante los antibióticos	Capacidad del antibiótico para hidrolizar la cepa bacteriana.	Cuantitativo	Diámetro del halo de hidrólisis del disco en el antibiograma medido en (mm). (Criterio CLSI)	Frecuencia relativa %	Técnica de Kirby Bauer
Genes de resistencia a antimicrobianos	Genes que provocan alteración del efecto antibiótico en el microorganismo. (Otto, Lorenzo, & Restrepo, 2002)	Cualitativo: Presente/Ausente	Positividad ante la prueba.	Frecuencia relativa %	Reacción en Cadena de la Polimerasa.

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1.1 Tipo de Estudio

El estudio, estandarización de la técnica de *PCR* para la determinación de co-resistencias en cepas invasivas de *Klebsiella pneumoniae KPC* positivas, es de tipo descriptivo transversal debido a que se orienta en la observación y comparación de la presencia de los genes productores de los mecanismos de resistencia bacteriano a antibióticos de la familia de betalactámicos y cefalosporinas en cepas de *Klebsiella pneumoniae KPC* positiva, aisladas de pacientes hospitalizados con muestras invasivas de la red de Hospitales del Ecuador en un período de tiempo determinado.

3.1.2 Tipo de Muestreo y muestra

La investigación aplica un tipo de muestreo no probabilístico, de modo que se utilizan cepas de *Klebsiella pneumoniae* KPC positivas, procedentes de muestras invasivas, analizadas en el laboratorio de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI-Q en el periodo 2013 - 2015.

3.1.3 Tamaño de la muestra

El tamaño muestral, se definió mediante la siguiente fórmula, utilizando un grado de confianza del 95% y un error del 5%,

$$n = \frac{N[Z_{(1-\propto)}]^2 * p * q}{d^2 * (N-1) + [Z_{(1-\alpha)}] * p * q}$$

Dónde:

N: Población de estudio (80 cepas de *Klebsiella pneumoniae* de muestras invasivas analizadas en el periodo 2013 – 2015 en el Laboratorio de Referencia en Resistencias a los Antimicrobianos del INSPI-Q)

Error alfa (α): 0.05

Nivel de confianza (1- α): 0.95

$Z_{(\alpha-1)}$: 1.96

p= prevalencia. Trueba, B., Casares, M., Fidel, E., & Rodríguez, D. (Julio de 2012). Detección de mecanismos de resistencia en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multidrogorresistentes. *Revista Cubana de Medicina*.

q= 1 – p

d= precisión del estudio 0.05 (5%)

$$n = \frac{80[1.96]^2 * 0.475 * 0.525}{0.05^2 * (80-1) + [1,96]^2 * 0.475 * 0.525}$$

$$n = \frac{80\ (3.8416) * 0.2494}{0.0025 * (79) + (3.8416) * 0.2494}$$

$$n = \frac{307.328 * 0.2494}{0.1975 + 0.9581}$$

$$n = \frac{76.65}{1.156}$$

$$n = 66$$

Decisión: se determinó una prevalencia del 47.5% de un estudio previo realizado en la región en el año 2012, con un nivel de confianza del 95% y un error del 5%, resultando un tamaño de muestra de 66 cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de muestras invasivas.

3.1.4 Criterios de Inclusión:

- Información total sobre las muestras pertenecientes a los hospitales de segundo y tercer nivel de la Red Pública Integral de Salud del Ecuador, analizadas en el INSPI-Q entre los años 2013 - 2015.
- Muestras invasivas de los hospitales de segundo y tercer nivel de la Red Pública Integral de Salud del Ecuador, confirmadas como *Klebsiella pneumoniae KPC+* en el INSPI-Q entre los años 2013 y 2015.
- Cepas que resulten resistentes a penicilinas, monobactámicos y cefalosporinas, utilizando los puntos de corte del CLSI 2015 para la técnica de Kirby-Bauer (método de difusión en agar).
- Cepas presuntamente positivas para BLEE y AmpC comprobados mediante la técnica de difusión de disco.

3.1.5 Criterios de Exclusión

- Cepas no identificadas como *Klebsiella pneumoniae* mediante técnicas fenotípicas.
- Cepas provenientes de muestras consideradas como no invasivas

3.4 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

3.2.1 Materiales y reactivos

3.2.1.1 Materiales

3.2.1.1.1 Cultivo e identificación de las cepas de *Klebsiella pneumoniae*

- MacConkey Agar BD lot: 5006701
- Base Sangre Agar BD lot: 4286770
- Batería completa para la identificación bacteriana

3.2.1.1.2 Pruebas de resistencia fenotípica y antibiograma

- Mueller Hinton Agar BD lot: 4350581
- Aztreonam
- Ácido Nalidíxico
- Cefepime
- Cefotaxime
- Cefoxitin
- Ceftazidime
- Ciprofloxacin
- Colistín
- Ertapenem
- Gentamicin
- Imipenem
- Meropenem
- Trimetropin/Sulphamethoxazol

3.2.1.1.3 Materiales del laboratorio de microbiología

- Asas

- Cajas Petri
- Gradillas
- Guantes estériles y de manejo
- Guardián
- Hisopos
- Mascarilla
- Mechero
- Pinzas

3.2.1.1.4 Materiales del laboratorio de microbiología

- Cámara UV
- Probetas
- Puntas desechables
- Vasos de precipitación
- Micropipetas de 0.5 – 20 uL
- Criotubos con tapa rosca

3.2.1.1.5 Equipos

- Autoclave
- Espectrofotómetro
- Incubadora
- Termociclador
- Estufa
- Cámara de electroforesis
- Transiluminador
- Software UVP

- Computadora

3.2.1.2 Reactivos

3.2.1.2.1 Reactivos del laboratorio de microbiología

- Solución de ácido 3-aminofenil borónico monohidratado 30mg/mL (APB)
- KOH
- α-Naftol
- Rojo de Metilo
- Reactivo de Kovacs

3.2.1.2.2 Reactivos del laboratorio de biología molecular

- Agarosa
- GoTaq Enzime
- Ladder 100 pb
- *Primers* forward
- *Primers* reverse
- Syber gel stain
- TAE 1X

3.3 METODOS

El estudio se realizará en 4 fases:

3.3.1 Fase I. Análisis Bacteriano

3.3.1.1 Recolección de muestras

Se seleccionaron al azar, 66 cepas de *Klebsiella pneumoniae* confirmadas como KPC+, entre los años 2013 y 2015, procedentes de varios hospitales de las 2 ciudades principales del país, con un mayor número de cepas que provienen de la ciudad capital; aislamientos que poseen la información completa del momento de su recepción, información que se encuentra disponible en la base de datos *WHONET* del laboratorio de Referencia en Resistencias a los Antimicrobianos del INSPI-Q.

3.3.1.2 Aislamiento de cepas

Se utilizó el agar nutritivo de sangre de cordero, que, mediante un estriado de un aislamiento de las cepas a estudiar, y, debido a los nutrientes presentes en el medio, favorese el crecimiento bacteriano. **Anexo 1**. (Jorgensen & Turnidge, 2015)

3.3.1.3 Identificación bioquímica

Para la identificación bioquímica de una bacteria existen diversas metodologías, en el estudio se utilizó las consideradas indispensables para la determinación del género y la especie bacteriana presente. (Mariazza & Carrilo, 2013)

Los medios utilizados fueron: SIM (Sulfuro de hidrógeno, Indol, Motilidad), Kliger, LIA (Lisina de Hierro Agar), Citrato, Rojo de Metilo (RM), Voges Proskauer (VP), Urea, Malonato. **Anexo 1.**

3.3.2 Fase II. Determinación fenotípica de resistencia bacteriana

3.3.2.1 Antibiograma

La técnica de Kirby Bauer o difusión de discos aporta a la determinación del nivel de sensibilidad que el antibiótico genera, enfrentando discos de antibiótico con concentración conocida frente a la bacteria, mediante dos métodos: un estriado bacteriao en tres direcciones o el método de inundación, sobre una caja Petri con agar Muller Hinton, lo que produce un efecto de lisis, y ocasiona un espacio sin crecimiento en el agar, espacio denominado halo de inhibición; los dos procesos utilizan una dilución previa bacteriana de 0,5 McFarland. (Navarro & Miró, 2010)

Todos los procedimientos de interpretación se realizaron en base a las normas del CLSI 2015. **Anexo 2.**

3.3.2.2 Resistencia tipo BLEE

Para determinar la resistencia tipo BLEE, se hace uso del método de doble disco, el que posibilita su interpretación al observar la sinergia formada entre: el disco combinado (betalactámico + inhibidor) de Amoxicilina/Ácido Clavulánico (AMC), con los discos que poseen antibióticos monobactámicos (Aztreonam); y, cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Cefepime, Cefazolina, Ceftriaxona). **Anexo 3.**

3.3.2.3 Resistencia tipo AmpC

Se aplicó la prueba del disco de ácido fenil borónico para la determinación de la resistencia AmpC, basada en enfrentar sobre un estriado bacteriano ralizado en una caja con agar Muller Hinton, los discos de ceftazidima y cefotaxima frente a un disco estéril con un inóculo de 30uL de una solución de ácido fenil borónico, determinando la

positividad para AmpC, al verificar la sinergia existente entre los discos y el inhibidor. (Calvo, Cantón, Fernández, Beatriz, & Navarro, 2011) **Anexo 4.**

3.3.3 Fase III. Determinación genotípica de resistencia bacteriana

3.3.3.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ADN, consta de dos técnicas de laboratorio indispensables, conocidas como; lisis y purificación.

La lisis, es una técnica que consiste en la destrucción de la protección estructural (pared) que posee la bacteria, lo que provoca que el contenido citoplasmático salga de la célula, para que posteriormente mediante centrifugación y debido a la diferencia de pesos moleculares se pueda obtener el ADN como sobrenadante en una solución.

Mientras que, la purificación es una técnica que se basa en eliminar elementos interferentes mediante lavados y el uso de detergentes, evitando complicaciones al momento de realizar la técnica de PCR. (López & Mejía, 2012) **Anexo 5.**

3.3.3.2 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, tiene como fundamento realizar millones de copias de una secuencia de ADN en específico, a través de una inhibición que es mediada por la enzima denominada DNA polimerasa; como resultado de este proceso, se sintetizan cantidades pequeñas de ADN copiadas idénticamente, que servirán para estudios y análisis posteriores. (Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2010)

En razón del objetivo planteado en la investigación, se ha tomado de base la técnica utilizada en una investigación realizada por Danelle, et al. (2010), cuyos parámetros han sido ajustados a las condiciones técnicas del laboratorio donde se efectuó el estudio. Se ejecutaron varias pruebas para determinar la concentración y cantidad

óptima de los reactivos utilizados para amplificar los genes propuestos, utilizando la misma fórmula en la mezcla de reacción denominada Master Mix para todos los genes.

Se probó una variabilidad en la concentración de *primers*, tomando en cuenta que la concentración final de trabajo es de 10uM, reconstruyendo los *primers,* tomando 3 alícuotas diferentes: 0,5uL; 1uL; y 1,5uL; obteniendo como resultado 3 diferentes concentraciones: 0,2uM; 0,4uM; y 0,4uM.

