

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**  
**BIOQUÍMICO CLÍNICO**

**TÍTULO**

Caracterización de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo GES en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas a partir de aislados clínicos de hospitales de la ciudad de Quito de enero a diciembre de 2016

**AUTORES DE LA DISERTACIÓN**

ANDRÉS SEBASTIÁN MÉNDEZ MORALES

ANDREA CAROLINA SARMIENTO NINAHUALPA

**DIRECTOR**

MÁSTER JOSÉ EDUARDO VILLACÍS

**QUITO, 2018**

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **Andrés Sebastián Méndez Morales**, C.I.1727305995, autor del trabajo de graduación titulado “**Caracterización de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo GES en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas a partir de aislados clínicos de hospitales de la ciudad de Quito de enero a diciembre de 2016**”, previo a la obtención del grado académico de **BIOQUÍMICO CLÍNICO** en la **FACULTAD DE MEDICINA**.

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 Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Andrés Sebastián Méndez Morales

C.I. 1727305995

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **Andrea Carolina Sarmiento Ninahualpa**, C.I.1600416885, autora del trabajo de graduación titulado “**Caracterización de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo GES en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas a partir de aislados clínicos de hospitales de la ciudad de Quito de enero a diciembre de 2016**”, previo a la obtención del grado académico de **BIOQUÍMICA CLÍNICA** en la **FACULTAD DE MEDICINA**.

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 Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Andrea Carolina Sarmiento Ninahualpa

C.I. 1600416885

## CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Bioquímica Clínica del Sr. Andrés Sebastián Méndez Morales y la Srta. Andrea Carolina Sarmiento Ninahualpa sobre el tema “**Caracterización de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo GES en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas a partir de aislados clínicos de hospitales de la ciudad de Quito de enero a diciembre de 2016**” ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



José Eduardo Villacís Acuña, Mgt

**Director**

**Quito, 2018**

## **DEDICATORIA**

A toda mi familia, especialmente a mis padres Patricio y Nancy por la confianza brindada en mi formación profesional y personal.

A mi abuelita Elsa Santos.

Andrés Méndez.

## **DEDICATORIA**

Con mucho cariño,

A mis padres por su apoyo incondicional

A mis hermanas y Bono por ser mis compañeros

A mis abuelitos por brindarme el cariño más sincero

Andrea Sarmiento

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por permitirnos culminar de manera satisfactoria esta gran etapa de nuestras vidas.

A nuestras familias porque formaron parte de este logro mediante su cariño, preocupación y apoyo especialmente a nuestros padres por creer en nosotros y ser nuestro mejor ejemplo.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Medicina, Carrera de Bioquímica Clínica y sus docentes por las enseñanzas y los conocimientos brindados a lo largo de nuestra formación profesional y personal.

A todo el equipo de trabajo del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública por el apoyo técnico y humano claves para la culminación de este trabajo. Especialmente a nuestro director José Eduardo Villacís por darnos esta oportunidad y su ayuda durante toda esta etapa.

A nuestros amigos cercanos por el cariño, apoyo y complicidad brindados durante toda la carrera, además de las risas y los momentos compartidos.

A Andrea por ser la compañera ideal y partícipe de esta gran etapa, fuiste fundamental en este trabajo. Juntos lograremos grandes cosas.

A Sebastián por ser mi compañero, amigo y apoyo durante todo este tiempo que hemos compartido juntos, gracias por no dejarme dar por vencida y creer en mí.

Andrés Méndez y Andrea Sarmiento

## RESUMEN

*Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos oportunistas más relevantes en infecciones asociadas a la atención en salud cuya gravedad aumenta por su elevado nivel de resistencia natural a los antibióticos y gran capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia, lo que reduce las opciones terapéuticas y determina una mayor dificultad para establecer una terapia antimicrobiana adecuada. Uno de los mecanismos de resistencia más importantes en *Pseudomonas aeruginosa* es la impermeabilidad acompañada por la producción de enzimas intrínsecas y adquiridas como la BLEE tipo GES que posee 33 variantes reportadas con diversa actividad hidrolítica. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar la presencia de betalactamasas de espectro extendido tipo GES en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que ingresaron al Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos como parte de la Red de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana durante el periodo de enero a diciembre de 2016.

Un total de 55 cepas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas manuales y sistema automatizado *Vitek 2*. El perfil de susceptibilidad se determinó por método de difusión de disco y concentración mínima inhibitoria con la tarjeta AST-N272 por sistema automatizado *Vitek 2* frente a los antibióticos recomendados por el CLSI (2017). Para la detección fenotípica de enzima GES se utilizó el método de sinergia de doble disco entre ceftazidima e imipenem. Los análisis moleculares consistieron en la amplificación del gen *bla<sub>GES</sub>* mediante PCR de punto final y secuenciación de tipo Sanger en MacroGen Corea.

Los resultados demostraron que la mayoría de aislados provinieron principalmente de UCI con 22%, de población adulta y masculina con 95% y 65% respectivamente. La muestra más frecuente fue secreción con 64%, siendo secreción traqueal la más predominante con 29%. La mayoría de las cepas presentaron un patrón fenotípico MDR/XDR frente a los

antibióticos evaluados. La sinergia de doble disco entre ceftazidima e imipenem identificó 52/55 cepas y la técnica de PCR fue positiva en 54/55 cepas para el gen *bla*<sub>GES</sub>. Basándose en la homología de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas obtenidas y del *GenBank* se logró determinar 2 variantes del gen *bla*<sub>GES</sub>, 17 pertenecientes a *bla*<sub>GES-26</sub> y 1 a *bla*<sub>GES-5</sub>.

En conclusión, este estudio demostró la presencia de 2 variantes del gen como *bla*<sub>GES-5</sub> y *bla*<sub>GES-26</sub> en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas a partir de aislados clínicos de 4 diferentes hospitales de la ciudad de Quito y constituyen el primer reporte de variantes del gen *bla*<sub>GES</sub> en Ecuador. Estas variantes se presentan como un mecanismo de resistencia importante debido a su actividad hidrolítica frente a antibióticos betalactámicos y gran capacidad de diseminación en bacterias Gram negativas.

**Palabras clave:** BLEE, GES, MDR, *Pseudomonas aeruginosa*, resistencia antibiótica, XDR.

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is one of the most relevant opportunistic pathogens of health care-associated infections whose severity increases due to its high level of natural resistance to antibiotics and great capacity to acquire new resistance mechanisms, which reduces the therapeutic options and determines a major difficulty to establish an adequate antimicrobial therapy. One of the most important resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* is the impermeability with intrinsic and acquired enzymes production such as the GES-type ESBL that has 33 variants reported with different hydrolytic activity. Therefore, the objective of this study was to characterize the presence of GES type extended spectrum  $\beta$ -lactamases in strains of *Pseudomonas aeruginosa* that entered the National Antimicrobial Resistance Reference Center as part of the Antimicrobial Resistance Surveillance Network during the period from January to December 2016.

A total of 55 strains were identified by manual biochemical tests and *Vitek 2* automated system. The susceptibility profile was determined by disc diffusion method and minimum inhibitory concentration with the AST-N272 card by *Vitek 2* automated system against the antibiotics recommended by the CLSI (2017). For the phenotypic detection of GES enzyme, the double disk synergy method between ceftazidime and imipenem was used. Molecular analyzes consisted in the amplification of the *bla*<sub>GES</sub> gene by endpoint PCR and Sanger type sequencing in Macrogen Korea.

The results demonstrated that the majority of isolates came mainly from ICU with 22%, adult and male population with 95% and 65% respectively. The most frequent sample was secretion with 64% and tracheal secretion was the most predominant with 29%. The majority of the strains presented a MDR/XDR phenotypic pattern against the antibiotics

tested. The double disc synergy between ceftazidime and imipenem identified 52/55 strains and the PCR technique was positive in 54/55 strains for the *bla*<sub>GES</sub> gene. Based on the homology of the obtained nucleotide and aminoacid sequences and *GenBank*, 2 variants of the *bla*<sub>GES</sub> gene were determined, 17 belonging to *bla*<sub>GES-26</sub> and 1 to *bla*<sub>GES-5</sub>.

In conclusion, this study demonstrated the presence of 2 gene variants such as *bla*<sub>GES-5</sub> and *bla*<sub>GES-26</sub> in strains of *Pseudomonas aeruginosa* obtained from clinical isolates from 4 different hospitals in the city of Quito and constitute the first report of the *bla*<sub>GES</sub> gene variants in Ecuador. These variants are presented as an important resistance mechanism due to their hydrolytic activity against  $\beta$ -lactam antibiotics and great capacity for dissemination among Gram-negative bacteria.

**Keywords:** antibiotic resistance, ESBL, GES, MDR, *Pseudomonas aeruginosa*, XDR.

## TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN .....	i
CERTIFICACIÓN .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	ix
TABLA DE CONTENIDOS.....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE TABLAS.....	xvi
LISTA DE ANEXOS .....	xvii
LISTA DE SIGLAS .....	xviii
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 JUSTIFICACIÓN .....	3
1.2 OBJETIVOS .....	4
1.2.1 Objetivo general. ....	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO II .....	6
2.1 ANTECEDENTES .....	6
2.2 MARCO TEÓRICO .....	7
2.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7

2.2.1.1	Generalidades.....	7
2.2.1.2	Epidemiología.....	8
2.2.1.3	Infecciones Asociadas a la Atención en Salud .....	9
2.2.1.4	Tratamiento .....	9
2.2.2	$\beta$ -lactamasas. ....	11
2.2.2.1	Variante GES .....	11
2.2.2.2	Métodos de identificación de enzima BLEE tipo GES.....	12
2.2.3	Mecanismos de resistencia. ....	14
2.2.3.1	Mecanismos de resistencia intrínsecos .....	14
2.2.3.2	Mecanismos de resistencia adquiridos.....	15
2.3	MARCO CONCEPTUAL .....	18
CAPÍTULO III.....		21
3.1	MARCO METODOLÓGICO.....	21
3.1.1	Tipo de estudio. ....	21
3.1.2	Tipo de muestreo. ....	21
3.2	Operacionalización de variables .....	22
3.3	FASES DE ESTUDIO .....	25
3.3.1	Fase I: Autorizaciones y permisos.....	25
3.3.2	Fase II: Recolección de datos. ....	25
3.3.3	Fase III: Análisis microbiológicos.....	25
3.3.3.1	Control de calidad .....	25

3.3.3.2	Aislamiento e identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	27
3.3.3.3	Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana .....	27
3.3.3.4	Identificación fenotípica de BLEE tipo GES.....	28
3.3.4	Fase IV: Análisis molecular. ....	28
3.3.4.1	Control de calidad de la PCR.....	28
3.3.4.2	Análisis de primers .....	28
3.3.4.3	Extracción de ADN.....	29
3.3.4.4	Amplificación del gen <i>bla</i> <sub>GES</sub> .....	29
3.3.4.5	Purificación y secuenciamiento .....	30
3.3.5	Fase V: Análisis de resultados.....	31
3.3.6	Eliminación de desechos biológicos y tóxicos. ....	31
CAPITULO IV.....		32
4.1	RESULTADOS .....	32
4.1.1	Aislamiento e identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	32
4.1.2	Evaluación de susceptibilidad antibiótica.....	35
4.1.2.1	Método de difusión de disco .....	35
4.1.2.2	Método automatizado <i>Vitek 2</i> .....	36
4.1.2.3	Errores en las categorías clínicas entre método de difusión de disco y <i>Vitek</i> 2.....	37
4.1.3	Detección fenotípica de BLEE tipo GES .....	40
4.1.4	Identificación molecular del gen <i>bla</i> <sub>GES</sub> . ....	41

4.1.4.1 Amplificación del gen.....	41
4.1.4.2 Análisis de secuencia.....	42
CAPÍTULO V .....	47
5.1 DISCUSIÓN .....	47
CONCLUSIONES .....	54
RECOMENDACIONES .....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	57
ANEXOS.....	76

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática del integrón de clase 1 .....	15
<b>Figura 2.</b> Tipo de servicio del que provienen las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	32
<b>Figura 3.</b> Tipos de muestras clínicas de las que provienen las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	33
<b>Figura 4.</b> Características morfológicas de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	35
<b>Figura 5.</b> Perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mediante método de difusión de disco .....	36
<b>Figura 6.</b> Perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mediante método automatizado <i>Vitek 2</i> .....	37
<b>Figura 7.</b> Distribución antibiótica de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a piperacilina/tazobactam mediante método de difusión de disco y <i>Vitek 2</i> .....	38
<b>Figura 8.</b> Errores en las categorías clínicas entre método de difusión de disco y CMI en piperacilina/tazobactam.....	38
<b>Figura 9.</b> Distribución antibiótica de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a cefepime mediante método de difusión de disco y <i>Vitek 2</i> .....	39
<b>Figura 10.</b> Errores en las categorías clínicas entre método de difusión de disco y CMI en cefepime.....	40
<b>Figura 11.</b> Sinergia de doble disco entre imipenem y ceftazidima de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	40
<b>Figura 12.</b> Representación gráfica de la amplificación del gen <i>bla</i> <sub>GES</sub> de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	41
<b>Figura 13.</b> Mutaciones puntuales.....	43
<b>Figura 14.</b> Alineamiento del gen <i>bla</i> <sub>GES-5</sub> y de la cepa GESpae001 .....	45
<b>Figura 15.</b> Alineamiento del gen <i>bla</i> <sub>GES-26</sub> y de la cepa GESpae060.....	46

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de enzimas adquiridas comúnmente descritas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	16
<b>Tabla 2.</b> Operacionalización de variables .....	22
<b>Tabla 3.</b> Componentes de la reacción de PCR.....	29
<b>Tabla 4.</b> Condiciones para la amplificación del gen <i>bla<sub>GES</sub></i> .....	30
<b>Tabla 5.</b> Análisis de frecuencias por tipo de secreción.....	33
<b>Tabla 6.</b> Análisis de frecuencias por sexo, edad y hospital .....	34
<b>Tabla 7.</b> Identificación de las variantes del gen <i>bla<sub>GES</sub></i> en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	44

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Aprobación CEISH-PUCE .....	76
<b>Anexo 2.</b> Control de calidad de medios de cultivo .....	77
<b>Anexo 3.</b> Control de calidad de discos .....	78
<b>Anexo 4.</b> Control de calidad de tarjetas <i>Vitek 2</i> .....	79
<b>Anexo 5.</b> Sustratos de la tarjeta GN de <i>Vitek 2</i> ( <i>Biomerieux</i> ) .....	80
<b>Anexo 6.</b> Control de calidad de la PCR .....	81
<b>Anexo 7.</b> Protocolo de purificación de amplicones.....	82
<b>Anexo 8.</b> Perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mediante método de difusión de disco .....	83
<b>Anexo 9.</b> Perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mediante método automatizado <i>Vitek 2</i> .....	86
<b>Anexo 10.</b> Identificación fenotípica y genotípica de enzima GES en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	89
<b>Anexo 11.</b> Alineamiento y complementariedad del primer forward.....	90
<b>Anexo 12.</b> Alineamiento y complementariedad del primer reverse.....	91

## LISTA DE SIGLAS

**ATCC:** *American Type Culture Collection.*

**BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool.*

**BLEE:** Beta Lactamasa de Espectro Extendido.

**CLSI:** *Clinical & Laboratory Standards Institute.*

**CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria.

**GES:** *Guiana Extended Spectrum.*

**IAAS:** Infecciones Asociadas a la Atención en Salud.

**MDR:** *Multi Drug Resistant*

**NAV:** Neumonía Asociada a la Ventilación.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**PBP:** (*Penicilling Binding Proteins*). Proteínas Fijadoras de la Penicilina.

**PCR:** (*Polimerase Chain Reaction*). Reacción en Cadena de la Polimerasa.

**PDR:** *Pan Drug Resistant*

**TAV:** Traqueobronquitis Asociada a la Ventilación.

**UCI:** Unidad de Cuidados Intensivos.

**XDR:** *Extremely Drug Resistant*

## INTRODUCCIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa, aerobio estricto, oxidasa positivo y no fermentador de lactosa. Está ampliamente distribuida en diferentes ambientes como: suelo, plantas y agua (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2014). De igual manera se han reportado aislamientos en ambientes hospitalarios teniendo como reservorio todo tipo de fómite (Rivera, Rodríguez, & Huayán, 2008). *P. aeruginosa* es la causa más frecuente de infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Silby, Winstanley, Godfrey, Levy, & Jackson, 2011), por lo que es considerada uno de los principales patógenos oportunistas en IAAS a nivel mundial (Bălășoiu, Bălășoiu, Mănescu, Avramescu, & Ionete, 2014).

Este microorganismo generalmente está implicado en infecciones urinarias, quirúrgicas, bacteriemias y neumonías (Estepa et al., 2017). Así mismo, es el agente etiológico más frecuente de infecciones secundarias en pacientes con fibrosis quística y quemaduras (Mirsalehian, Neyestanaki, Taherikalani, Jabalameli, & Emaneini, 2017). El creciente incremento de infecciones por cepas MDR, XDR e incluso PDR (Oliver, 2017) compromete la selección de un tratamiento efectivo, lo que desencadena en un aumento de la morbimortalidad (Oliver, Mulet, López, & Juan, 2017).

Según la OMS (2017), *Pseudomonas aeruginosa* está ubicada dentro del grupo crítico de bacterias multirresistentes debido a que ha adquirido resistencia frente a un elevado número de antibióticos. Esta resistencia es ocasionada por mecanismos intrínsecos de la bacteria como impermeabilidad de membrana, sistemas de expulsión activa e hiperexpresión de betalactamasas cromosómicas (Fariñas & Martínez, 2013); sin embargo, la coexistencia con otros mecanismos adquiridos a través de genes de resistencia por transferencia horizontal (Deng et al., 2015) contribuyen a la evolución de cepas multirresistentes generando un problema de salud pública.

La betalactamasa de espectro extendido tipo GES es un mecanismo adquirido de resistencia antibiótica que está codificada por el gen *bla*<sub>GES</sub> ubicado dentro de estructuras denominadas integrones (Lin, Liu, Lin, & Shi, 2012). Esta enzima presenta una diversa actividad hidrolítica frente a antibióticos betalactámicos (López, Torres, & Prada, 2015) mediada por sus 33 variantes (Naas et al., 2017) descritas en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y principalmente en *Pseudomonas aeruginosa* (Maurya, Choudhury, & Bhattacharjee, 2014).

A nivel mundial se han reportado diferentes variantes del gen como *bla*<sub>GES-13</sub> en Grecia, *bla*<sub>GES-5</sub> en India, *bla*<sub>GES-24</sub> en Corea del Sur y *bla*<sub>GES-2</sub> en Sudáfrica (Kotsakis et al., 2010; Maurya et al., 2014; Hong, Yoon, Lee, Jeong, & Lee, 2016; Adjei, Govinden, Moodley, & Essack, 2017). En Sudamérica se han descrito en Brasil: *bla*<sub>GES-1</sub>, *bla*<sub>GES-5</sub> y *bla*<sub>GES-11</sub> (Castanheira, Mendes, Walsh, Gales, & Jones, 2004; Da Fonseca, Vieira, Cipriano, & Vicente, 2007; da Silva Júnior et al., 2017) y en Argentina: *bla*<sub>GES-1</sub> (Pasteran et al., 2005). Estos estudios demuestran la capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* para adquirir genes de resistencia BLEE tipo GES, su amplia distribución geográfica y diseminación clonal de cepas multirresistentes dentro de hospitales. En Ecuador existe un único reporte del gen *bla*<sub>GES</sub> en la ciudad de Quito en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo, sus variantes no fueron determinadas (Ayala, 2011).

Debido a la importancia clínica de *Pseudomonas aeruginosa* y los datos presentados a nivel mundial sobre la susceptibilidad antibiótica en relación a la presencia del gen *bla*<sub>GES</sub> y sus variantes, el presente estudio respondió a la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son las variantes de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo GES en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas a partir de aislados clínicos de hospitales de la ciudad de Quito de enero a diciembre de 2016?

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos oportunistas más frecuentes en infecciones asociadas a la atención en salud debido a su ubicuidad y gran capacidad para sobrevivir en condiciones adversas. Su elevado nivel de resistencia a los antibióticos compromete establecer una terapia antimicrobiana adecuada, lo que desencadena en una estancia hospitalaria prolongada, incremento de costos y morbimortalidad elevada de los pacientes afectados y es considerado como un problema de salud pública a nivel mundial.

Los estudios en este patógeno generalmente están enfocados en la búsqueda de mecanismos de resistencia enzimáticos y no enzimáticos, sin embargo, la resistencia mediada por la enzima GES y sus variantes ha sido poco estudiada en Sudamérica. Esta investigación planteó determinar las variantes predominantes de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo GES a nivel hospitalario y el comportamiento fenotípico frente a los antibióticos recomendados para su tratamiento. Así mismo este estudio estableció la frecuencia del fenotipo BLEE GES en relación al sexo, edad, hospital, servicio, tipo de muestra y variantes con el fin de conocer el comportamiento del patógeno dentro del ambiente hospitalario.

Los resultados obtenidos aportarán a la Red Pública Integral de Salud y permitirán definir el perfil de susceptibilidad de las cepas que presentaron el gen. Por lo tanto, es necesario determinar la presencia y variantes GES en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que ingresaron al Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos como parte de la Red de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana, ya que previamente han sido descritas pero no caracterizadas. Así mismo brindará información al personal de salud para establecer medidas preventivas para evitar su diseminación y optimizar la terapia antimicrobiana en base a patrones de susceptibilidad locales.

Las variantes encontradas en este estudio serán relacionadas con otros reportes del gen descritos en países de la región, lo que permitirá conocer la situación de *Pseudomonas aeruginosa* portadora del gen *bla<sub>GES</sub>* en la ciudad de Quito.

La investigación planteada fue viable porque fue autofinanciada por los investigadores y contó con el equipamiento e infraestructura necesaria del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) para la realización de los análisis microbiológicos y moleculares.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo general.**

Caracterizar  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo GES en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas a partir de aislados clínicos de hospitales de la ciudad de Quito de enero a diciembre de 2016.

### **1.2.2 Objetivos específicos.**

1. Determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiano en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas a partir de aislados clínicos de hospitales de la ciudad de Quito de enero a diciembre de 2016 mediante concentración mínima inhibitoria y método de difusión de disco.
2. Detectar la presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo GES en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas a partir de aislados clínicos de hospitales de la ciudad de Quito de enero a diciembre de 2016 por medio de la prueba de sinergia de doble disco.
3. Identificar molecularmente variantes de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo GES en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas a partir de aislados clínicos de hospitales de la ciudad de Quito de enero a diciembre de 2016 mediante reacción en cadena de la polimerasa y secuenciamiento.

4. Determinar la frecuencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo GES en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas a partir de aislados clínicos de hospitales de la ciudad de Quito de enero a diciembre de 2016 por hospital, servicio, tipo de muestra, edad, sexo y variantes GES.

## CAPÍTULO II

### 2.1 ANTECEDENTES

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas de origen bacteriano que poseen actividad hidrolítica contra antibióticos betalactámicos (Marín & Gudiol, 2003). En la clasificación de Ambler descrita en 1980 existen 4 clases de  $\beta$ -lactamasas: A, B, C y D donde las de clase A, C y D son denominadas serin  $\beta$ -lactamasas y las de clase B son dependientes de zinc (Walther & Hoiby, 2007).