De igual manera, se establecieron modificaciones en las cantidades a utilizarse, tanto de GoTaq (11uL, 12uL y 13uL), como de agua molecular (12uL, 11uL y 10uL). Con motivo de ser analizadas, las muestras se colocaron en el termociclador, para el cual, se diseñó un programa de acuerdo a las condiciones detalladas en el estudio planteado como base, mismo que tuvo como único ajuste, el tiempo de elongación final, con el fin de realizar un protocolo unificado para todos lo genes. Posteriormente dicho protocolo se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%. (Dallenne, Da Costa, Decre´, Favier, & Arlet, 2010)

3.3.3.3 Electroforesis en gel de agarosa

La Electroforesis en gel, es una técnica utilizada para la comprobación de los resultados del proceso de PCR, con el uso de un polímero capáz de formar fibras helicoidales denominado agarosa, fibras que una vez solidificadas crean una malla tridimensional con canales por donde recorre el ADN; existen tipos de agarosa según la temperatura, pero un parámetro importante es su concentración, de esta dependerá el rango de tamaño en el que se logrará una separación óptima. (Pérez de Castro, 2011)

Mediante una corriente eléctrica que se transmite por la presencia de grupos fosfatos, desde el polo positivo de la cámara de electroforesis hacia el polo negativo, se produce la separasión de los fragmentos de ADN; al transportarse por la red formada con

la agarosa, los fragmentos pequeños serán los primeros en pasar y los mayores se colocarán en la cima. Para ello se utiliza una suspensión buffer, al igual que para la preparación del gel, la que puede ser TAE (Tris-Acetato EDTA) o TBE (Tris-Borato EDTA). (Pérez de Castro, 2011)

El TBE tiene una mayor capacidad amortiguadora que el TAE; por tanto, funciona mejor en tiempos prolongados, evitando que se acidifique el medio, el buffer de carga debe poseer una densidad elevada permitiendo que la muestra sea introducida en el pocillo formado en el gel. (Fierro Fierro, 2010)

Para su análisis se utiliza una cámara ultravioleta que permite observar hasta donde se desplazó la muestra; para lo cual, se debe realizar una tinción previa al gel, antes de solidificarse con la solución Syber Gel Stain o después de realizar la corrida electroforética con una solución de bromuro de etidio. (Fierro Fierro, 2010)

3.3.3.4 Determinación del nivel de detección de los *primers*

Para determinar el nivel de detección de los *primers*, se realizó la técnica de PCR, utilizando diluciones seriadas en base 10 de los *primers* estudiados desde 10^{-1} a 10^{-6}, en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* cuantificada con presencia de los genes estudiados, perteneciente al cepario del Laboratorio de Referencia en Resistencias a los Antimicrobianos del INSPI-Q.

3.3.3.5 Reproducibilidad y Especificidad

Para el estudio de reproducibilad y especificidad, se proceso, por la técnica de PCR con el protocolo descrito anteriormente, 10 cepas diferenciadas como *Klebsiella pneumoniae* KPC positivas y 10 aislamiento bacterianos diferentes de *Klebsiella pneumoniae* por cada gen propuesto, procedentes del cepario del Laboratorio de

Referencia en Resistencias a los Antimicrobianos del INSPI-Q, con el fin de comprobar la reproducibilidad y especificidad del método respectivamente.

3.3.4 Fase VI. Análisis y recolección de datos

Para el análisis y la recolección de datos, se aplicó los siguientes pasos:

- Adquisición de datos, cálculo de medidas, presentación de resultados e interacción de variables en gráficos y tablas mediante matrices desarrolladas en Excel y WHONET **(Anexo 7)**.

3.3.4.1 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico:

- Se tomó los datos recolectados en el laboratorio sobre los 66 aislamientos, mediante la matriz de trabajo, creada con la finalidad de analizar las variables planteadas.
- Posteriormente, se elaboró las tablas de resultados y los gráficos correspondientes, en el programa informático Excel 2011.

3.4 Control de Calidad

Se realizó un control de calidad en los dos ensayos aplicados:

3.4.1 Ensayos fenotípicos

Se aplicó la estandarización de las técnicas fenotípicas empleadas en el presente estudio, tanto en la identificación de la cepa, como en la determinación de su resistencia tipo BLEE y AmpC; se utilizó una cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 productora de BLEE como control positivo y una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo, proporcionadas por el laboratorio de Referencia en Resistencias a los Antimicrobianos del INSPI-Q.

3.4.2 Ensayos genotípicos

Se realizó un análisis de PCR utilizando ADN bacteriano, que contenía los genes (*bla*CTX-M, *bla*SHV, *bla*TEM, *CMY* y *DHA)* a estudiar en cepas proporcionadas por el laboratorio de Referencia en Resistencias a los Antimicrobianos del INSPI-Q, con el fin de utilizar, como control positivo los aislamientos que indiquen la presencia de cada gen en particular.

CAPÍTULO IV

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Variables clínicas epidemiológicas

Se analizaron 66 cepas invasivas de *Klebsiella pneumoniae* confirmadas previamente KPC positivas por la técnica molecular de PCR, provenientes de diversos hospitales públicos del Ecuador, entre los años 2013 y 2015.

Tabla 2. Variables clínico-epidemiológicas. Variables clínico-epidemiológicas de las 66 cepas de *Klebsiella pneumoniae* KPC positivas, obtenidas al momento de su recepsión hospitalaria; extraídas de la base de datos WHONET del Laboratorio de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI-Q.

Sexo			Edad[a]			Tipo de muestra[b]			Servicio hospitalario		
	%	#		%	#		%	#		%	#
F	47	31	Adulto	56	37	Asp.Traqueal	2	1	Cardiología	8	5
M	53	35	Joven	18	12	LBA	14	9	Cirugía general	9	6
			Pediátrico	26	17	Liq. Abdominal	8	5	Hematología	3	2
						LCR	3	2	Medicina interna	3	2
						Liq. Drenaje	2	1	Neurología	2	1
						Liq. Pleural	9	6	Neurocirugía	5	3
						Sangre	64	4	Nefrología	3	2
								2	Neonatología	2	1
									Oncología	3	2
									Neumología	3	2
									Pediatría	17	1
									UCI	32	1
									Unidad de quemados	5	2
									Urgencias	8	1
											3
											5

[a]Pediátrico: de 0-18 años; Joven: de 19-35 años; Adulto: de 36-80 años. [b]LBA: Lavado bronco-alveolar; LCR: Líquido céfalo raquídeo.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

En la **Tabla 2**, se observa que, del total analizado, existe un predominio del sexo masculino en 35/66 (53%) aislamientos; observando 37/66 (56,1%) cepas procedentes de muestras de personas en edad adulta, lo que indica que la mayoría de casos en el estudio se presenta entre los 36 a los 95 años.

En cuanto a tipo de muestra y procedencia, las cepas fueron aisladas de muestras invasivas, que en su mayoría provienen de sangre y líquidos estériles **(Figura 2)**. Con relación a la localización hospitalaria, las muestras provienen de 14 dependencias diferentes; de las cuales, las dos que presentaron las mayores cifras fueron: la Unidad de Cuidados Intensivos "UCI" con 21/66 (31,8%) aislamientos y la Unidad de Pediatría con 11/66 (16,7%) aislamientos. (**Figura 3**).

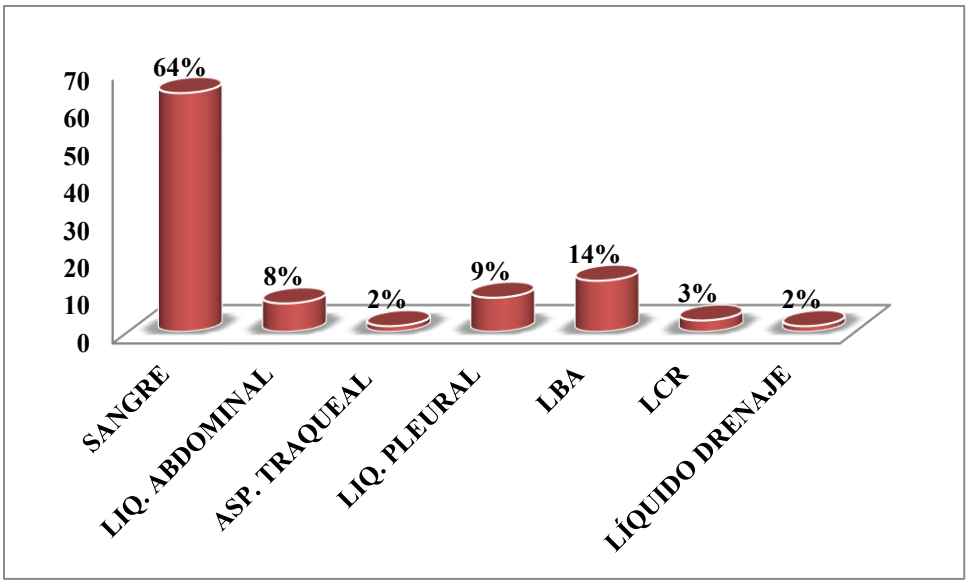


Figura 2. Tipo de muestra. La figura indica el porcentaje de caracterización del tipo de muestra invasiva del que proceden los aislamientos de las 66 cepas de *Klebsiella pneumoniae* KPC positivas.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

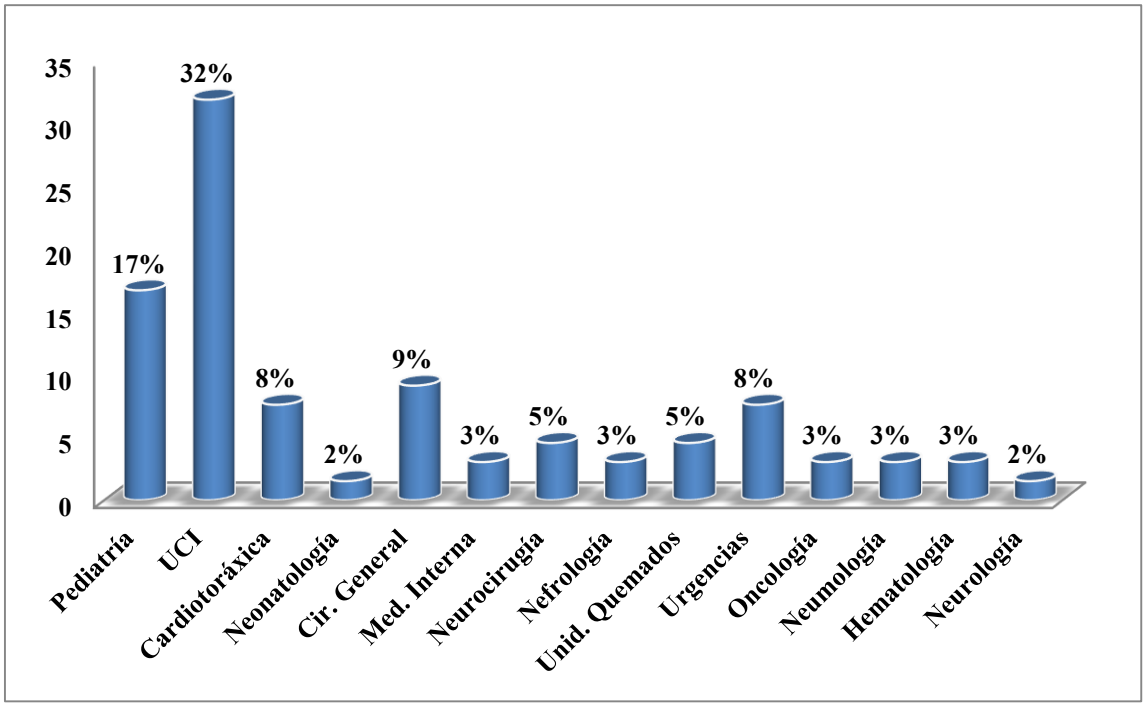


Figura 3. Dependencia Hospitalaria. La figura muestra el porcentaje de caracterización de la dependencia hospotalaria en la que se encontraba el paciente, al momento de la detección de la bacteria *Klebsiella pneumonia*.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

4.1.2 Perfil de susceptibilidad

El análisis fenotípico, confirma la presencia de cepas multirresistentes, como se detalla en la **Tabla 3**, encontrando: un porcentaje de resistencia promedio del 97,7% a cefalosporinas; incluyendo 63/66 (95,5%) aislados resistentes a ceftazidima; y, 65/66 (98,5%) a cefotaxima. Se reconfirma la resistencia a carbapenémicos: observando 57/66 (86,4%) cepas resistentes al meropenem; 58/66 (87,9%) resistentes al imipenem; y, 63/66 (95,5%) resistentes al ertapenem. Se debe tomar en cuenta que, la presencia de carbapenemasas puede producir que se enmascaren los efectos de las resistencias tipo BLEE o AmpC.