Dentro de las betalactamasas de clase A se encuentra la BLEE tipo GES, esta fue descrita por primera vez en Francia en 1998 siendo denominada GES-1 (Poirel, Thomas, Naas, Karim, & Nordmann, 2000). Este tipo de enzima se ha reportado en bacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Poirel, Bonnin, & Nordmann, 2011) y posee una diseminación mediada por plásmidos transferibles (Bogaerts et al., 2010; Bonnin et al., 2011). En la actualidad se han descrito 33 variantes del gen; en la que destaca el primer reporte de *bla*<sub>GES-1</sub> en *Escherichia coli* en Grecia (Vourli et al., 2004) y el primero de *bla*<sub>GES-5</sub> en *Pseudomonas aeruginosa* en China (Wang, Cai, Chang, & Mi, 2006). De igual manera se han hallado nuevas variantes a nivel mundial como *bla*<sub>GES-13</sub> (Kotsakis et al., 2010), *bla*<sub>GES-18</sub> (Bebrone et al., 2013), *bla*<sub>GES-19</sub> y *bla*<sub>GES-20</sub> (Garza et al., 2015) y *bla*<sub>GES-24</sub> (Hong et al., 2016).

En Sudamérica se reportó el primer caso de *bla*<sub>GES-1</sub> en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en São Paulo (Castanheira et al., 2004). En Brasil se describieron otras variantes como *bla*<sub>GES-5</sub> en *P. aeruginosa* (Da Fonseca et al., 2007) y *K. pneumoniae* (Picão, Santos, Nicoletti, Furtado, & Gales, 2010; Ribeiro, Falci, Rozales, Barth, & Zavascki, 2014) y en la actualidad se siguen reportando casos de *bla*<sub>GES-1</sub> en baja prevalencia y clones circulantes de *bla*<sub>GES-11</sub> (Da Silva Júnior et al., 2017). En Argentina se

conoce de un solo reporte perteneciente a *bla*<sub>GES-1</sub> (Pasteran et al., 2005). En la ciudad de Quito-Ecuador se describió un reporte de genes codificantes para Serin- $\beta$ -lactamasas (*bla*<sub>GES</sub> y *bla*<sub>KPC</sub>) en 129 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, en el que el gen *bla*<sub>GES</sub> fue identificado en 37 aislados (28,64%) siendo el de mayor frecuencia (Ayala, 2011). A pesar de esto, sus variantes no fueron determinadas de modo que sugiere un estudio más amplio de este gen prevalente en la ciudad.

## **2.2 MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*.**

#### **2.2.1.1 Generalidades**

El género *Pseudomonas* clasificado en orden de *Pseudomonales* y familia *Pseudomonaceae* (Brenner, Krieg, & Staley, 2005) comprende un grupo heterogéneo de varias especies que se encuentran distribuidos en suelo, plantas, agua y tienen en común ser microorganismos no fermentadores (Kasper et al., 2016). Dentro de este grupo destaca *Pseudomonas aeruginosa*, bacilo Gram negativo, móvil, aerobio estricto, oxidasa positivo cuyo crecimiento óptimo es de 37°C a 42°C pero puede crecer a partir de los 4°C y sobrevivir con escasos nutrientes (Ochoa et al., 2013).

*Pseudomonas aeruginosa* es considerado el patógeno oportunista más representativo del género debido a que causa infecciones en personas con una baja inmunidad (Murray et al., 2014) gracias a su gran capacidad de desarrollar biopelículas, las cuales están adheridas a una matriz extracelular formada por pili, membrana externa, exopolisacáridos y ácidos nucleicos (Ryder, Byrd, & Wozniak, 2007). Estas características le permiten una fácil adherencia a equipos médicos y otras superficies hospitalarias (Ochoa et al., 2013).

### 2.2.1.2 Epidemiología

*Pseudomonas aeruginosa* se encuentra ampliamente distribuido en diversos ambientes, en especial los húmedos. Es uno de los patógenos de mayor relevancia en pacientes inmunocomprometidos (Silby et al., 2011), principalmente en UCI y unidades de críticos oncohematológicos (Fariñas & Martínez, 2013). Esta condición se ve incrementada por su ubicuidad y su gran habilidad de colonizar ambientes extra e intrahospitalarios (Nicolau & Oliver, 2010) teniendo como reservorio cualquier tipo de fómite (Rivera et al., 2008). Aunque no se considera microbiota del cuerpo humano se lo puede encontrar colonizando el tracto gastrointestinal, respiratorio y piel en pacientes hospitalizados (Oliver et al., 2017).

Las infecciones asociadas con este microorganismo generalmente incluyen bacteriemias, infecciones quirúrgicas, urinarias y principalmente NAV y TAV (Varón et al., 2016). *Pseudomonas aeruginosa* también puede causar neumonía asociada a la comunidad, foliculitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, queratitis y endoftalmitis (Oliver et al., 2017). Un grupo vulnerable son los pacientes con fibrosis quística, siendo el principal causante del incremento de la morbimortalidad (Ossa et al., 2014; Mustafa et al., 2016).

El aspecto más preocupante de *P. aeruginosa* es la creciente prevalencia de infecciones provocadas por cepas MDR, XDR e incluso PDR (Oliver, 2017) a manera de clones de alto riesgo distribuidos en varios hospitales en todo el mundo siendo ST235, ST111 y ST175 los de mayor diseminación (Oliver et al., 2017). En Sudamérica, el porcentaje de aislados con resistencia a imipenem y meropenem es de 17% y 19% en Colombia, 66% y 67% en Perú, 33% y 37% en Argentina y 21% y 27% en Ecuador. (Labarca, Salles, Seas, & Guzmán-Blanco, 2016).

### **2.2.1.3 Infecciones Asociadas a la Atención en Salud**

Una IAAS se define como una condición localizada o sistémica en la que el paciente contrae una infección dentro del ambiente hospitalario o centro sanitario, la cual no padecía o tampoco se encontraba en periodo de incubación al momento de su ingreso (OMS, 2015). Estas constituyen una importante causa de mortalidad y morbilidad sobre todo en países emergentes (Galván, Castañeda, Galindo, & Morales, 2017).

En Europa se estima que las IAAS afectan a 1 de cada 20 pacientes hospitalizados y en Norteamérica se calculan unas 220.000 infecciones anuales (OPS, 2012). Sin embargo, la realidad de América Latina es otra, ya que no todos los países presentan datos de vigilancia epidemiológica ni elaboran programas de prevención y control de las IAAS o simplemente los poseen de manera deficiente a pesar de que se conoce del impacto clínico que tienen dentro del ámbito hospitalario (OPS, 2011). Se estima que más del 40% de los pacientes hospitalizados desarrollan una IAAS (Khan, Ahmad, & Mehboob, 2015).

*Pseudomonas aeruginosa* cumple un rol protagonista en IAAS ya que es responsable de aproximadamente el 11% (Bălăşoiu et al., 2014). En Latinoamérica se estima que este microorganismo es responsable del 26% de estas infecciones, porcentaje alto en comparación al 17% de Europa y 13% de Norteamérica (Vincent et al., 2009). En Ecuador son escasos los reportes sobre la frecuencia de IAAS en base a los patógenos más prevalentes del país. Sin embargo, un estudio realizado en el Hospital Carlos Andrade Marín de la ciudad de Quito asegura que el 7% de las IAAS en UCI son provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Jiménez, 2013).

### **2.2.1.4 Tratamiento**

El elevado nivel de resistencia intrínseca en *Pseudomonas aeruginosa* compromete la terapia antimicrobiana. Es por eso que el tratamiento se basa principalmente en el uso de

antibióticos betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Endimiani et al., 2006). Además, la adquisición de nuevos mecanismos de resistencia facilita su capacidad devastadora y supone un desafío mayor a la hora de manejar estas infecciones (Fariñas & Martínez, 2013).

La presencia de la enzima BLEE tipo GES constituye otro problema al momento de manejar infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. Su actividad de betalactamasa de espectro extendido afecta a cefalosporinas de tercera generación y aztreonam (López et al., 2015) quedando como opción terapéutica las de cuarta generación principalmente cefepime y combinaciones de agentes betalactámicos como piperacilina/tazobactam (Tamma & Rodríguez-Baño, 2017). Los carbapenémicos también son una alternativa, no obstante, 12 de las 33 variantes GES poseen actividad carbapenemasa (Naas et al., 2017) lo que limita la terapia antimicrobiana casi en su totalidad a manera de aislados solo sensibles a colistín (Da Fonseca et al., 2007; Viedma et al., 2009). Sin embargo, condicionar al uso de carbapenémicos y colistín constituye un riesgo por el efecto nefrotóxico que pueden provocar estos antibióticos (Gómez, García, & Hernández, 2015).

De igual manera, la combinación de varios agentes antimicrobianos como parte de la terapia tampoco supone una verdadera opción terapéutica (Fariñas & Martínez, 2013) que la observada con un tratamiento en monoterapia de un antibiótico al que *Pseudomonas aeruginosa* sea sensible (Peña et al., 2013). Por lo que, el uso de cefepime, aztreonam y piperacilina/tazobactam en base a la CMI obtenida pueden ser una alternativa para tratar infecciones por bacterias productoras de BLEE; ya que no existen suficientes estudios para indicar o contraindicar el uso de estos antibióticos (Tamma & Rodríguez-Baño, 2017).

Por lo tanto, un tratamiento más efectivo también dependerá del tipo de infección y la carga bacteriana (Tamma & Rodríguez-Baño, 2017) y puede involucrar nuevas

combinaciones de agentes betalactámicos como ceftolozano/tazobactam y ceftazidima/avibactam debido a su mayor actividad frente a cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de clase A (Martínez, 2016). Sin embargo, en el cuadro nacional de medicamentos básicos solo están presentes betalactámicos como ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem y piperacilina/tazobactam para uso parenteral y no las nuevas moléculas que se están utilizando para cepas con fenotipos MDR o XDR en *Pseudomonas aeruginosa* (MSP, 2013).

### **2.2.2 $\beta$ -lactamasas.**

Las betalactamasas son enzimas de origen bacteriano que tienen la capacidad de inactivar los antibióticos betalactámicos, razón por la cual es considerado uno de los principales mecanismos de resistencia antibiótica (Bălăsoiu et al., 2014). Su mecanismo de acción consiste en romper el puente amida del anillo betalactámico para de esta manera inactivar el antibiótico evitando su unión a las PBP del patógeno (Morejón, 2013). Ambler clasificó a las betalactamasas en base a la homología proteica siendo las de clases A, C y D de tipo serín proteasas mientras que las de clase B dependientes de zinc (Jeon et al., 2015). En *Pseudomonas aeruginosa* se han descrito múltiples genes codificantes de resistencia para todo tipo de betalactamasas: metaloenzimas VIM-2 con actividad carbapenemasa (Mavroidi, 2000), carbapenemasas de tipo KPC (Nicolau & Oliver, 2010) y oxacilinasas tipo OXA-40 (Sevillano, Gallego, & García-Lobo, 2009).

#### **2.2.2.1 Variante GES**

Según la clasificación de Ambler, las BLEE tipo GES pertenecen a un subgrupo de 4 variantes de las betalactamasas clase A y se las encuentra principalmente en *Pseudomonas aeruginosa* (Maurya et al., 2014). Esta enzima es codificada por el gen *bla*<sub>GES</sub> descrita en genes *cassette* asociado a estructuras genéticas denominadas integrones de clase 1 o 3 en

plásmidos con diferentes tipos de replicasas (Bonnin, Docobo, Poirel, Villegas, & Nordmann, 2014; Cuzon et al., 2016). Miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y el género de *Pseudomonas* portan plásmidos que pertenecen a más de 30 grupos de Inc (incompatibilidad) y 4 de estos grupos (IncP, W, N y Q) pueden transferirse y mantenerse en estos microorganismos (Popowska & Krawczyk-Balska, 2013).

La BLEE tipo GES no es tan frecuente en relación a otras carbapenemasas (Polotto et al., 2012; Campana et al., 2017), no obstante, se han descrito 33 variantes a nivel mundial (Naas et al., 2017). Esta enzima otorga resistencia a penicilinas, cefalosporinas especialmente ceftazidima y aztreonam (López et al., 2015) pero es inhibida por el tazobactam (Moreno, 2013), ácido clavulánico (Malhotra, Walia, Aslam, & Goyal, 2012) y no por el EDTA (Navarro, Calvo, Cantón, Fernández, & Mirelis, 2011). Ciertas variantes tienen la capacidad de hidrolizar carbapenémicos GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-13, GES-14, GES-15, GES-16, GES-18, GES-20, GES-21 y GES-24 (Naas et al., 2017) mediada por la presencia de asparagina o serina en la posición 170 (Walther & Hoiby, 2007; Cuzon et al., 2016).

Otras variantes como GES-4, GES-5, GES-6 y GES-11 tienen la habilidad de hidrolizar el cefoxitin, GES-9 y GES-14 el aztreonam (Cuzon et al., 2016) y GES-5 el imipenem de manera más eficiente en relación a las otras variantes con actividad carbapenemasa (Bae et al., 2007). Sin embargo, la actividad hidrolítica de las variantes GES-25, GES-26, GES-27, GES-28, GES-29, GES-30, GES-31, GES-32 y GES-33 no ha sido determinada (Naas et al., 2017).

#### **2.2.2.2 Métodos de identificación de enzima BLEE tipo GES**

La detección de enzimas BLEE por pruebas fenotípicas comúnmente utilizadas con cefalosporinas de espectro extendido y ácido clavulánico se realizan únicamente en

enterobacterias (CLSI, 2017; EUCAST, 2017). Esto se debe a que las pruebas de sinergia de doble disco son más sensibles y específicas en este tipo de bacterias (Weldhagen, Poirel, & Nordmann, 2003). Estas dificultades al momento de detectar BLEE en *Pseudomonas aeruginosa* se deben a factores como la presencia de una cefalosporinasa tipo AmpC, MBLs y una combinación de mecanismos de resistencia tales como impermeabilidad y bombas eflujo (Laudy et al., 2017).

- **Métodos fenotípicos:** no existe un método estandarizado para la detección de BLEE en *Pseudomonas aeruginosa* (Lin et al., 2012). Sin embargo, la sinergia de doble disco entre imipenem y ceftazidima con una distancia de 15 a 20 mm puede ser utilizado para identificar BLEE tipo GES, PER y VEB (WHONET, 2017). Este método posee mejor desempeño frente a la sinergia entre cefalosporinas de espectro extendido más ácido clavulánico. A pesar de esto, la sinergia puede verse opacada en algunos casos por el efecto inductor del imipenem en la hiperexpresión de la cefalosporinasa cromosómica resultando en un antagonismo entre ambos antibióticos (Weldhagen et al., 2003; Piersigilli et al., 2009). Este efecto puede evitarse al adicionar oxacilina al medio, ya que inhibe la actividad de la AmpC (Laudy et al., 2017).

- **Métodos moleculares:** la determinación molecular de la enzima GES comúnmente se realiza mediante la amplificación del gen *bla*<sub>GES</sub> ubicado en la región variable de los integrones de clase 1 y 3 mediante la PCR de punto final (Guevara, Sierra, & Waard, 2012). Posterior a la amplificación, la secuenciación es utilizada para la determinación de variantes GES ya tiene como finalidad determinar el orden de los nucleótidos de un determinado segmento de ADN (Krebs, Goldstein, & Kilpatrick, 2014). De esta manera se puede determinar las variantes GES mediante la homología de las cadenas nucleotídicas o aminoacídicas en relación a secuencias subidas al *GenBank* (Kiratisin, Apisarntharak, Laesripa, & Saifon, 2008) o a través de la identificación de sitios polimórficos.

### 2.2.3 Mecanismos de resistencia.

#### 2.2.3.1 Mecanismos de resistencia intrínsecos

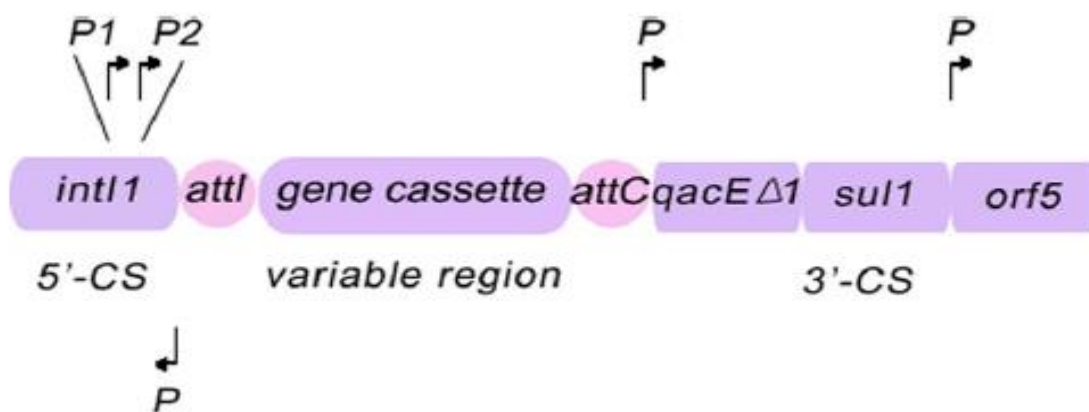
La resistencia intrínseca de *Pseudomonas aeruginosa* está determinada por varios mecanismos enzimáticos y no enzimáticos descritos a continuación:

- **Impermeabilidad de la membrana externa:** este tipo de mecanismo no enzimático es importante en la resistencia antibiótica porque limita el ingreso de pequeñas moléculas hidrofílicas y excluye a las más grandes, es por eso que algunos antibióticos betalactámicos y quinolonas pueden atravesar la membrana mediante canales constituidos de proteínas denominadas porinas (Luján, 2014). La OprD es una proteína que permite el ingreso de carbapenémicos, por lo que un déficit o pérdida de esta porina contribuye a la resistencia a estos antimicrobianos y en donde imipenem es el más afectado (Fariñas & Martínez, 2013).
- **Sistemas de expulsión:** este es otro mecanismo no enzimático y denominado también como bombas de eflujo porque se combinan con porinas para la expulsión inmediata del antimicrobiano. En *Pseudomonas aeruginosa* se han descrito 12 bombas de eflujo pero no todas son de relevancia en la resistencia antibiótica (Luján, 2014; WHONET, 2017). De ahí que dependiendo de la bomba implicada puede llegar a afectar a todos los antibióticos betalactámicos (excluyendo imipenem), fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Nicolau & Oliver, 2010), siendo MexAB-OprM y MexXY-OprM los principales sistemas que participan en la resistencia natural y adquirida por este mecanismo (Vila & Marco, 2010).
- **Betalactamasas cromosómicas:** la resistencia mediada por este mecanismo enzimático se debe a la presencia de 3 betalactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* (Oliver et al., 2017). Una cefalosporinasa inducible tipo AmpC que puede presentar múltiples mutaciones en su sistema regulador provocando una hiperexpresión de esta enzima

confiriendo resistencia a piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepime y aztreonam (Nicolau & Oliver, 2010; Vila & Marco, 2010). Una oxacilinas denominada POX-B u OXA-50 que presenta una baja actividad a los betalactámicos cuando no está hiperexpresada, siendo meropenem y doripenem los más afectados (Girlich, Naas, & Nordmann, 2004). Finalmente se ha descrito una imipenemasa denominada PIB con efecto sobre el imipenem (WHONET, 2017).

### 2.2.3.2 Mecanismos de resistencia adquiridos

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria capaz de adquirir nuevos genes de resistencia por transferencia horizontal en forma de *cassettes* genéticos dentro de estructuras denominadas integrones (Figura 1) y que a su vez están localizados en elementos móviles como transposones y plásmidos (Nicolau & Oliver, 2010; Luján, 2014).



**Figura 1. Representación esquemática del integrón de clase 1.** Promotor P1 para la transcripción de *cassettes* génicos. Promotor P2 que es un gen inactivo. Integra *attI* región variable donde se ubica el gen *cassette*. Región *qacE* gen parcialmente eliminado que codifica el compuesto de amonio cuaternario de resistencia. Gen *sul1* que otorga resistencia a sulfonamidas. Gen *orf5* con función desconocida. Promotores P de los genes *qacE Δ* y *sul1*. Secuencia *attC* en el gen *cassette* reconocido por la integrasa. Adaptado de “Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons” por Deng et al., 2017, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14, p. 2. Copyright 2018.

Estos determinantes de resistencia generalmente involucran betalactamasas de espectro extendido clase A, metalo  $\beta$ -lactamasas clase B y oxacilinasas clase D (Estepa et al., 2017).

En la tabla 1 se pueden observar las enzimas, según la clasificación de Ambler, generalmente encontradas en aislados de *Pseudomonas aeruginosa*.

**Tabla 1.**

*Clasificación de enzimas adquiridas comúnmente descritas en Pseudomonas aeruginosa.*

CLASE	ENZIMAS
A	PER, VEB, GES, BEL, PME, KPC
B	VIM, IMP
D	OXA-2, OXA-10

*Fuente:* Oliver et al., 2017 *Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A

Los integrones son elementos genéticos que permiten una eficiente captura y expresión de genes exógenos a manera de *cassettes* y cumplen un rol importante en la resistencia antibiótica particularmente de Gram negativos (Gillings, 2014). Su estructura está definida por una integrasa (*intI*), un sitio proximal de recombinación (*attI*) y un promotor Pc (Xu, Li, Shi, & Shirliff, 2012). La secuencia aminoacídica de la integrasa permite clasificar a los integrones en tres tipos *intI1* como “clase 1”, *intI2* como “clase 2” e *intI3* como “clase 3” y que han sido asociados con elementos genéticos móviles (Deng et al., 2015).

La función de estos integrones es la diseminación de resistencias antibióticas mediante su asociación a plásmidos o transposones en forma de *cassettes* y constituyen los principales vectores de multirresistencia en Gram negativos (Cambray, Guerout, & Mazel, 2010). Los integrones de clase 1 han sido estudiados e identificados en varios microorganismos incluyendo bacterias del género *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* (Deng et al., 2015).

El gen *bla*<sub>GES</sub> ha sido asociado con integrones de clase 1 o 3 (Cuzon et al., 2016). Los integrones de clase 1 han sido ampliamente descritos en *Pseudomonas aeruginosa* (Nicolau & Oliver, 2010) principalmente en clones de alto riesgo ST235 que constituyen cepas con un fenotipo MDR/XDR y que se encuentran ampliamente distribuidos a nivel mundial (Oliver et al., 2017). Además, se ha encontrado que este tipo de integrones albergan genes codificantes de enzimas modificantes de aminoglucósidos confiriendo resistencia a estos antibióticos (Estepa et al., 2017).

## 2.3 MARCO CONCEPTUAL

**Cassette cromosómico.-** Molécula de ADN que se encuentra incorporado en un cromosoma como resultado de una recombinación en un lugar secundario, esta posee uno o más genes de interés relacionados generalmente con resistencia antibiótica (Bonnin et al., 2014).

**Citrato.-** Medio de citrato de Simmons, su sustrato es el citrato de sodio y es utilizado en pruebas bioquímicas de metabolismo de carbohidratos y ácidos orgánicos en identificación bacteriana (UNAM, n.d.).

**CMI.-** Concentración Mínima Inhibitoria, es el término utilizado en microbiología que indica la concentración más baja de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano posterior a su incubación (Taroco, Seija, & Vignoli, 2008).

**Error mayor.-** Este ocurre cuando un microorganismo es susceptible por el método de referencia pero es categorizado como resistente por el método alternativo (Torres, Villanueva, & Bou, 2009)

**Error menor.-** Este ocurre cuando un microorganismo es susceptible o resistente por el método de referencia pero intermedio por el método alternativo y/o cuando muestra resistencia intermedia por el método de referencia pero es susceptible o resistente por otros métodos (Torres et al., 2009).

**Escala de McFarland.-** Solución líquida estándar para ajustar la turbidez de una suspensión bacteriana y controlar el número de bacterias. Se lo utiliza principalmente para susceptibilidad antimicrobiana (MDM, 2017).