Se observa una alta resistencia a otros antimicrobianos, tanto la gentamicina como el ácido nalidíxico presentan porcentajes superiores a la media con 59/66 (89,4%) y 42/66 (63,6%) aislamientos, respectivamente; además, se observa que el cefoxitin, cefalosporina que permite la diferenciación entre los dos fenotipos, posee un valor elevado de 45/66 (68,2%) cepas resistentes, lo que indica una posible presencia del fenotipo AmpC.

Para la interpretación de los halos de inhibición se tomaron los puntos de corte propuestos por el CLSI 2015.

Tabla 3. Porcentaje de los perfiles de susceptibilidad. La tabla indica los resultados de la prueba de succeptibilidad frente a varios antibióticos, representados en porcentajes conjuntos de resistencia de las 66 cepas de *Klebsiella pneumoniae* KPC positivas.

Antibiótico	(%) Resistente	(%) Intermedio	(%) Sensible	Puntos de Corte (mm) CLSI 2015
Amoxicilina/Ácido clavulánico	100	0	0	14 - 17
Amikacina	37,9	15,2	47	15 - 16
Aztreonam	100	0	0	18 - 20
Ceftazidime	95,5	4,5	0	18 - 20
Ciprofloxacina	37,9	47	15,2	16 - 20
Cefotaxima	98,5	1,5	0	23 - 25
Ertapenem	95,5	1,5	0	19 - 21
Cefepime	66,7	21,2	12,1	15 - 17
Cefoxitin	68,2	12,1	19,7	15 - 17
Gentamicina	89,4	0	10,6	13 - 14
Imipenem	87,9	7,6	4,5	20 - 22
Meropenem	86,4	9,1	4,5	20 – 22
Ácido nalidíxico	63,6	24,2	12,1	14 - 18
Polimixina B	4,5	0	95,5	S >= 12
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	92,4	1,5	6,1	11 - 15-
Tetracycline	65,2	3	31,8	12 - 14-
Tigecycline	3	21,2	75,8	15 - 18
Piperacillin/Tazobactam	98,5	1,5	0	18 - 20

Puntos corte correspondientes a *P. aeruginosa* tomados de CLSI 2015.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

4.1.3 Interpretación del antibiograma e identificación de resistencias

Para la interpretación del antibiograma e identificación de resistencias, se realizó pruebas, tanto fenotípicas como genotípicas para la determinación de mecanismos de resistencia a las 66 cepas aisladas para el estudio. Siguiendo las recomendaciones del CLSI en cuanto a pruebas fenotípicas, se efectuó el método de difusión de doble disco (Anexo 3, Figura 3), para la identificación de BLEE; que obtuvo como resultado, una sinergia existente entre cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima y cefotaxima) con el inhibidor de betalactámicos (amoxicilina/ácido clavulánico) en un 79% de las cepas analizadas, (Anexo 2, Figura 1), y se determinó la sinergia entre el cefepime y otro inhibidor de betalactámicos (piperacilin/tazobactam) en el mismo porcentaje de aislamientos, reconfirmando la presencia de cepas tipo BLEE. (Anexo 2. Figura 2).

Para la detección fenotípica de AmpC, se observó la sinergia entre una de las cefalosporinas de tercera generación, como ceftriaxona (CTX), ceftazidima (CAZ) o cefepime (FEP), y un disco que contenía 6uL de ácido 3-fenil borónico con una concentración de 50mg/mL, en el 55% de las cepas estudiadas, deduciendo una posible presencia de resistencia tipo AmpC. **(Anexo 4.** Esquema 1).

4.1.4 Resistencia bacteriana

4.1.4.1 Pruebas fenotípicas.

4.1.4.1.1 Co-resistencia en cepas de *Klebsiella pneumoniae* KPC positivas

En la **Tabla 4,** se detalla la determinación de resistencias, mediante una compilación de resultados proyectados por los métodos fenotípicos, estos procedimientos indican la presencia de varios mecanismos en el mismo microorganismo, induciendo una resistencia conjunta, lo que provoca una posible complicación en el tratamiento.

En el **Figura 4,** se muestra un porcentaje elevado de co-resistencia, entre los tres mecanismos enzimáticos de resistencia KPC+BLEE+AMP-C; es decir en 30/66 (45,5%) cepas analizadas; con un dato no tan distante, en 22/66 (33,3%) aislamientos, se presenta la co-resistencia entre los mecanismos enzimáticos de resistencia KPC+BLEE; además, la presencia entre los mecanismos de resistencia KPC+AmpC se muestra baja en 11/66 (16,7%) cepas analizadas; y, la resistencia solitaria a KPC es mínima en 3/66 (4,5) aislamientos.

Tabla 4. Fenotipos de resistencia. La tabla muestra el porcentaje de co-resistencias resultantes del análisis fenotípico mediante el uso de antibióticos combinados, en la prueba de difusión de disco.

Co-resistencias		
	%	**#**
KPC+BLEE+AmpC	45,5	30
KPC+BLEE	33,3	22
KPC+AmpC	16,7	11
KPC	4,5	3

AmpC: serin-betalactamasas pertenecientes al grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros; BLEE: Betalactamasas de espectro extendido; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

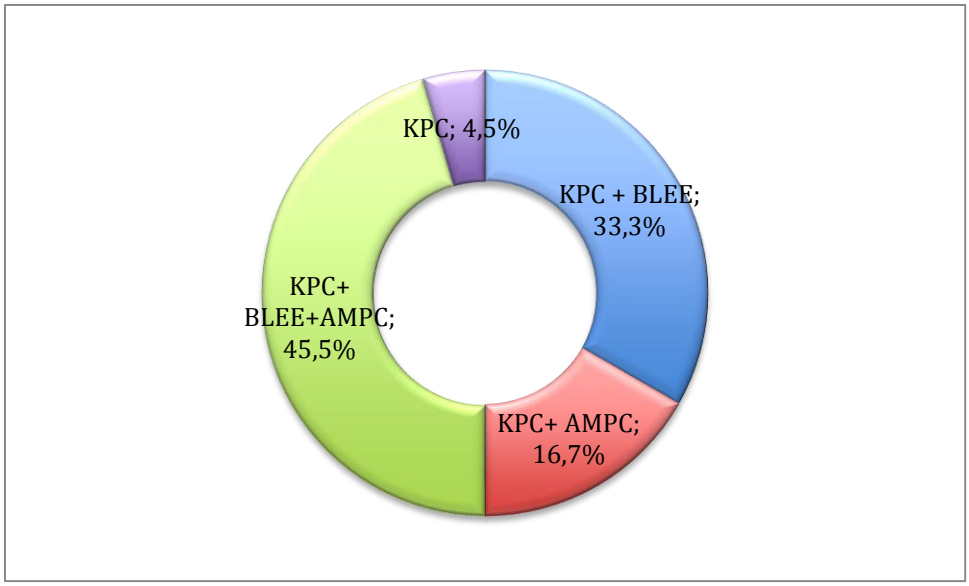


Figura 4. Tipos de co-resistencia. La figura indica de manera grafica, el porcentaje resultante de co-resistencias, presente en las 66 cepas de *Klebsiella pneumoniae* analizadas fenotípicamente.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

4.1.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Al estandarizar una técnica, las condiciones experimentales deben estar basadas en un protocolo de referencia, mismo que posteriormente será adecuado a las condiciones propias de cada laboratorio. Siguiendo el protocolo descrito por Danellle, et al. (2010), se buscó una amplificación óptima realizando modificaciones en la solución Master Mix. Todas las variantes realizadas a la concentración de los *primers* (0,2uM; 0,4uM; y 0,6uM), demostraron una alta sensibilidad, por lo que se tomo la decisión de utilizar la concentración de 0,2uM, consiguiendo economizar los reactivos. Además, el análisis en las cantidades de agua molecular (12uL, 11uL y 10uL), y GoTaq (11uL, 12uL y 13uL), definieron como los parámetros ideales, a los detallados a continuación:

Tabla 5. Fórmula de la solución Master Mix. La tabla muestra las condiciones de los reactivos a usarse en la mezcla de reacción final o solución Master Mix, para la detección de una muestra, y, elaborada con un par de *primers*; es decir para un solo gen.

	Cantidad	Concentración
Agua molecular	11 uL	1X
Primer forward	0,5 uL	0,2 uM
Primer reverse	0,5 uL	0,2 uM
GoTaq Hot Start Green	12 uL	
ADN	1 uL	

Mezcla de reacción para una muestra, basada en una concentración final de 10uM y volumen final de 25uL.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

Parámetros que demostraron un aumentando en la calidad de la amplificación, con bandas claras y visibles al momento de realizar la comprobación por electroforesis en gel de agarosa.

Con motivo de realizar un protocolo unificado para los genes estudiados, se modificó la temperatura de extensión final, de acuerdo a las características específicas de cada pareja de *primers*, obteniendo un análisis óptimo al seguir los parámetros descritos en la siguiente tabla:

Tabla 6. Condiciones de la PCR. La tabla indica los parámetros de temperatura y tiempo; condiciones a usarse en las fases de termociclado de la técnica de Reacción en Cadena de la Poimerasa.

	Temperatura/Tiempo	
Activación taq	94 grados x 10 minutos	
Denaturación	94 grados x 40 segundos	30 ciclos
Hibridación	60 grados x 40 segundos	
Extensión	72 grados x 1 minuto	
Extensión final	64 grados x 7 minutos	

Condiciones del termociclador en temperatura y tiempo.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

A pesar de realizar varios análisis con todos los genes propuestos y varias cepas que teóricamente presentaban las resistencias descritas, no se mostraron resultados positivos en la detección de los genes CMY y DHA.