**MDR.-** Es un término usado para referirse a cepas bacterianas que al ser sometidas a pruebas de susceptibilidad antimicrobiana presentan resistencia ante al menos 3 familias de antibióticos que tienen significancia clínica y epidemiológica (Magiorakos et al., 2012).

**MR-VP.-** Rojo de Metilo y Vogues Proskauer es un caldo que posee como sustrato la glucosa y es utilizado en pruebas bioquímicas de metabolismo de carbohidratos y ácidos orgánicos para identificación bacteriana (UNAM, n.d.).

**PBP.-** Es una proteína que participa en la etapa de transpeptidación en la síntesis de peptidoglicano de las bacterias (Gómez et al., 2015).

**PDR.-** Es un término usado para referirse a cepas bacterianas que al ser sometidas a pruebas de susceptibilidad antimicrobiana presentan resistencia a todas las familias antibióticas. (Magiorakos et al., 2012).

**Plásmido.-** Fragmento circular de DNA bicatenario de longitud variable que posee generalmente genes de resistencia y tiene la capacidad de replicarse de manera autónoma (Marsili, 2015). }

**PCR.-** Reacción en Cadena de la Polimerasa, es una reacción enzimática que tiene como objetivo amplificar exponencialmente una secuencia de DNA determinada (Krebs et al., 2014).

**Primers.-** Cebador o iniciador, es una secuencia corta de nucleótidos de donde el ADN polimerasa inicia la síntesis de una nueva cadena de ADN en base a una cadena molde (Krebs et al., 2014).

**Resistencia antibiótica.-** Mecanismo intrínseco o adquirido de un microorganismo que le permite permanecer refractario de manera parcial o total ante la acción bactericida o bacteriostática de un antibiótico (CDC, 2018).

**Secuenciación.-** Métodos y técnicas bioquímicas que determinan el orden de los nucleótidos de un determinado segmento de ADN (Krebs et al., 2014).

**SIM.-** Sulfhídrico Indol Motilidad, medio semisólido que tiene como sustratos el tiosulfato o grupos –SH de la cisteína y triptófano y es utilizado en pruebas bioquímicas de metabolismo de carbohidratos y ácidos orgánicos para identificación bacteriana (UNAM, n.d.).

**Transposón.-** Denominado también elemento genético transponible, es una secuencia de ADN que tiene la capacidad de moverse a distintas partes del genoma de manera autónoma y autoreplicarse en el mismo (Krebs et al., 2014).

**TSI.-** Agar triple azúcar de hierro, medio sólido que posee como sustratos el tiosulfato o grupos –SH de la cisteína y triptófano, además de glucosa, lactosa y sacarosa. Se utiliza en pruebas bioquímicas de metabolismo de carbohidratos y ácidos orgánicos para identificación bacteriana (UNAM, n.d.).

**Urea.-** Medio sólido o líquido que tiene como sustrato la urea y es utilizado en pruebas bioquímicas de metabolismo de carbohidratos y ácidos orgánicos para identificación bacteriana (UNAM, n.d.).

**XDR.-** Es un término usado para referirse a cepas bacterianas que al ser sometidas a pruebas de susceptibilidad antimicrobiana presentan resistencia a casi todas los antimicrobianos pero presentan sensibilidad a una o dos familias antibióticas (Magiorakos et al., 2012).

## CAPÍTULO III

### 3.1 MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1.1 Tipo de estudio.

El presente estudio es de tipo descriptivo y transversal. Descriptivo ya que evaluó la presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo GES cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de aislados clínicos de cuatro hospitales de la ciudad de Quito que fueron referidas al INSPI a través del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos como parte de la Red de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana durante el periodo de enero a diciembre de 2016. Además, esta investigación es de tipo transversal porque la información se recolectó en un periodo de tiempo determinado.

#### 3.1.2 Tipo de muestreo.

Se llevó a cabo un muestreo no probabilístico por conveniencia bajo criterios establecidos por los investigadores.

### 3.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

**Tabla 2.**

*Operacionalización de variables*

Objetivos	Variable	Concepto	Categoría	Naturaleza y escala de dimensión	Indicador	Técnica	Instrumento de Medida
Determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiano en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Susceptibilidad antimicrobiana por difusión de disco	Comportamiento fenotípico de un microorganismo ante una dosis conocida de antibiótico (Murray et al., 2014).	Sensible Intermedio Resistente	Cualitativa ordinal	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Método de Kirby Bauer	Halo de inhibición
	Susceptibilidad antimicrobiana por CMI					CMI	Sistema automatizado <i>Vitek 2</i>
Detectar la presencia de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo GES en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Fenotipo de enzima GES	Enzima codificada por el gen <i>bla<sub>GES</sub></i> encontrada en el gen “ <i>cassette</i> ” dentro de estructuras genéticas llamadas integrones (Bonnin et al., 2014) que confiere resistencia antibiótica contra penicilinas, cefalosporinas, ceftazidima y el aztreonam (López et al., 2015).	Presencia Ausencia	Cualitativa nominal	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Método de Kirby Bauer	Halo de inhibición

Identificar molecularmente variantes de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo GES en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Gen codificante de enzima GES	Denominado gen <i>bla</i> <sub>GES</sub> , secuencia genética codificante para enzima BLEE tipo GES (Bonnin et al., 2014)	<i>bla</i> <sub>GES-1</sub> a <i>bla</i> <sub>GES-33</sub> (Excepto variantes <i>bla</i> <sub>GES-19</sub> y <i>bla</i> <sub>GES-20</sub> ).	Cualitativa nominal	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Secuenciación de tipo Sanger	Secuenciación
--	-------------------------------	---	--	---------------------	------------------------------------	------------------------------	---------------

<b>Objetivos</b>	<b>Variable</b>	<b>Concepto</b>	<b>Dimensión</b>	<b>Naturaleza y escala de dimensión</b>	<b>Indicador</b>	<b>Técnica</b>	<b>Instrumento de Medida</b>
Determinar la frecuencia de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo GES en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Edad	Tiempo de vida de un individuo medido en años, meses y días.	Recién Nacido Pediátrico Adulto Geriátrico	Cualitativa ordinal	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Revisión documental	Registros de pedidos
	Género	Conjunto de características físicas, biológicas y anatómicas de los seres humanos, que los definen como hombre o mujer.	Masculino Femenino	Cualitativa nominal	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Revisión documental	Registros de pedidos
	Hospital	Establecimiento que tiene como objetivo brindar servicio médico y en el cual también se realiza investigación.	H001 H002 H003 H004	Cualitativa nominal	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Revisión documental	Registros de pedidos
	Servicio	Áreas donde se desarrollan las actividades médicas y de enfermería encaminadas al tratamiento y recuperación de la salud del paciente hospitalizado, organizado por áreas de especialidad y	Cardiororácica Cirugía general Cirugía plástica Cirugía vascular Consulta externa Emergencia Gastroenterología Medicina interna	Cualitativa nominal	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Revisión documental	Registros de pedidos

cuidados médicos.

Neurocirugía  
Neurología  
Oncología clínica  
Traumatología  
UCI  
Unidad de quemados  
Urología

Objetivos	Variable	Concepto	Dimensión	Naturaleza y escala de dimensión	Indicador	Técnica	Instrumento de Medida
	Tipo de muestra	Proveniencia de la muestra clínica.	Catéter Esputo LBA Líquido ascítico Líquido pleural Mano Orina Piel Sangre Secreción	Cualitativa nominal	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Revisión documental	Registros de pedidos
	Variantes GES	Variabilidad en uno o más bases nitrogenadas en la secuencia del gen <i>bla<sub>GES</sub></i> (Cuzon et al., 2016).	<i>bla<sub>GES</sub>-1</i> a <i>bla<sub>GES</sub>-33</i> (Excepto variantes <i>bla<sub>GES</sub>-19</i> y <i>bla<sub>GES</sub>-20</i> ).	Cualitativa nominal	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Revisión documental	Registro de resultados

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A

### **3.3 FASES DE ESTUDIO**

#### **3.3.1 Fase I: Autorizaciones y permisos.**

Para el inicio de la investigación se requirió de un acuerdo de entendimiento entre los investigadores y el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI-Quito. Posteriormente se contó con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos (CEISH-PUCE) para garantizar que el estudio se ejecute bajo normas bioéticas en ciencia (Anexo 1). Finalmente se obtuvo la autorización por parte de la unidad académica de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

#### **3.3.2 Fase II: Recolección de datos.**

Para este estudio se seleccionó 55 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de aislados clínicos de cuatro hospitales de la ciudad de Quito y que fueron referidas al INSPI a través del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos como parte de la Red de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana durante el periodo de enero a diciembre de 2016. Las cepas seleccionadas contaron con los siguientes criterios: reportadas con sinergia previa ceftazidima e imipenem, que en el registro conste la información completa de las variables epidemiológicas y que provenga de un aislado clínico por paciente.

#### **3.3.3 Fase III: Análisis microbiológicos.**

##### **3.3.3.1 Control de calidad**

- Medios de cultivo

La esterilidad de los medios de cultivo agar base sangre, MacConkey y Mueller Hinton fue evaluada al incubar el 5% de los medios preparados a 37°C por 24 horas (Anexo 2).

La selectividad del medio MacConkey se realizó según la norma ISO/TS11133-2 al inocular una cepa de *Escherichia coli* ATCC® 25922, con el fin de evidenciar crecimiento

de colonias fermentadoras de color rosado, otra cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 para visualizar crecimiento de colonias no fermentadoras con tonalidad verde y una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 para observar ausencia de crecimiento después de 48 horas de incubación a 37°C (Anexo 2).

El control de calidad del agar Mueller Hinton se llevó a cabo bajo los parámetros establecidos por el CLSI (2017). El pH se midió con un pHmetro esperando un resultado dentro de 7.2 – 7.4 en la escala de pH. La profundidad del medio se valoró con un pie de metro para determinar los 4 mm de espesor. Los cationes de calcio y magnesio se controlaron con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 frente al disco de gentamicina (Anexo 2).

- Discos

Los discos utilizados para la prueba de susceptibilidad, especificados en el punto 3.3.3.3, fueron evaluados con cepas de *Escherichia coli* ATCC® 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 en agar Mueller Hinton. El diámetro de inhibición de cada antibiótico frente a cada cepa ATCC® estuvo dentro de los criterios establecidos por el CLSI (2017) (Anexo 3).

- Tarjetas Vitek 2

La tarjeta GN para identificación y AST-N272 para prueba de susceptibilidad antimicrobiana fueron evaluadas frente a suspensiones bacterianas de cepas de *Escherichia coli* ATCC® 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 en solución salina. La funcionalidad de las tarjetas fue establecida mediante la correcta identificación y sensibilidad a todos los antibióticos de ambas cepas ATCC® (Anexo 4).

### **3.3.3.2 Aislamiento e identificación de *Pseudomonas aeruginosa***

Una vez verificado el control de calidad de los medios, las cepas fueron reactivadas en agar base sangre al incubarse por 24 horas a 37°C. Después de evidenciar crecimiento bacteriano, las cepas se reaislaron en agar MacConkey.

El género y especie se identificó de acuerdo al aspecto de las colonias, características microscópicas en tinción Gram, prueba de oxidasa y bioquímicas manuales compuestas por: TSI, urea, citrato, SIM, RM y VP. Las cepas también fueron identificadas por el sistema automatizado *Vitek 2 (Biomerieux)* mediante la tarjeta de identificación GN (Pincus, 2010). Los sustratos analizados se detallan en el Anexo 5.

### **3.3.3.3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana**

La susceptibilidad antimicrobiana fue realizada mediante el método difusión de disco bajo las normas del CLSI (2017). Los antibióticos empleados fueron: gentamicina (10µg), ceftazidima (30µg), cefepime (30µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), ciprofloxacino (5µg), amikacina (30µg), piperacilina/tazobactam (110µg) y aztreonam (30µg).

Otro método utilizado fue el sistema automatizado *Vitek 2* con la tarjeta AST-N272. Para ello se preparó 3ml de suspensión bacteriana a una concentración 0,5 McFarland en solución salina, posteriormente se tomó 145 µl y se diluyó en 3 ml de solución salina para su procesamiento. La CMI se determinó frente a los siguientes antibióticos y concentraciones: amikacina (8, 16 y 64 µg), cefepime (2, 8, 16 y 32 µg), ceftazidima (1, 2, 8 y 32 µg), ciprofloxacino (0.5, 2 y 4 µg), colistín (4, 16 y 32 µg), doripenem (0.25, 0.5, 1 y 4 µg), gentamicina (4, 16 y 32 µg), imipenem (1, 2, 6 y 12 µg), meropenem (0.5, 2, 6 y 12 µg) y piperacilina/tazobactam (2/4, 8/4, 24/4, 32/4, 32/8 y 48/8 µg).

#### **3.3.3.4 Identificación fenotípica de BLEE tipo GES**

La identificación de esta enzima se efectuó mediante la prueba de sinergia de doble disco. Para ello se realizó suspensiones bacterianas en solución salina a una concentración de 0,5 en la escala de McFarland y los discos utilizados fueron imipenem (10µg) y ceftazidima (30µg) a una distancia de 2 cm entre el centro de cada uno de los discos bajo los lineamientos de la Red Whonet Argentina (2017).

### **3.3.4 Fase IV: Análisis molecular.**

#### **3.3.4.1 Control de calidad de la PCR**

El control de calidad de esta técnica se realizó con un control positivo para el gen *bla<sub>GES</sub>* de una cepa caracterizada por el Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos y un control negativo que corresponde a una cepa sin el gen que confiere la resistencia, ambos controles fueron sometidos al protocolo de amplificación especificado en el punto 3.3.4.4. (Anexo 6).

#### **3.3.4.2 Análisis de primers**

Las secuencias forward 5' ATGCGCTTCATTCACGCAC 3' y reverse 5' CTATTTGTCCGTGCTCAGGA 3' descritas en el estudio de Neyestanaki et al., (2014) fueron alineadas con cada una de las 33 variantes del gen *bla<sub>GES</sub>* obtenidas de la base de datos del *GenBank* para evidenciar complementariedad mediante alineamiento con *Clustal W* en el software MEGA7 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016). Posteriormente estos amplicones fueron cortados y alineados entre sí para definir los sitios polimórficos a nivel de secuencia nucleotídica de cada variante del gen en relación a *bla<sub>GES-1</sub>*, con el fin de diferenciar las 33 variantes utilizando la herramienta *Clustal W* en el software MEGA 7.

### 3.3.4.3 Extracción de ADN

Esta fase inició de una alícuota bacteriana obtenida del agar Mueller Hinton suspendida en 500 µl de solución TE 1X. La extracción de ADN se realizó por la técnica de lisado por ebullición en el equipo Thermomixer confort de Eppendorf®. El protocolo consistió en someter a la suspensión bacteriana de dos a tres colonias a una temperatura de 95°C durante 10 minutos, posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 rpm y se almacenó una alícuota de 200 µl del sobrenadante en un tubo Eppendorf® de 1.5 ml a -20°C (Tavajjohi, Moniri, & Khorshidi, 2011).

### 3.3.4.4 Amplificación del gen *blAGES*

El gen fue amplificado con la técnica de PCR de punto final utilizando los primers descritos en el punto 3.3.4.2. La reacción tuvo un volumen final de 25 µl y estuvo conformada por:

**Tabla 3.**

*Componentes de la reacción de PCR*

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración final</b>
<i>GoTaq® Green Master Mix 2X</i>	12 µl	0,96X
Agua molecular	10 µl	N. A
Primer forward 10 µM	1 µl	0.4µM
Primer reverse 10 µM	1 µl	0.4 µM
ADN bacteriano	1 µl	< 250 ng
<b>Volumen final</b>	25 µl	

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A

Las condiciones de la PCR para la amplificación del gen *blag<sub>ES</sub>* fueron las reportadas por Lin, Liu, Lin & Shi (2012) con modificaciones. Esta se realizó en el equipo *BioRad C1000*® bajo las condiciones que se detallan en la tabla 4.

**Tabla 4.**

*Condiciones para la amplificación del gen blag<sub>ES</sub>.*

<b>Procedimiento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b># Ciclos</b>
1. Denaturación inicial	95°C	3 minutos	-
2. Denaturación	95°C	30 segundos	30
3. Hibridación	52°C	30 segundos	-
4. Extensión	72°C	1 minuto	-
5. Extensión final	72°C	5 minutos	-

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con TAE 1X como buffer a 90 V/cm por 40 minutos en la cámara de electroforesis BioRad® Sub Cell Model 96 con una fuente de poder BioRad® Power Pac™ Basic. El gel fue teñido con bromuro de etidio (1mg/ml) y se detectó con un fotodocumentador BioRad® Molecular Imager Gel System.

#### **3.3.4.5 Purificación y secuenciamiento**

Los productos amplificados seleccionados para esta etapa se eligieron en función del perfil de susceptibilidad antimicrobiano buscando las cepas que presenten mayor variabilidad fenotípica frente a los antibióticos evaluados. Por lo tanto, 20 amplicones fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel on PCR Clean up System de Promega como se detalla en el Anexo 7. El proceso de secuenciación fue de tipo Sanger y se realizó en Macrogen Corea.

### **3.3.5 Fase V: Análisis de resultados.**

El análisis de secuencias forward y reverse obtenidas del proceso de secuenciamiento se realizó en el software *Clustal W* incorporado en el programa MEGA 7 para su edición y limpieza con el fin de obtener una secuencia consenso (Kumar et al., 2016). Los resultados se obtuvieron mediante porcentaje de identidad en comparación con secuencias disponibles en la base de genes del *GenBank* utilizando la herramienta BLAST. De igual manera se identificaron las variantes del gen mediante el alineamiento entre las secuencias obtenidas del *GenBank* y consenso para identificar los sitios polimórficos y homología de las cadenas a nivel de secuencia nucleotídica y aminoacídica.

Los análisis estadísticos se tabularon mediante estadística descriptiva para expresar resultados en frecuencias absolutas y relativas. El perfil de susceptibilidad antimicrobiano fue realizado en el software Whonet v2017, Excel 2013 y expresados a través de gráficos de barras. La frecuencia de BLEE tipo GES por hospital, servicio, tipo de muestra, edad, sexo y variante GES fueron obtenidas en el programa SPSS v22 y expresados en diagramas de barras en Excel 2013. Para el cálculo de errores en las categorías clínicas entre el método de difusión de disco y sistema automatizado *Vitek 2* se utilizó un escatograma en el software Whonet v2017.

### **3.3.6 Eliminación de desechos biológicos y tóxicos.**

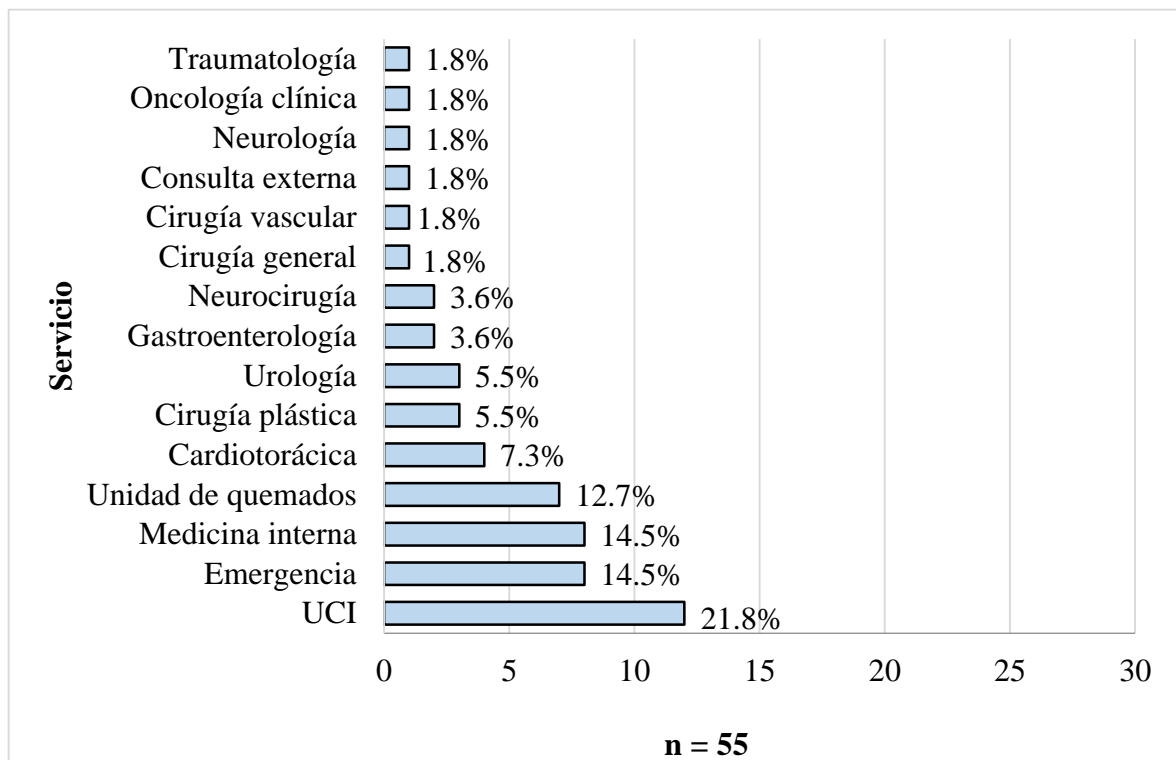
Los desechos biológicos y tóxicos fueron direccionados al departamento de desechos del INSPI. Los desechos bacteriológicos fueron autoclavados y descartados en fundas rojas correctamente rotulados como desechos infecciosos. Los desechos tóxicos con bromuro de etidio fueron eliminados en envases de polipropileno con carbón activado y rotulados como “sustancias químicas peligrosas”. Los dos tipos de desechos fueron entregados a GADERE S.A. para la gestión ambiental de residuos.

## CAPITULO IV

### 4.1 RESULTADOS

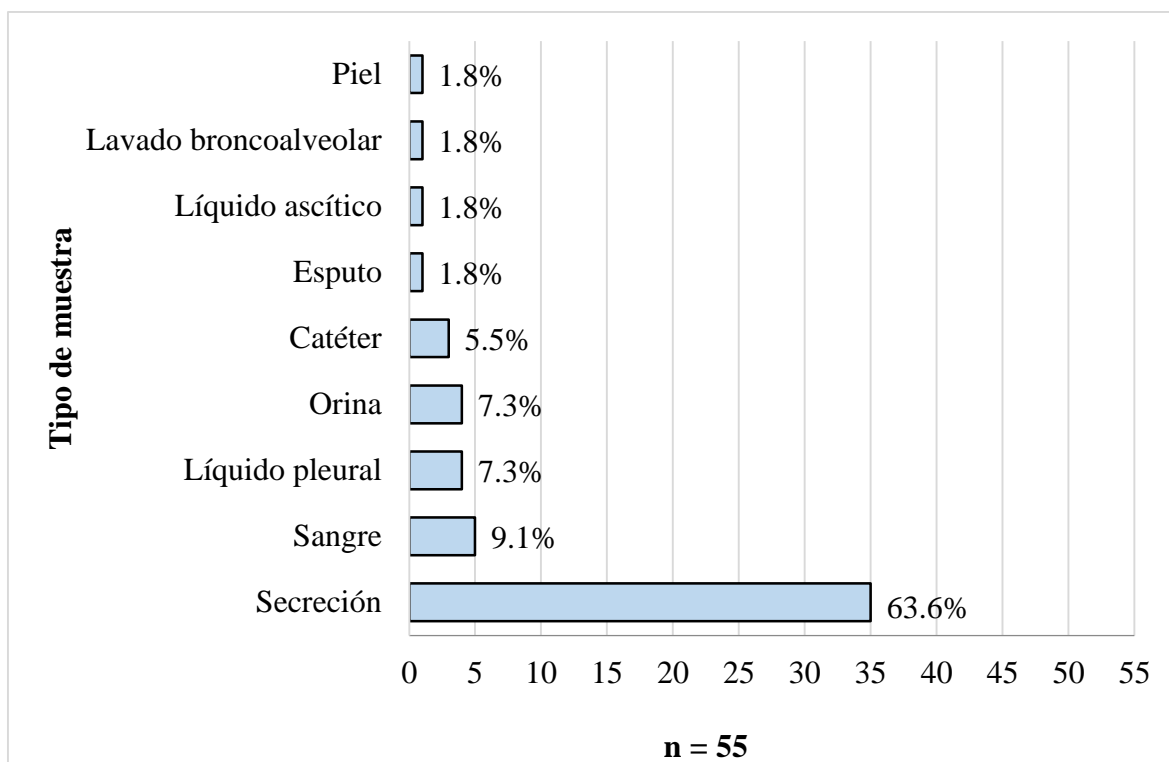
#### 4.1.1 Aislamiento e identificación de *Pseudomonas aeruginosa*.