4.1.4.2.1 Determinación del nivel de detección de los *primers*

Para determinar el nivel de detección de los *primers*, se realizó la técnica de PCR, utilizando diluciones seriadas en base 10 de los *primers*, en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* con presencia conocida de cada gen a estudiar. El producto del análisis del gen TEM se observa amplificado hasta la serie 10^{-4} uM/uL; mientras que los análisis de los genes SHV-1 y CTX-M muestran una amplificación de hasta la serie10^{-3} uM/uL. La cepa utilizada en la detección, está identificada como *Klebsiella pneumoniae* positiva para TEM, SHV-1 y CTX-M, con una concentración de 64,4 ng/uL.

Los puntos de corte obtenidos indican una efectividad de los *primers* al momento de su detección por PCR de 10^{-4} uM/uL para el gen TEM, que infiere un límite de detección de una concentración de hasta 0,0644 ng/uL; de igual manera se observaron puntos de corte de 10^{-3} uM/uL en los genes SHV-1 y CTX-M, que da a lugar a un límite de detección de hasta 0,0644 ng/uL, de acuerdo a la cepa de *Klebsiella pneumoniae* cuantificada, utilizada en el análisis. **Figura 5.**

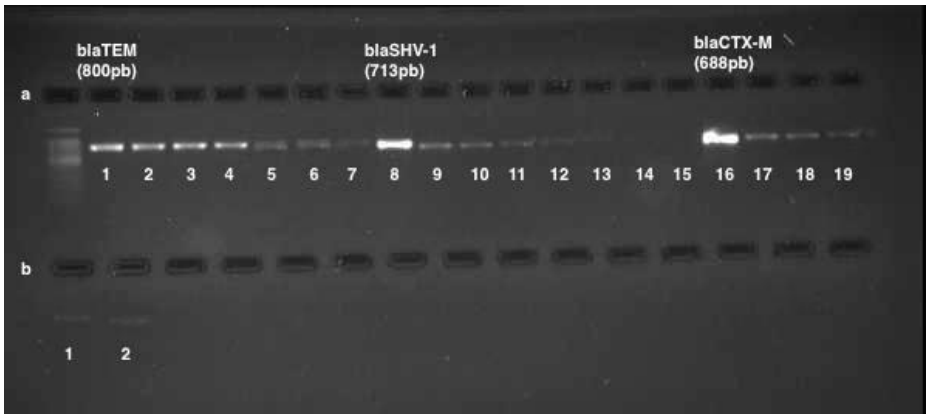


Figura 5. Nivel de detección de los *primers*. La figura muestra una corrida electroforética del análisis de una cepa cuantificada con una concentración de 64,4 ng/uL; determinando el nivel de detección de los primers blaTEM (800pb), blaSHV (713pb) y blaCTX-M (688pb), mediante la técnica de PCR. Fila (a): Las calles desde la 1 a la 7 muestran un resultado positivo del gen blaTEM para 1 muestra analizada de *Klebsiella pneumoniae*, las calles desde la 8 a la 13 muestran un resultado positivo del gen blaSHV-1 para 1 muestra analizada de Klebsiella pneumoniae, las calles desde la 16 a la 19 muestran un resultado positivo del gen blaCTX-M para 1 muestra analizada de *Klebsiella pneumoniae*. Fila (b): las calles 1 y 2 muestran un resultado positivo del gen blaCTX-M para 1 muestra analizada de *Klebsiella pneumoniae* proveniente del cepario del Laboratorio en Resistencias a los Antimicrobianos del INSPI-Q. Gel de Agarosa al 2%, 100V, tiempo de corrida: 60 minutos, tinción: 1uL SYBR® Safe - DNA Gel Stain (10.000X). marcador de peso molecular "ladder" de 100pb (Promega), pb: pares de bases.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

4.1.4.2.2 Reproducibilidad

Se realizó un estudio de las 10 cepas de *Klebsiella pneumoniae,* procedentes del cepario del Laboratorio de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI-Q; determinando una reproducibilidad efectiva en 3 de los 5 genes propuestos, cuya amplificación se muestra en las figuras a continuación:

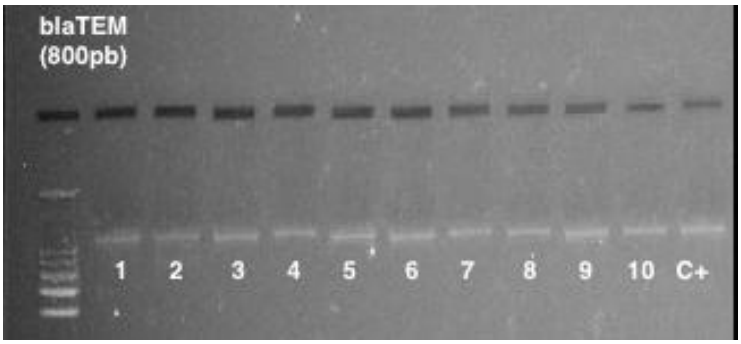


Figura 6. Reproducibilidad para el gen *blaTEM* (800pb). La figura indica mediante una corrida electroforética el resultado positivo de 10 muestras con resistencia conocida tipo TEM pertenecientes al Laboratorio de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI-Q, analizadas por PCR para el gen blaTEM.Las calles desde la 1 a la 10 muestran un resultado positivo del gen blaTEM. Gel de Agarosa al 2%, 100V, tiempo de corrida: 60 minutos, tinción: 1uL SYBR® Safe - DNA Gel Stain (10.000X). C+ = Control positivo TEM (800pb), marcador de peso molecular "ladder" de 100pb (Promega), pb: pares de bases.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

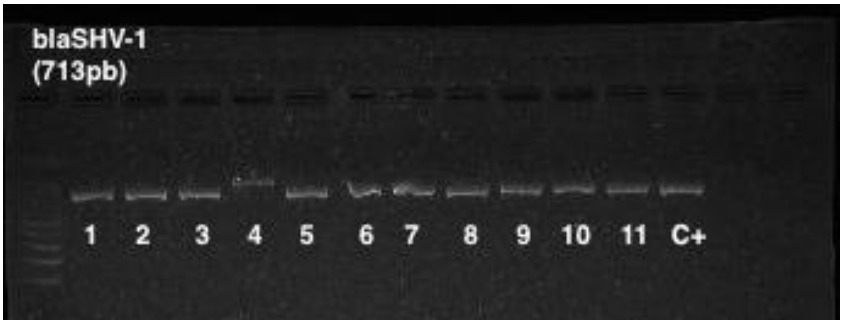


Figura 7. Reproducibilidad para el gen *blaSHV-1* (713pb). La figura indica mediante una corrida electroforética el resultado positivo de 10 muestras con resistencia conocida tipo SHV-1 pertenecientes al Laboratorio de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI-Q, analizadas por PCR para el gen blaSHV-1. Las calles desde la 1 a la 11 muestran un resultado positivo del gen blaSHV-1, la calle 4 muestra un resultado nulo, repetido en la calle 5. Gel de Agarosa al 2%, 100V, tiempo de corrida: 60 minutos, tinción: 1uL SYBR® Safe - DNA Gel Stain (10.000X). C+ = Control positivo SHV-1 (713pb), marcador de peso molecular "ladder" de 100pb (Promega), pb: pares de bases.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016



Figura 8. Reproducibilidad para el gen *blaCTX-M* (688pb). La figura indica mediante una corrida electroforética el resultado positivo de 10 muestras con resistencia conocida tipo CTX-M pertenecientes al Laboratorio de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI-Q, analizadas por PCR para el gen blaCTX-M. Las calles desde la 1 a la 10 muestran un resultado positivo del gen blaCTX-M para 10 muestras analizadas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes del cepario del Laboratorio de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI-Q. Gel de Agarosa al 2%, 100V, tiempo de corrida: 60 minutos, tinción: 1uL SYBR® Safe - DNA Gel Stain (10.000X). C+ = Control positivo CTX-M (688pb), marcador de peso molecular "ladder" de 100pb (Promega), pb: pares de bases.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

4.1.4.2.3 Especificidad

Se analizaron 10 aislamientos bacterianos diferentes de *Klebsiella pneumoniae*, procedentes del cepario del Laboratorio de Referencia en Resistencias a los Antimicrobianos del INSPI-Q, siguiendo los protocolos propuestos. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, en la que no se observaron bandas correpondientes a ninguno de los genes propuestos.

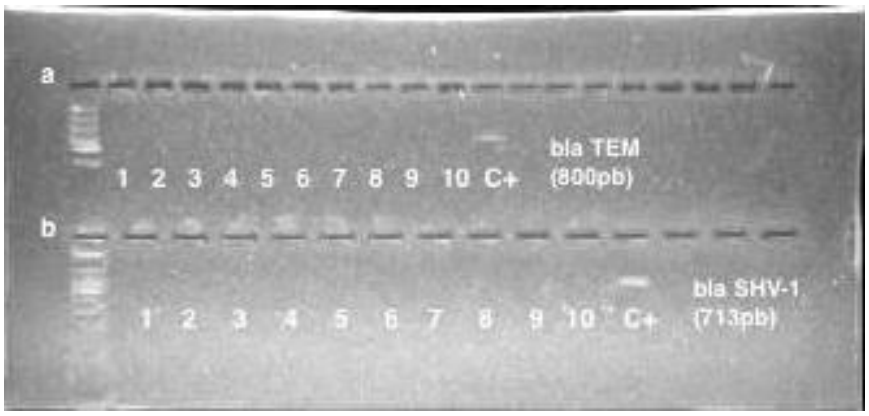


Figura 9. Especificidad para los genes *blaTEM* (800pb) y *blaSHV* (713pb). La figura indica mediante una corrida electroforética, resultados negativos para los genes TEM y SHV, analizados por PCR en 10 muestras de *Escherichia coli* sin presencia de genotipos de resistencia; aislaientos provenientes del cepario del Laboratorio de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI-Q. Fila (a): Las calles desde la 1 a la 10 muestran un resultado negativo del gen blaTEM, C+ = Control positivo TEM (800pb). Fila (b): Las calles desde la 1 a la 10 muestran un resultado negativo del gen blaSHV-1, C+ = Control positivo SHV-1 (713pb). Gel de Agarosa al 2%, 100V, tiempo de corrida: 60 minutos, tinción: 1uL SYBR® Safe - DNA Gel Stain (10.000X). marcador de peso molecular "ladder" de 100pb (Promega), pb: pares de bases.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

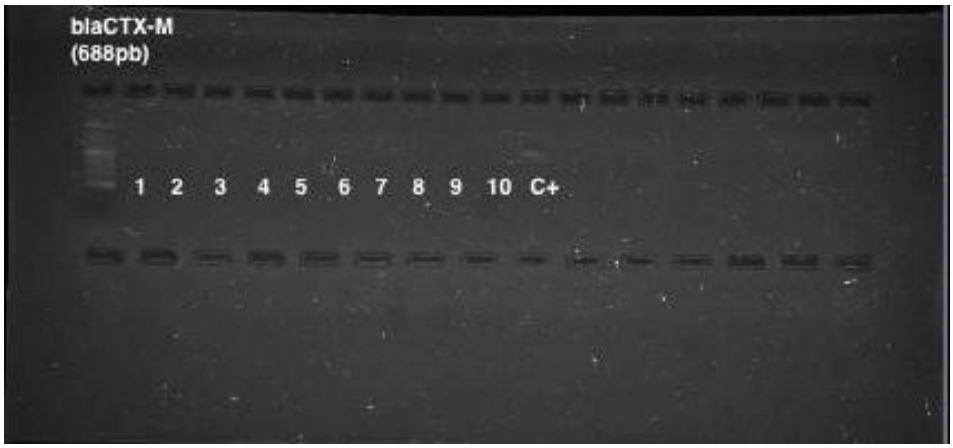


Figura 10. Especificidad para el gen *blaCTX-M* (688pb). La figura indica mediante una corrida electroforética los resultados negativos para el gen CTX-M, analizados por PCR en 10 muestras de *Escherichia coli* sin presencia de genotipos de resistencia, provenientes del cepario del Laboratorio de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI-Q. Las calles desde la 1 a la 10 muestran un resultado negativo del gen blaCTX-M. Gel de Agarosa al 2%, 100V, tiempo de corrida: 60 minutos, tinción: 1uL SYBR® Safe - DNA Gel Stain (10.000X). C+ = Control positivo CTX-M (688pb). marcador de peso molecular "ladder" de 100pb (Promega), pb: pares de bases.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

4.1.4.3 Co-resistencias en cepas de *Klebsiella pneumoniae* KCP positivas

En la **Tabla 7,** se pueden observar los resultados de los ensayos realizados a las 66 muestras, confirmadas previamente KPC positivas por PCR, procesadas fenotípica y genotípicamente, con lo que se evidencia un porcentaje elevado de co-resistencia bacteriana. Para su procesamiento, se realizó una extracción de ADN por calentamiento, con el fin de realizar una PCR por cada gen analizado.

En la **Figura 11**, se describe los resultados, en donde se confirma que: las 66/66 (100%) cepas poseen el gen SHV; y, se indica que un porcentaje destacado 61/66 (92%) contiene la presencia del gen TEM.

Por otra parte, el gen CTX-M se manifestó en 30/66 aislamientos, representando casi la media total; para esto, los *primers* utilizados detectan de manera general el grupo 1, que está constituido por las enzimas tipo CTX-M 1, 3, y 15. Debido a la generalidad de los *primers*, es necesario realizar un proceso de secuenciación del gen de cada muestra, con el fin de establecer el tipo de gen perteneciente de entre la extensa diversidad filogenética de CTX-M.

La evidencia de genotipos TEM en el 92% de cepas, sumado a la presencia del gen CTX-M, determina una co-resistencia bacteriana entre las betalactamasas de espectro extendido SHV, TEM, CTX-M y KPC en un 45,5%.

No se comprobó presencia alguna en las cepas de *Klebsiella pneumoniae* analizadas para los genes DHA y CMY, productores de resistencia tipo AmpC, ni en los análisis realizados a las cepas de *Morganella Morganii y Aeromona spp.*, que teóricamente presentan una posibilidad mayor de poseer dichos genes respectivamente, cepas que pertenecen al laboratorio de Resistencias a los Antimicrobianos del INSPI-Q, investigadas con la finalidad de establecer una cepa control para el estudio.

Tabla 7. Genotipos de resistencia. La tabla muestra el porcentaje de resistencias genotípicas, obtenido del análisis por PCR en los 66 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* KPC positivas pertenecientes a Hospitales de la Red Pública Integral de Salud.

Genes de resistencia		
	%	**#**
CMY	0	0
CTX-M	45,5	30
DHA	0	0
SHV	100	66
TEM	92,4	61

CMY: gen de resistencia tipo AmpC; CTX-M: gen de resistencia frente a cefalosporinas; DHA: gen de resistencia tipo AmpC; SHV: gen de resistencia frente a b-lactámicos natural en *Klebsiella pneumoniae*; TEM: gen de resistencia frente a b-lactámicos.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

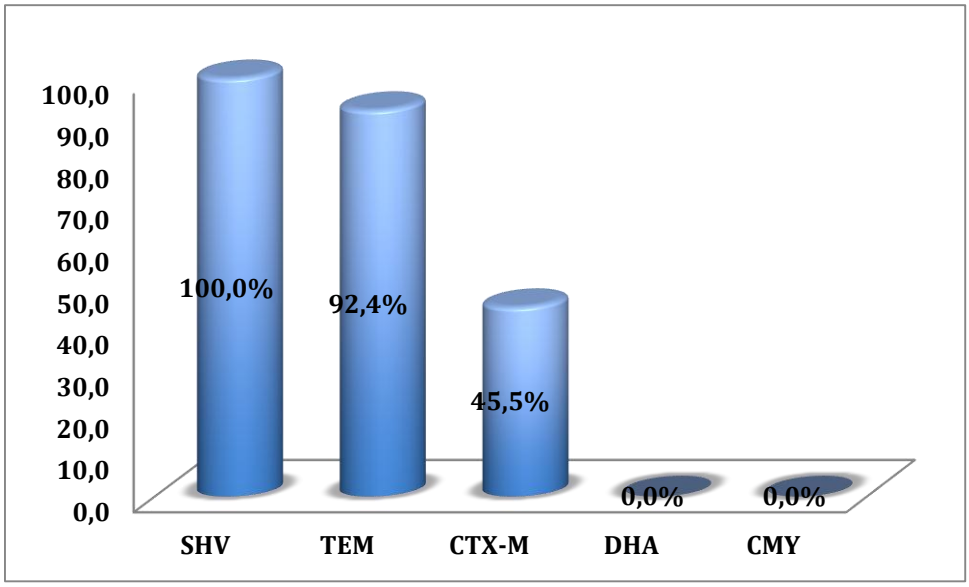


Figura 11. Porcentaje de genes de resistencia. La figura muestra gráficamente el porcentaje de caracterización de los genes resultantes positivos en el análisis de las 66 cepas de *Klebsiella pneumoniae* KPC positivas.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

En el estudio aplicado, es factible la realización de una PCR Multiplex, para la detección de los genes de resistencia SHV, TEM, CTX-M; pero, debido a su poca diferencia en número de pares de bases, se dificulta su identificación exacta y específica, ante esta situación, se priorizó la aplicación de técnicas individuales para cada gen, compartiendo los parámetros del método, como se observa en la **Figura 12**.



Figura 12. Corrida electroforética para *blaTEM* (800pb), *blaSHV* (713pb) *y blaCTX-M* (688pb). La figura representa los resultados obtenidos en el análisis de las 66 cepas provenientes de Hospitales de la Red Pública Integral de Salud, demostrando el resultado positivo de 15 aislamientos con presencia de los genes TEM y SHV; y 11 aislamientos con presencia del gen CTX-M, analizados por PCR. Fila (a): las calles desde la 1 a la 16 muestran un resultado positivo del gen bla_{TEM} para 15 muestras analizadas de *Klebsiella pneumoniae*; las calles de la 19 a la 26 muestran un resultado positivo del gen bla_{SHV} para 15 muestras analizadas de *Klebsiella pneumoniae*. Fila (b): las calles de la 1 a la 8 muestran un resultado positivo del gen bla_{SHV} para 15 muestras analizadas de *Klebsiella pneumoniae*; las calles 12, 13, de la 15 a la 20, 22, 24, 25 y 27 muestran un resultado positivo del gen $bla_{\text{CTX-M}}$ para 15 muestras analizadas de *Klebsiella pneumoniae* y las calles 11, 14, 21, 23 y 26 muestran un resultado positivo del gen $bla_{\text{CTX-M}}$ para 15 muestras analizadas de *Klebsiella pneumoniae*. Gel de Agarosa al 2%, 100V, tiempo de corrida: 60 minutos, tinción: 1uL SYBR® Safe - DNA Gel Stain (10.000X). C+1 = Control positivo TEM (800pb); C+2 = SHV: (713pb); C+3 = CTX-M (688pb). Marcador de peso molecular "ladder" de 100pb (Promega), pb: pares de bases.

ELABORADO POR: CÓRDOVA P. 2016

4.2 DISCUSIÓN

Dentro de los últimos años, la resistencia a los antibióticos en bacterias pertenecientes a la familia de *Enterobacterias*, como *Klebsiella Pneumoniae*, se ha convertido en un problema creciente en el área de la salud. (Dallenne, Da Costa, Decre´, Favier, & Arlet, 2010). El Ecuador, es un país que no escapa a esta realidad; por tal razón, se realiza el presente estudio en cepas aisladas de muestras invasivas de Hospitales de la Red Pública Integral de Salud del Ecuador, en base al método de Reacción en Cadena de la Polimerasa, para determinar la presencia de genes de resistencia existentes.

El aumento de dichas resistencias se ha visto asociado a varios factores, entre los que se describe: la estancia hospitalaria prolongada, el uso de dispositivos considerados invasivos, el uso indiscriminado de antibióticos tanto en humanos como en animales e incluso en varios huertos donde se practica la horticultura. (González-Castillo, Candel, & Julián-Jimenez, 2013)

Estudios demuestran que: los microorganismos productores de BLEE, han sido dominantes desde la década de 1990 hasta la actualidad, teniendo como los genes principales a los tipos TEM y SHV. (Sennati, et al., 2012). En los últimos años, se han descrito una propagación rápida y masiva de betalactamasas de tipo CTX-M, hecho que las convirtió en las enzimas más prevalentes a nivel mundial. En América del Sur, dichas enzimas han sido reportadas desde el punto de vista epidemiológico como endémicas, debido a su circulación estable por un largo período de tiempo en la región, describiendo desde el primer reporte en Argentina en 1989, una diseminación veloz a sus países vecinos. (Casellas, 2011). Otra complicación de resistencia que ha demostrado un aumento considerable, es la infección por bacterias productoras de enzimas tipo AmpC, debido a que estas se integran a elementos genéticos móviles o transferibles, propios del cromosoma de algunos bacilos Gram-negativos. (Seral, Gude, & Castillo, 2012)

A pesar de existir datos a nivel del Ecuador, que evidencian la presencia de resistencias en diversas cepas bacterianas, con el presente estudio, a través del análisis de métodos fenotípicos y genotípicos para la detección de resistencias y perfiles de susceptibilidad; se evidenció la persistencia de complicaciones relacionadas con microorganismos multirresistentes en el área de la salud.

Se describe una preferencia de *Klebsiella pneumoniae,* por el ambiente hospitalario propenso a que los pacientes presenten inmunodeficiencia, descubriéndose que 21/66 (32%) cepas, provienen de muestras de la Unidad de Cuidados Intensivos, dato similar al observado en un estudio realizado en Israel por Echeverri & Cataño (2010), en donde demuestran que la estancia hospitalaria prolongada, principalmente en UCI, incrementa la probabilidad de contraer una infección que denote este tipo de resistencias; además, se determinó que 11/66 (17%) aislados provienen de muestras de la unidad de Pediatría; deduciendo que, factores como: la edad del paciente, el período de estancia hospitalaria, el estado de salud y el tratamiento de forma empírica, contribuyen a la adquisición de dichos microorganismos. Cabe recalcar, que existe una posibilidad mayor en cuanto a complicaciones graves o desenlaces fatales en dichas unidades debido tanto al tipo de caso, como a los pacientes que tratan.