Todas las cepas fueron viables para el estudio. De las 55 cepas, UCI fue el servicio con mayor número de aislados con 22% (n=12) (Figura 2). En cuanto al tipo de muestra, secreción fue la más frecuente con un 64% (n=35) (Figura 3), siendo secreción traqueal la más predominante (Tabla 5).



**Figura 2. Tipo de servicio del que provienen las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.** En la figura se detalla las variables por tipo de servicio y sus frecuencias absolutas y relativas en base al (n) estudiado.

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A.



**Figura 3. Tipos de muestras clínicas de las que provienen las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.** En la figura se detalla las variables por tipo de muestra y sus frecuencias absolutas y relativas en base al (n) estudiado.

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A.

**Tabla 5.**

*Análisis de frecuencias por tipo de secreción.* La tabla detalla las variables analizadas y las frecuencias absolutas y relativas obtenidas.

Variable	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)
Secreción abdominal	2	5,7
Secreción colostomía	1	2,9
Secreción de cadera	1	2,9
Secreción de herida	5	14,3
Secreción de mano	4	11,5
Secreción de muñón	1	2,9
Secreción de muslo	1	2,9
Secreción de pie	2	5,7
Secreción de úlcera	3	8,6
Secreción desconocida	1	2,9
Secreción óseo isquiático	1	2,9
Secreción por quemadura	3	8,6
Secreción traqueal	10	28,6
Total	35	100

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A

El 65% (n=36) provinieron de pacientes del sexo masculino y principalmente de la población adulta con 95% (n=52). A nivel de hospital se encontró que el 93% (n=51) de las cepas pertenecen al H001 (Tabla 6).

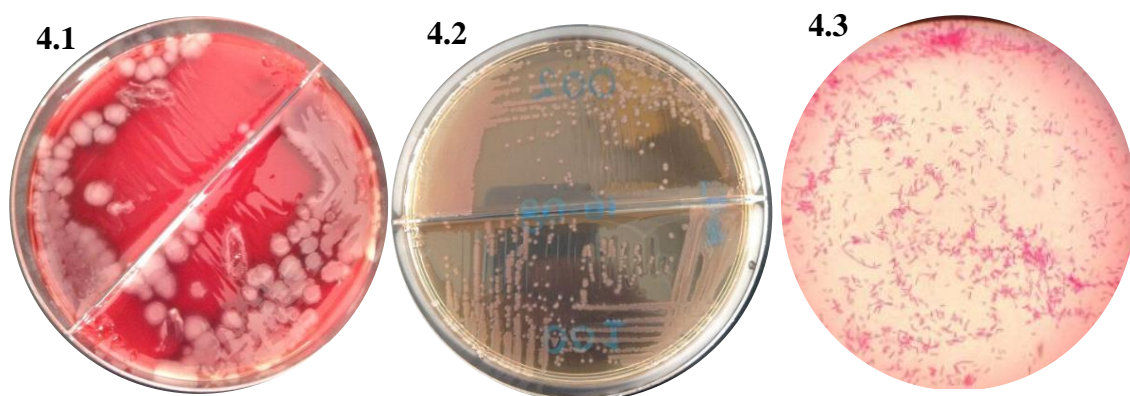
**Tabla 6.**

*Análisis de frecuencias por sexo, edad y hospital. La tabla detalla las variables analizadas y las frecuencias absolutas y relativas obtenidas.*

<b>Variable</b>	<b>Frecuencia absoluta</b>	<b>Frecuencia relativa (%)</b>
Sexo		
Femenino	19	35
Masculino	36	65
Total	55	100
Edad		
Adulto	52	95
Pediátrico	3	5
Total	55	100
Hospital		
H001	51	92,7
H002	2	3,6
H003	1	1,8
H004	1	1,8
Total	55	100

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A.

En agar base sangre se observaron colonias grandes, convexas, con bordes regulares, blanquecinas y de aspecto mucoso (Figura 4.1). En agar MacConkey, las colonias macroscópicamente fueron no fermentadoras, pequeñas, con bordes regulares, convexas y de color beige (Figura 4.2). En la tinción Gram se identificaron bacilos Gram negativos (Figura 4.3) y prueba de oxidasa positiva.



**Figura 4. Características morfológicas de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.** 4.1) Morfología de las cepas en agar base sangre. 4.2) Morfología de las cepas en agar MacConkey. 4.3) Visualización en microscopía óptica con un aumento de 100X.

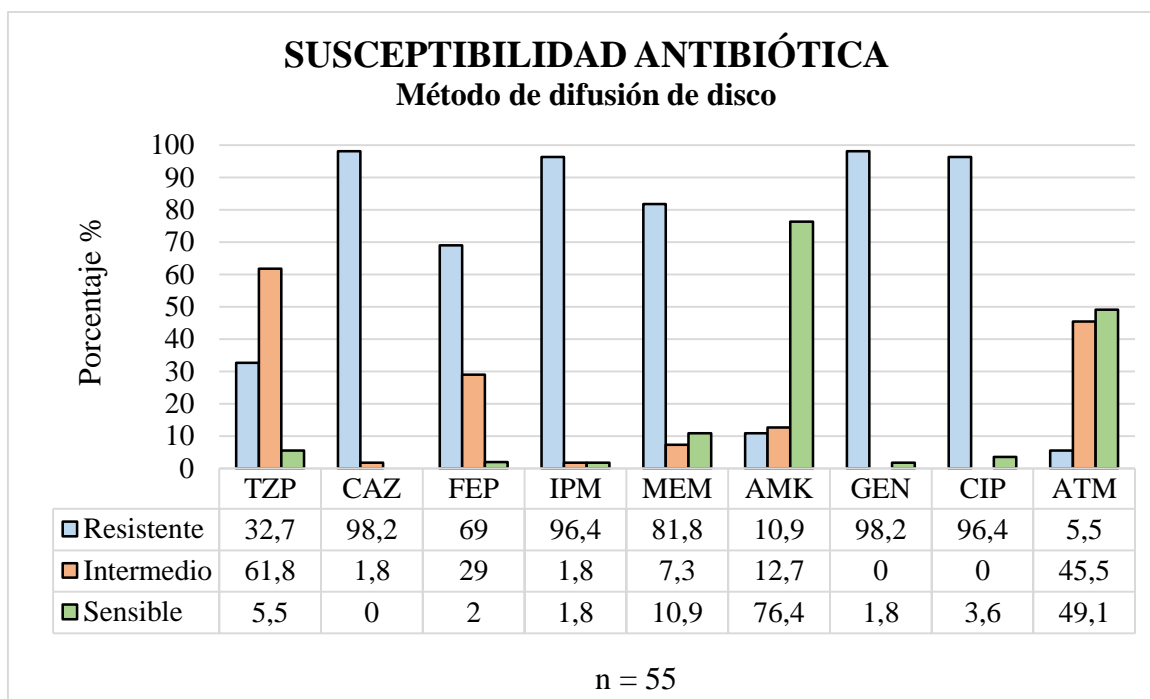
*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A.

La identificación de género y especie se realizó mediante pruebas bioquímicas manuales de metabolismo de carbohidratos y ácidos orgánicos en la que se obtuvo el siguiente patrón bioquímico: urea positivo, citrato positivo, TSI K/K, MR-VP negativo, producción de sulfuro de hidrógeno negativo, indol negativo y motilidad positiva. En el método automatizado *Vitek 2* con la tarjeta GN presentaron un porcentaje de identificación de 99% para *Pseudomonas aeruginosa*.

#### **4.1.2 Evaluación de susceptibilidad antibiótica.**

##### **4.1.2.1 Método de difusión de disco**

En los antibióticos betalactámicos, los carbapenémicos presentaron resistencia de 96% para imipenem y 82% para meropenem; mientras que, el 98% de las cepas manifestaron resistencia a ceftazidima, a diferencia del 69% encontrado en cefepime. De la misma manera se halló resistencia para gentamicina y ciprofloxacino con 98% y 96% respectivamente. Por otro lado, piperacilina/tazobactam tuvo el porcentaje más alto de resistencia intermedia con 62%. Finalmente, los antibióticos con sensibilidad reducida fueron amikacina con 76% y aztreonam con 49%. (Figura 5, Anexo 8).

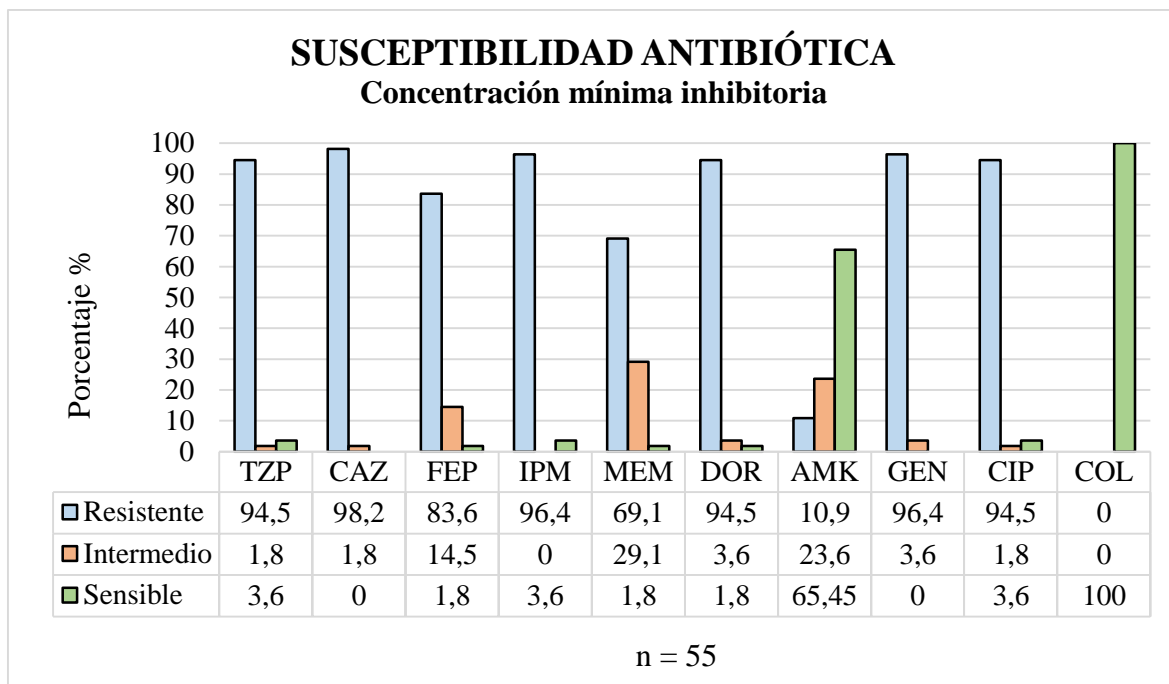


**Figura 5. Perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mediante método de difusión de disco.** La figura indica los porcentajes de resistencia para cada antibiótico por método de difusión de disco. Acrónimos, IPM: imipenem, AMK: amikacina, CAZ: ceftazidima, ATM: aztreonam, TZP: piperacilina/tazobactam, FEP: cefepime, MEM: meropenem, GEN: gentamicina, CIP: ciprofloxacino.