El análisis fenotípico de las pruebas de suceptibilidad, aplicados en la investigación, indicaron una elevada resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a los discos combinados con inhibidores de β-lactamasas, que se deducen son provocados por la presencia de enzimas tipo BLEE, produciendo como resultante en el antibiograma, una sinergia entre el disco combinado de Amoxicilina/Ácido clavulánico (resistente en 66/66 cepas) y una cefalosporina de tercera generación (ceftazidima o cefotaxima). De igual manera, se evidencia una resistencia elevada frente al disco combinado de Piperacilina/Tazobactam en 65/66 (98,5%) aislamientos, a pesar de ser considerado en

reportes mundiales como un inhibidor de las cepas BLEE de tipo CTX-M, lo que determina una relacion de su resistencia debido a la presencia de positividad del gen KPC. (Morejón García, 2013)

El porcentaje de resistencia de *Klebsiella pneumoniae,* presente en 65/66 (98,5%) cepas analizadas con la cefotaxima y en 63/66 (95,5%) con la ceftazidima, deducen fenotípicamente una resistencia tipo CTX-M, enzima responsable de la inhibición a cefalosporinas, con una especial actividad frente a la cefotaxima, de la que deriva su nombre. A pesar de ello, la presencia de porcentajes de resistencia en 57/66 (86,4%) cepas estudiadas frente al meropenem, en 58/66 (87,9%) frente al imipenem y en 63/66 (95,5%) frente al ertapenem (considerado el carbapenémico de mayor espectro), deducen la presencia de carbapenemasas en los aislamientos, enzimas que probablemente se presentan como un factor adicional responsable de la resistencia a cefalosporinas. (Echeverri & Cataño, 2010)

El estudio presenta un valor elevado de 45/66 (68,2%) aislamientos con resistencia al cefoxitin, cefalosporina que permite la diferenciación entre fenotipos BLEE y AmpC, indicando una posible resistencia tipo AmpC, que debe ser confirmada con métodos más exactos, este efecto puede ser enmascarado por la presencia del gen KPC, debido a su amplio espectro de inhibición. (Casellas, 2011)

Por definición las enterobacterias productoras de BLEE hidrolizan penicilinas y cefalosporina, sin embargo, su actividad de hidrólisis varía según el tipo de BLEE presente; es así que, las betalactamasas tipo TEM y SHV hidrolizan mejor la ceftazidima que la cefotaxima, al contrario de las tipo CTX-M que poseen mejor hidrólisis por la cefotaxima. Por otra parte, los carbapenémicos son los fármacos considerados como de primera línea para el tratamiento de infecciones por cepas productoras de BLEE, los que son hidrolizados por cepas con betalactamasas tipo KPC; varios estudios detallan la

eficacia del uso de carbapenémicos a nivel hospitalario, que demuestra, que su uso en los primeros días es un factor asociado a menor mortalidad, igualmente, indican una tasa de éxito de 80% en su evaluación frente a casos de neumonías. Por lo que se presenta una complicación al momento de definir el tratamiento efectivo en cepas con presencia de co-resistencias, llevando algunos casos a la utilización de antibióticos antiguos como colistina o polimixina B. (García, Astocondor, & Banda, 2012)

Se evidencia la efectividad de la estandarización del método de PCR para 3 de los 5 genes, una vez ralizados los procesos de reproducibilidad, especificidad y determinación del nivel de detección de los *primers*. Todas las parejas de *primers* fueron provados con muestras consideradas teóricamente positivas para cada gen propuesto; sin embargo, no se logró resultados positivos para los genes CMY y DHA, debido, tal vez, a complicaciones a nivel de síntesis de *primers*, o de las cepas bacterianas utilizadas en el estudio.

Se describen cepas poseedoras de BLEE, con presencia simultánea de los genes TEM, SHV y KPC, denotando en el estudio un porcentaje elevado de cepas multirresistentes, con 66/66 (100%) cepas que contenían los genes TEM y SHV, inhibidores de carbapenémicos y betalactámicos de primera generación respectivamente; por lo que, se presume que existe una asociasión fuerte entre las resistencias tipo BLEE de los genes SHV, TEM y KPC. (Gonzáles, Nieves, Solórzano, Cruz, Puig, & Moreno, 2013)

El resultado de 66/66 (100%) aislados, evidenciados como el total de las cepas con positividad para el gen SHV; las 61/66 (92,4%) cepas que presentan el gen TEM; y, la manifestación del gen CTX-M en 30/66 (45,5%) aislamientos, comprueba la presencia de co-resistencias a nivel genético de las cuatro enzimas de resistencia; dichas enzimas tipo BLEE, incluyen al genotipo KPC, que se supone provoca una complicación al

momento de administrar el tratamiento y ratifica las dificultades existentes en las instituciones de salud. (Pulido, Ramón, Valenzuela, Reguero, & Gonzales, 2011)

El gen CMY, fue analizado sin conseguir resultados positivos, posiblemente debido a que la gran diversidad de genes tipo AmpC existentes que a nivel fenotípico no pueden ser diferenciada.

Los *primers fordware* (CAACAACGACAATCCATCCT) y *reverse* (GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA) utilizados , agrupan una gran cantidad de genes, en los que se incluyen: MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 al 11 y CMY 19, a pesar de su generalidad, no se logró determinar cepas positivas para CMY, por la existencia de las variantes de esta enzima, como: CMY-1, 2, 7, 8, 11, de la 12 a la 18 y de la 21 a la 23, de las cuales entre las más prevalentes se describen: CMY-1 y CMY-2; deduciendo que, exista una posible presencia de genes no estudiados, que podrían conferir la resistencia tipo AmpC.

De igual manera los *primers fordware* (TGATGGCACAGCAGGATATTC) y *reverse* (GCTTTGACTCTTTCGGTATTCG) utilizados para el gen DHA, no indicaron nigún resultado en el análisis por PCR, por lo que el resultado de la resistencia tipo AmpC distinguida en la técnica de Kirby Bauer, mediante la difusión de discos, no fue verificada con el análisis molecular, situación que puede darse, debido a la gran diversidad de genes plasmídicos productores de resistencia AmpC. (Seral, Gude, & Castillo, 2012)

Ambos *primers* han sido utilizados en estudios previos, como en el realizado por Danelle, et al. (2010), en el que se obtuvieron los resultados esperados para cada gen; lo que evidencia varios factores que pueden haber intervenido en el resultado, entre ellos, la síntesis de los *primers*, la temperatura de *anneling* usada en el proceso de termociclado, o simplemente, la propia ausencia de dichos genes en las cepas analizadas. (Dallenne, Da Costa, Decre´, Favier, & Arlet, 2010)

Estudios describen la poca frecuencia de enzimas CMY y DHA mediadas por plásmidos (Jacoby & George, 2009); a pesar de ello el fenotipo AmpC, toma una importancia clínica alta, por su amplia resistencia a cefalosporinas, aunque se evidencia que la resistencia a carbapenémicos, puede sugerir mutaciones adicionales, como la reducción en la expresión de porinas; sucesos que debido a su mecanismo de acción frente a antibióticos similares, pueden producir un enmascaramiento de resistencias. (Singtohin, et al., 2010)

4.3 CONCLUSIONES

- Los protocolos realizados para el análisis de los genes SHV, TEM y CTX-M por la técnica molecular de PCR, obtuvieron un desempeño óptimo a partir de los ajustes realizados en tiempo y temperatura de termociclado, verificando la presencia de dichas resistencias en las cepas estudiadas.
- La estandarización de la técnica de PCR fue óptima para 3 de los 5 genes propuestos, demostrando una alta efectividad en detección de genes de resistencia en cepas con precencia de co-resistencias.
- Del estudio aplicado, las 66 cepas demostraron a nivel fenotípico varios mecanismos de resistencia denominados betalactamasas: tipo BLEE 55/66 (78,8%); KPC 66/66 (100%); y, AmpC 41/66 (62,2%), corroborados a nivel genotípico con excepción del tipo AmpC.
- La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) evidenció co-resistencias en todas las cepas analizadas, con un mínimo de 2 genes en cada aislamiento, comprobando la alerta por cepas multirresistentes.
- Queda demostrado que los genes TEM y CTX-M se presentaron en 30/66 (45,5%) aislamientos bacterianos; incluida la carbapenemasa tipo KPC 66/66 (100%), resultado que confirma una alta presencia de betalactamasas tipo BLEE.
- Se comprueba la resistencia natural de *Klebsiella pneumoniae* a carboxipenicilinas y aminopenicilinas con la presencia del gen SHV-1 en los 66/66 (100%) aislamientos.
- La co-resistencia, indica una asociación fuerte entre el gen KPC 66/66 (100%) y los responsables de inhibir a betalactámicos (penicilinas, monobactámicos y cefalosporinas), TEM 61/66 (92,6%) y CTX-M 30/66 (45,5%).

- La presencia de los 4 genes ($_{bla}$*CTX-M,* $_{bla}$*SHV,* $_{bla}$*TEM,* $_{bla}$*KPC)* en 30 de las 66 cepas, denota la elevada capacidad de resistencia de *Klebsiella pneumoniae*, además de la posible transmisión horizontal de genes en el ambiente hospitalario lo que confirma la presencia de co-resistencias.
- La transmisión de las enzimas responsables de los distintos mecanismos de resistencia se afianza en modo de alerta, observando que existe un alto porcentaje de muestras provenientes de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) 21/66 (32%) y del departamento de Pediatría 11/66 (17%) de distintas casas de salud.

4.4 RECOMENDACIONES

Al determinar las resistencias que presentan las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, es recomendable complementar el análisis de las cepas consideradas fenotípicamente con presencia de AmpC, tomando en cuenta que dichos mecanismos resultaron positivos a las técnicas comprobatorias de sensibilidad frente al antibiótico; adicionalmente, se cree necesaria la extensión del estudio mediante técnicas fenotípicas como la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y moleculares como la secuenciación del genoma en los aislamientos; con el fin, de desenmascarar resistencias ocultas producidas posiblemente por una producción enzimática o presencia de otros genes de resistencia. Además, la secuenciación del genoma, favorece la especificación del sub-tipo de gen que se está manejando, para determinar de manera puntualizada las resistencias que producen, medida que favorecerá la vigilancia y el seguimiento de las infecciones bacterianas, y así alcanzar el propósito de la disminución o interrupción de bacteriemias por diseminación de microorganismos multirresistentes.

Se sugiere la continuidad de los análisis de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* mediante estudios de conjugación y transformación, para demostrar la capacidad de transmisión de resistencias en dichas bacterias; además, incluir análisis de plásmidos, obteniendo información complementaria y relevante del predominio de dichas resistencias en nuestro medio.

5. BIBLIOGRAFÍA

Aguilera, Tachiquín, Munive, Olvera, & Cárdenas. (2010). PCR en tiempo real. M. E.C.

Akpaka, Legal, & Padman. (2010). Detección Molecular y Epidemiología de Genes de Beta-lactamasas de Espectro extendido Prevalecientes en los Aislados Clínicos de *Klebsiella pneumoniae y E coli* en Trinidad y Tobago. West Indian Med J , 59 (6), 591.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). Biologia Molecular da Célula (Vol. Quinto). Sao Paulo, Brasil: Artmed.

Bailón, H., & Sacsaquispe, R. (2013). Caracterización molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE causantes de infección intrahospitalaria en el servicio de neonatología de un hospital de Lima, Perú. Rev Med Hered. , 24 (2), 101-108.

Briceño, D., Correa, A., Valencia, C., Torres, & Julián. (2010). Actualización de la resistencia a antimicrobianos de bacilos Gram negativos aislados en hospitales de nivel III de Colombia: años 2006, 2007 y 2008. Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, CIDEIM (30), 371-81.

Bush, K., & Jacoby, G. (2010). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy , 54* (3), 969-976.

Cabello, R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana. Mexico, Mexico: panamericana.

Calvo, J., Cantón, R., Fernández, F., Beatriz, M., & Navarro, F. (2011 йил 05-05). Seimc. Retrieved 2015 йил 15-01 from Detección fenotípica de mecanismos de resistencia de gram negativos: https://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap38.pdf

Casellas, J. M. (2012). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. Rev Panam Salud Publica , 30 (6), 519-28.

Dallenne, C., Da Costa, A., Decre´, D., & et.al. (12 de Enero de 2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important b-lactamases in Enterobacteriaceae. Journal Antimicrob Chemother , 70-18 .

Dios, D., Ibarra, & Velasquillo. (2010). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa. INR.

Echeverri-Toro, Rueda, Maya, & otros. (2012). *Klebsiella pneumoniae* multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. Revista Chilena de Infectología , 29 (2), 175-182.

Echeverri, L., & Cataño, J. (2010). *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiologia y resistencia. IATREIA , 23 (3), 240-249.

Fierro Fierro, F. (2010). Electroforesis de ADN. INECC Herramientas moleculares aplicadas en Ecología .

García, C., Astocondor, L., & Banda, C. (2012). Enterobacterias productoras de B-lactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y en el Perú. Acta Médica Peruana , 29 (3), 163-167.

Gayosso Cerón, O. (2012). "Indicaciones terapeúticas de los antibióticos betalactámicos". Universidad Auntónoma del Estado de México, Departamento de Evaluación Profesional. Toluca: Facultad de Medicina.

Galas & Red WHONET Argentina. (2013). Boletín grupo KES. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Servicio Antimicrobianos.

Gonzáles, A., Nieves, B., Solórzano, M., Cruz, J., Puig, J., & Moreno, M. (2013). Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de b-lactamasa de

espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. Rev. Chilena Infectología , 30 (4), 374-380.

Gonzáles, C., Gil, F., Solórzano, M., Cruz, J., Puig, J., Suárez, M., y otros. (2011). Brote por *Klebsiella pneumoniae* multirresistente y productora de B-lactamasa de espectro extendido en una unidad de alto riesgo neonatal. Rev. Chilena de infectología , 28 (1), 28-34.

González-Castillo, Candel, J., & Julián-Jimenez. (2013). Antibióticos y el factor tiempo en la infección en urgencias. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica , 31 (3), 173-180.

Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana de Bogotá. (2010). *Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI;100 - S20.* Secretaría Distrital de Salud de Colombia. Bogotá: GREBO.

Gutiérrez, C., & Sanhueza, F. (2013). Vigilancia de enterobacterias productoras de carbapenemasas en cultivos rectales en un hospital universitario de Santiago, Chile. Rev Chilena Infectología , 30 (1), 103-106.

Hernández-Gómez, Blanco, Motoa, Correa, Maya, Cadena, d. l., y otros. (2014). Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. Biomédica , 34, 91-100.

Iñiguez, Zurita, Alcocer, Ortega, Gómez, & Maldonado. (2012). *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC-2: primer reporte en el Ecuador. *Rev Fac Cien Med , 37* ((1-2)), 39-41.

Jacoby, & George. (2009). AmpC β-Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev. , 22* (1), 161-182.

Jorgensen, J., & Turnidge, J. (2015). Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. Manual of Clinical Microbiology , 6 (11), 1253-1273.

Lezameta, L., Gonzáles-Escalante, E., & Tamariz, J. (2010). Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de expectro extendido. Rev Peru Med Exp Salud Publica. , 27 (3), 343-351.

Ling Toledo, E. M. (2012). Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de carbapenemasas KPC en una institución de salud del estado Zulia durante el año 2009. Universidad del Zulia, Facultad de Medicina. Maracaibo: SERBILUZ.

López-Pueyoa, Barcenilla-Gaiteb, Amaya-Villarc, & Garnacho-Monteroc. (2011). Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. Medicina Intensiva , 35 (1), 41-53.

Lopez, J., & Echeverri, L. (2010). *K. pneumoniae:* ¿la nueva "superbacteria"? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. Revista médica de la Universidad de Antioquia , 23 (2), 157-165.

Malbrán, C. (2012). Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *Servicio de Antimicrobianos , 32* (2).

Marcano, D., De Jesús, A., Hernandez, L., & Torres, L. (2011). Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela. Rev Panam Salud Publica , 30 (6), 529–34.

Mariazza, J., & Carrilo, E. (2013). Presencia de *Klebsiella pneumoniae*, enterobacter aerogenes (enterobacteriaceae) y staphylococcus aureus coagulasa positivo (micrococcaceae) en la orofaringe de individuos jóvenes sanos. Revista de Investigación de la Universidad Norbert Wiener , 2, 103 - 107.

Martinez, P., Garzón, D., & Mattar, S. (2012). CTX-M-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from community-acquired urinary tract infections

in Valledupar, Colombia. The Brazilian Journal of Infectious Diseases , 16 (5), 420-425.

Melgarejo, Martinez, Franco, & Falcón. (2013). Enterobacterias resistentes a Carbapenemes por producción de KPC, aisladas en hospitales de Asunción y Departamento Central. Rev. Salud Pública Paraguay , 3 (1), 30-35.

Menéndez, E., & Rivas, R. (Junio de 2014). Introducción al uso de herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. EducaFarma 3.0 Departamento de Microbiología y Genética Universidad de Salamanca.

Morejón García, M. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. Scielo Revista Cubana de Medicina , 52 (4), 272-280.

Moreno, K. (2013). Carbaenémicos: Tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. Revista médica de Costa Rica y Centro América XXI , 608, 599 - 605.

Morris, & Champman. (2014). Resistencia Bacteriana. Obtenido de GreenFacts: http://www.greenfacts.org/es/glosario/pqrs/resistencia-bacteriana.htm

Muñoz, Á., & Valderrama, C. (2012). Manual de procedimientos para la determinación de susceptibilidad antibiótica en patógenos de importancia hospitalaria. Intituto Nacional de Salud de Colombia Redes en Salud Pública .

Murray, P. (2009). Microbiología Médica (6ta edición ed.). Madrid, España: ELSEVIER.

Nasehi, Shahcheraghi, Sadat, & Nematzadeh. (2010). PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Tehran, Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* , *13* (3), 111-118.

Nastro, Montoto, Saposnik, García, Barberis, Vay, y otros. (2012). Resistencia a cefalosporinas de espectro extendido en enterobacterias sin AmpC inducible. Evaluación de los nuevos puntos de corte. Revista Argentina de Microbiología , 44, 30-35.

Navarro, F., & Miró, E. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. Elsevier Doyma .

Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernandez, F., & Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y Mcrobiología Clínica , 29* (7).

Nicola, Nievas, & Smayevsky. (2012). Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*. revista argentina de microbiología , 44 (4), 290-302.

Patel, Cockerill, Bradford, Eliopoulos, Hindler, Jenkins, y otros. (2015). Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Suplplement. Association of Public Healt Laboratories , 35 (3), 34.

Pacheco, Osorio, Correa, & Villegas. (2014). Prevalencia de bacterias Gram negativas portadoras del gen blaKPC en hospitales de Colombia. Biomedica , 34, 81 - 80.

Pacheco, R., Osorio, L., Correa, A. M., & Villegas, M. V. (2014). Prevalencia de bacterias Gram negativas portadoras del gen *bla*KPC en hospitales de Colombia. Biomedica , 34 (1), 81-90.

Paciel, D., Seija, V., Prieto, J., Vignol, R., Media, J., & Savio, E. (2011). Enterobacterias productoras de KPC. Rev. Tendencias de Medicina .

Pérez de Castro, M. (2011). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Puerta-García, & Mateos-Rodriguez. (2010). Enterobacterias. Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado , 10 (51), 3426-3431.

Pulido, Mantilla, Valenzuela, Reguro, & Gonzalez. (2011). Distribución de genes codificadores de β-lactamasas de espectro extendido en aislamientos de *Klebsiella*

pneumoniae de hospitales de Bogotá, D.C., Colombia. *Biomédica , 31* (1), 15 - 20.

Rapoport, M. (2014). Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI). Servicios Antimicrobianos - INEI .

Ripoll, A. (2014). Evolución, selección y detección de beta-lactamasas CTX-M con espectro de acción templado. Madrid: Universidad Coplutense de Madrid.

Robinson Pacheco, L. O. (2014). Prevalencia de bacterias Gram negativas portadoras del gen *bla*KPC en hospitales de Colombia. *Biomedica*, 81-90.

Sennati, S., Santella, G., Di Conza, J., Pallencchi, L., Pino, M., Ghiglione, B., Rossolini, G., Radice, M. y Gutkind, G. 2012. Changing epidemiology of extended-spectrum β-lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56(11): 6003-6005.

Seral, C., Gude, M. J., & Castillo, J. (2012). Emergencia de β-lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. Revista Española Quimioter , 25 (2), 89-99.

Sharma, J., Sharma, M., & Ray, P. (2010). Detection of TEM & SHV genes in *Escherichia coli & Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary care hospital from India. *Indian J Med Res , 132*, 332 - 336.

Singtohin, S., Chanawong, A., Lulitanond, A., Stribenjalux, P., Auncharoen, A., Kaewkes, W., y otros. (2010). CMY-2, CMY-8b, and DHA-1 plasmid-mediated AmpC β-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae* from a university hospital, Thailand. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease , 68 (3), 271-277.

Sobrarbe. (2011). Ciencias para el Mundo Contemporáneo. IES .

Trueba, B., Casares, M., Fidel, E., & Rodríguez, D. (Julio de 2012). Detección de mecanismos de resistencia en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multidrogorresistentes. Revista Cubana de Medicina .

Universidad Complutense de Madrid. (2009 27-Septiembre). Microbiología Tema: 11. Retrieved 2015 йил 15-Enero from Genética Bacteriana Variaciones Fenotípicas y Genotípicas. Mutación y Recombinación: https://cv2.sim.ucm.es/moodle/file.php/21298/Clases_de_teoria/Tema_2_bacteriologia_general/Tema11BGZ.pdf

Xu, J., Li, W., Chen, W., & Zhou, Y. (2010). *Klebsiella alba sp*. nov., a novel pesticide-tolerant bacterium from a heavily polluted enviroment. J. Gen. Appl. Microbiol. , 56, 241-247.

Zeron, A. (2011). Biotipos, fenotipos y genotipos.¿ Qué biotipo tenemos? Educación , 2 (1).

Zurita, J. 2012. Resistencia Bacteriana en el Ecuador. Centro de Publicaciones PUCE. Quito, Ecuador.

6. ANEXOS

Anexo 1. Aislamiento de cepas e identificación bioquímica de *Klebsiella pneumoniae*.

***Procedimiento operativo estandarizado*.**

Primer día: siembra y aislamiento de cepas por medio de estriamiento en Agar Base Sangre y Agar MacConkey obteniendo cepas diferenciadas y aisladas.

Segundo día: de no poseer cepas aisladas y puras se procederá a realizar una resiembra en Agar Sangre.

Realizar una suspensión a escala 0,5 McFarland con colonias aisladas y puras en agua destilada estéril.

En el medio de cultivo Kliger sembrar realizando un pique con la pipeta hasta el fondo del tubo y estriando en la cola del agar.

En el medio de cultivo Lisina sembrar realizando un pique con la pipeta hasta el fondo del tubo y estriando en la cola del agar.

En los medios de cultivo Citrato y Urea sembrar estriando con la pipeta en la cola del agar.

En el medio de cultivo SIM sembrar picando con la pipeta las tres cuartas partes del medio de forma vertical y dejando caer de 2 a 3 gotas de la suspensión.

En el medio de cultivo Rojo de Metilo/Voges Proskauer (MR/VP) sembrar dejado caer de 5 a 10 gotas de la suspensión bacteriana en el medio líquido.

Incubar todo a 36^{o}C de 10 a12 horas.

Tercer día: colocar los reactivos para el medio líquido MR/VP, interpretar los resultados de las bioquímicas, verificar el indol y anotar los resultados en la matriz de trabajo de EXCEL. **Anexo 7**.

Anexo 2. Protocolo para la realización del antibiograma y pruebas fenotípicas.

Procedimiento operativo estandarizado.

Se realizará mediante el método de difusión de discos en agar o técnica de Kirby- Bauer.

Primer día: tomar colonia única del Agar Base Sangre y realizar un repique en otra caja de Agar Base Sangre, incubar a 36 °C de 10 a 12 horas.

Segundo día: realizar una suspensión a escala 0,5 McFarland con colonias aisladas y puras en agua y colocar los siguientes discos.

Caja #1: Ácido 3-aminofenil borónico (APB), Amoxicilina/Ácido clavulánico (AMC), Ceftriaxona (CTX), Ceftazidima (CAZ), Imipenem (IMP) y EDTA.

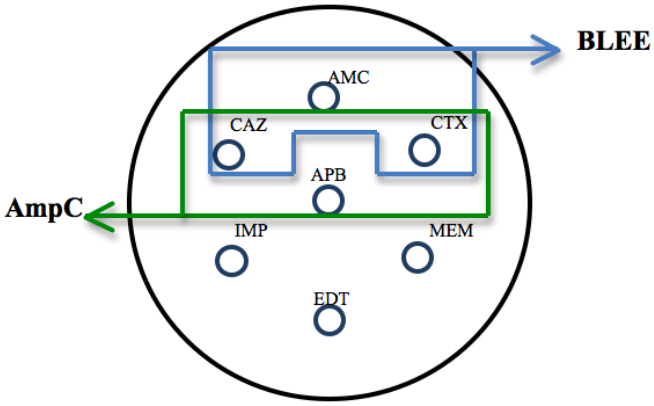


Figura 1.

Caja #2: Cefoxitin (FOX), Cefepime (FEP), Aztreonam (ATM)

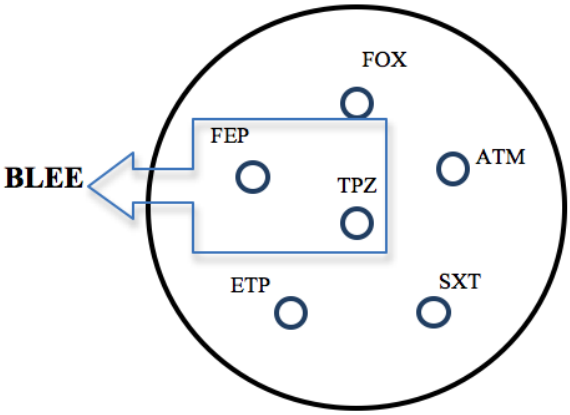


Figura 2.

Tercer día: realizar la lectura e interpretación del antibiograma siguiendo los lineamientos del CLSI 2015, anotar los resultados.

Anexo 3. Método de Jarlier. Difusión de doble disco para BLEE.

Procedimiento operativo estandarizado.

Fundamento

El fundamento del método se basa en la hidrólisis al exponer a un disco combinado de inhibidor de b-lactamasas + betalactámico frente a un monobactámico y cefalosporinas de tercera y cuarta generación.

Procedimiento

Se realiza una escala 0,5 McFarland y se procede a inocular de la suspensión en la caja como se indica en el método de Kirby Bauer.

Se coloca en el centro el disco combinado (betalactámico + inhibidor) de Amoxicilina/ácido Clavulánico (AMC) y a 2,5 cm de distancia el monobactámico (Aztreonam) y las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Cefepime, Cefazolina, Ceftriaxona).

Se determina la presencia de BLEE al observar una sinergia del disco combinado con todos los discos, dando una forma ovalada que se asemeja al efecto de un balón de fútbol americano o un huevo.

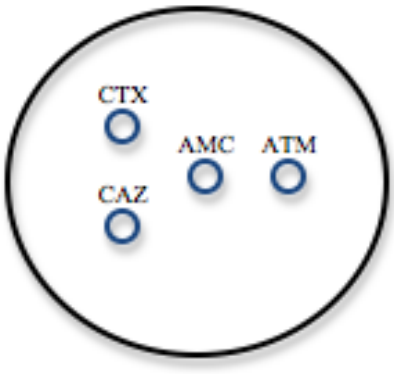


Figura 3.

(Lezameta, Gonzáles-Escalante, & Tamariz, 2010)

Anexo 4. Identificación de AmpC. Método del ácido 3-aminofenil borónico.

Procedimiento operativo estandarizado.

Fundamento

La técnica se fundamenta en observar la sinergia entre el disco de ácido 3-aminofenil borónico y una cefalosporina de tercera o cuarta generación.

Procedimiento

Se realiza una escala 0,5 McFarland y se procede a inocular de la suspensión en la caja como se indica en el método de Kirby Bauer.

Se coloca en el centro el disco de ácido 3-aminofenil borónico y en línea de manera superior e inferior a 2,5 cm de distancia dos cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Cefepime, Cefazolina, Ceftriaxona).

Se determina la presencia de AmpC al observar una sinergia entre las cefalosporinas y el disco central.

(Calvo, Cantón, Fernández, Beatriz, & Navarro, 2011)

Anexo 5. Extracción de ácidos nucleicos por calentamiento.

Procedimiento operativo estandarizado.

1. Realizar una suspensión bacteriana en 1mL de agua destilada estéril de la caja de Agar Base Sangre donde se realizó el segundo repique con colonia única.
2. Colocar las suspensiones bacterianas a baño maría por 15 minutos a 90ºC.
3. Centrifugar por 10 minutos a 14000 rpm.
4. Extraer el sobrenadante y cambiar de tubo.
5. Almacenar a una temperatura de -4 ºC.

Anexo 6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Procedimiento operativo estandarizado.

A continuación, se detalla el procedimiento a realizar para el desarrollo de la PCR, el mismo se describe tomando en consideración un solo gen de los 5 a investigar y una sola muestra, por lo tanto, dicho proceso debe repetirse para los 4 genes restantes.

Formula Master Mix		
	Cantidad	**Concentración**
Agua molecular	11 uL	1X
P forward	0,5 uL	0,2 uM
P reverse	0,5 uL	0,2 uM
GoTaq Hot Start Green	12 uL	
DNA	1 uL	

1. Realizar una solución madre denominada Master mix de la siguiente manera:
   - Colocar en un criotubo o un tubo ependorf 11 uL de agua molecular.
   - Agregar 12 uL del reactivo GoTaq Hot Start Green.
   - Añadir 0,5 uL de cada *primer* según los genes a investigar.

Nota: el procedimiento anterior está diseñado para una sola muestra, por lo tanto, al ser realizado con varias cepas se debe multiplicar cada cantidad por el número de muestras escogido incluyendo los controles positivos (cepa conocida con presencia del gen de resistencia) y negativo (Solución Master mix sin muestra).

2. Dispensar 24uL de la solución Master mix en diferentes tubos, según la cantidad de muestras a investigar.
3. Añadir 1uL del ADN extraído de cada cepa en los tubos con la solución Master mix y mezclar.
4. Colocar correctamente los tubos en el termociclador, revisar que se encuentren bien cerrados y realizar la corrida mediante los siguientes parámetros:

Condiciones PCR		
Activación taq	94 grados x 10 minutos	
Denaturación	94 grados x 40 segundos	30 ciclos
Hibridación	60 grados x 40 segundos	
Extensión	72 grados x 1 minuto	
Extensión final	64 grados x 7 minutos	

5. Almacenar los amplicones resultantes del termociclado a -4 ºC para su posterior corrida electroforética.
6. Realizar una corrida electroforética en gel mediante las siguientes condiciones:

Condiciones electroforesis	
Agarosa	2%
Buffer Tae	1X
Voltios	90
Tiempo	90min
Tincion	Syber-bromuro

7. Preparar el gel de Agarosa al 2% disolviendo con calor 3g de Agarosa en polvo en 2 litros de buffer Tae 1X y agregar 2uL de la tinción Syber.
8. Colocar la preparación en el molde para gel de electroforesis con sus respectivos peines y dejar secar para formar los carriles de la corrida. Dejar polimerizar el gel entre 15 minutos a una hora.
9. Extraer los peines y colocar el gel en la cámara de electroforesis
10. Adicionar el buffer Tae 1X en la cámara hasta que el gel se encuentre totalmente cubierto.
11. Colocar en cada carril 4uL de los amplicones a investigar, conjuntamente con los controles tanto positivo como negativo y 2uL de la solución denominada Ladder,

la cual contiene un número de pares de bases conocido, mismo que, nos ayuda a identificar la presencia de nuestro gen.

12. Iniciar la corrida a 100 voltios por 60 minutos.
13. Observar el gel en un transiluminador con luz ultravioleta y anotar los resultados.

Anexo 7. Matrices de trabajo

INFORMACIÓN GENERAL CEPAS										PRUEBAS BIOQUÍMICAS						
No.	**CÓDIGO**	**BACTERIA**	**ORIGEN**	**SALA HOSP.**	**RESISTENCIA**	**CASA DE SALUD**	**EDAD**	**SEXO**	**INVASIVA**	**CIT**	**KLIG**	**LIA**	**SIM**	**UREA**	**MR**	**VP**

ANTIBIOGRAMA																		
AMC	***CTX***	***CAZ***	***IMP***	***MER***	***FOX***	***FEP***	***TPZ***	***ETP***	***SXT***	***ATM***	***TE***	***AK***	***CN***	***NA***	***CIP***	***PB***	***TIG***	

TIPO DE RESISTENCIAS			GENES DE RESISTENCIA				
SINERGIA BLEE	***SINERGIA KPC***	***SINERGIA AmpC***	**SHV**	**TEM**	**CTX-M**	**DHA**	**CMY**