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A

#### 4.1.2.2 Método automatizado Vitek 2

En cuanto a la resistencia, 6 antibióticos mostraron un porcentaje superior al 90% a diferencia de meropenem y gentamicina con valores de 69% y 84% respectivamente. Todas las cepas fueron sensibles a colistín y amikacina mostró sensibilidad reducida con 66%. (Figura 6, Anexo 9).

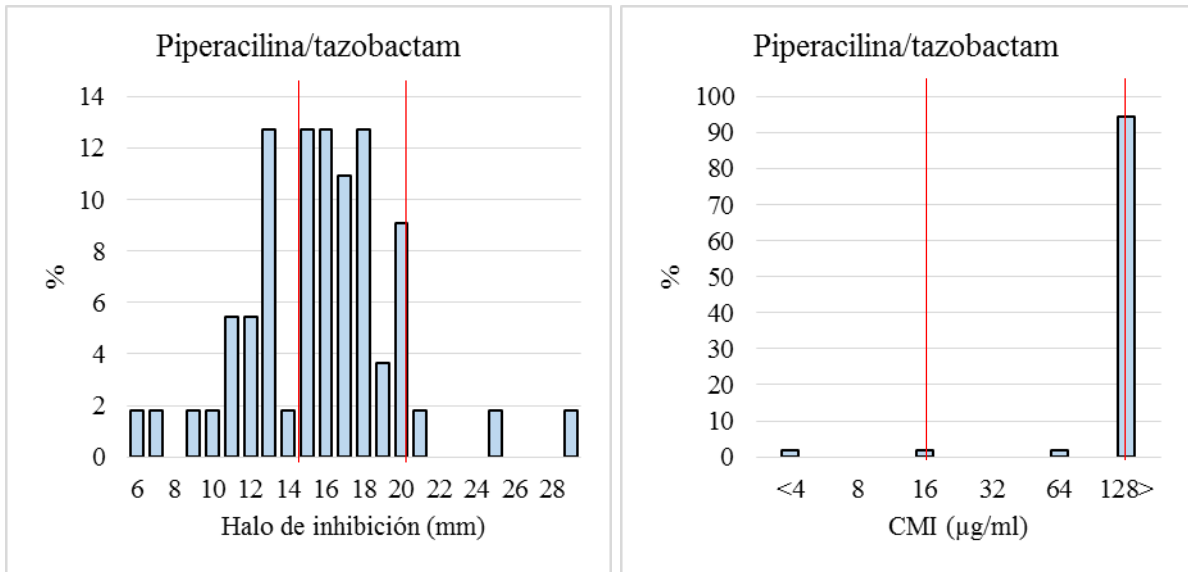


**Figura 6. Perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mediante método automatizado Vitek 2.** La figura indica los porcentajes de resistencia para cada antibiótico. Acrónimos, CIP: ciprofloxacino, COL: colistín, CAZ: ceftazidima, MEM: meropenem, IPM: imipenem, AMK: amikacina, DOR: doripenem, TZP: piperacilina/tazobactam, GEN: gentamicina, FEP: cefepime.

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A.

#### 4.1.2.3 Errores en las categorías clínicas entre método de difusión de disco y Vitek 2

El halo de inhibición se obtuvo por método de difusión de disco y la concentración mínima inhibitoria se determinó por sistema automatizado Vitek 2. Los resultados se pueden observar en la figura 7, en la cual la distribución del (n) se ubica principalmente en las categorías de resistente e intermedio en un rango de 6 a 20 mm para difusión de disco. Mientras que, el método automatizado tiene un valor de CMI con patrón resistente  $>64\mu\text{g/ml}$  en la mayoría de las cepas. Estos errores se representaron mediante un escatograma para el cálculo de errores del sistema automatizado en relación al método de difusión de disco. Piperacilina/tazobactam presentó error mínimo de 60% y error mayor de 1.8% (Figura 8).



**Figura 7. Distribución antibiótica de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* frente a piperacilina/tazobactam mediante método de difusión de disco y Vitek 2.** La figura indica la distribución de las cepas por halo de inhibición y CMI en base a los puntos de corte establecidos por el CLSI 2017.

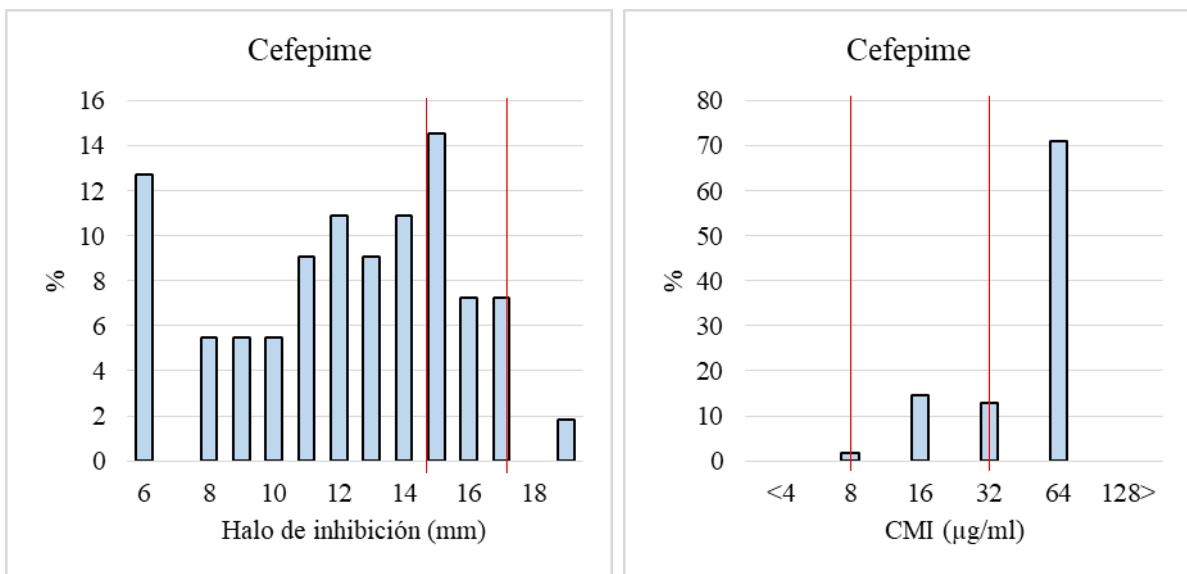
*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A.

	R	32.7%	60%	1.8%
TZP (MIC)	I		1.8%	
	S			3.6%
		R	I	S
		TZP (mm)		

**Figura 8. Errores en las categorías clínicas entre método de difusión de disco y CMI en piperacilina/tazobactam.** La figura indica los porcentajes de error mínimo en el óvalo celeste y error mayor en el óvalo anaranjado mediante un escatograma.

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A.

La distribución antibiótica de cefepime se pueden observar en la figura 9, en la cual la distribución del (n) se ubica principalmente en las categorías de resistente e intermedio en un rango de 6 a 17 mm para difusión de disco. Mientras que, el método automatizado tiene un valor de CMI con patrón resistente >32  $\mu\text{g/ml}$  en la mayoría de las cepas. Estos errores se representaron mediante un escatograma para el cálculo de errores del sistema automatizado en relación al método de difusión de disco. Cefepime presentó un error mínimo de 18.1% (Figura 10).



**Figura 9. Distribución antibiótica de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* frente a cefepime mediante método de difusión de disco y Vitek 2.** La figura indica la distribución de las cepas por halo de inhibición y CMI en base a los puntos de corte establecidos por el CLSI 2017.

R	69.1%	14.5%	
FEP (MIC) I		12.7%	1.8%
S		1.8%	
	R	I	S
	FEP (mm)		

**Figura 10. Errores en las categorías clínicas entre método de difusión de disco y CMI en cefepime.** La figura indica los porcentajes de error mínimo en los óvalos celestes mediante un escatograma.

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A.

#### 4.1.3 Detección fenotípica de BLEE tipo GES

La sinergia de doble disco entre ceftazidima e imipenem fue positiva para 52/55 cepas analizadas (Anexo 10). Esto se demuestra a manera de sinergismo entre los dos antibióticos debido al efecto inhibitor del imipenem frente a la enzima GES permitiendo la acción de la cefalosporina de tercera generación (Figura 11).



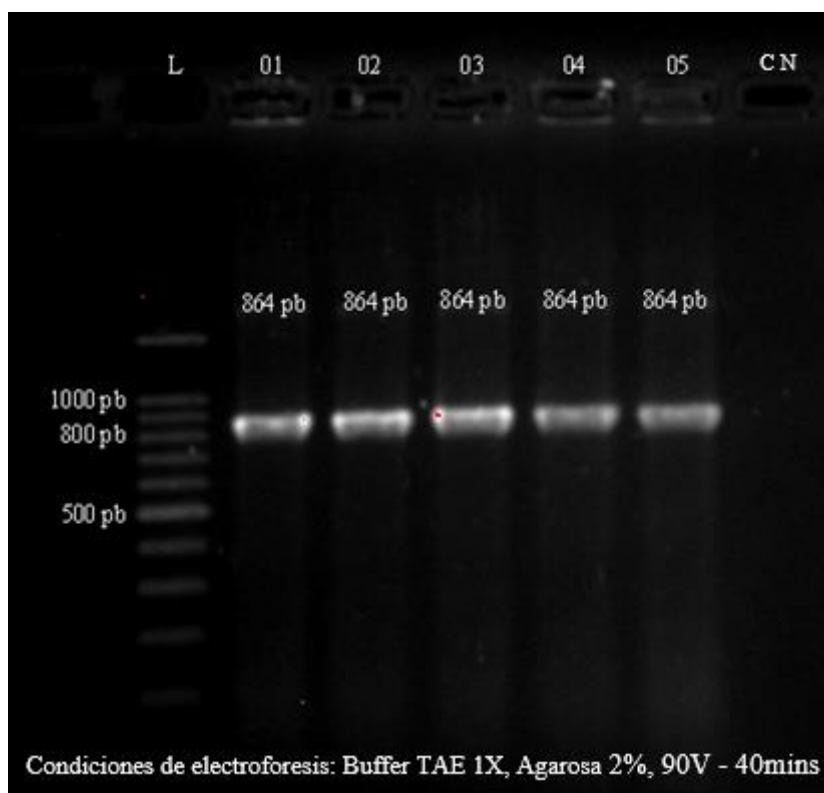
**Figura 11. Sinergia de doble disco entre imipenem y ceftazidima de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.** En la figura se observa sinergia entre el imipenem que actúa como inhibidor de la enzima GES frente a ceftazidima.

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A.

#### 4.1.4 Identificación molecular del gen *bla*<sub>GES</sub>.

##### 4.1.4.1 Amplificación del gen

Según el análisis realizado previo a la amplificación se encontró el tamaño del producto de PCR en 864 pb para el gen *bla*<sub>GES</sub>, el cual fue evidenciado en 54/55 cepas. En la figura 12 se observa la amplificación de 4 cepas según el protocolo establecido. La prueba fenotípica mediante sinergia de doble disco solo pudo identificar 52/54 cepas positivas para el gen (Anexo 10).



**Figura 12. Representación gráfica de la amplificación del gen *bla*<sub>GES</sub> de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.** La figura representa la migración de la amplificación del gen *bla*<sub>GES</sub>. Las muestras en el gel son las siguientes: L: marcador de peso molecular, 01: control positivo, 02, 03, 04, 05: muestras y CN: control negativo.

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A.

#### **4.1.4.2 Análisis de secuencia.**

Los primers forward y reverse tuvieron una alta complementariedad con el gen estudio Anexo 11 y Anexo 12. Se obtuvo un amplicón de 864 pares de bases para 31 de las 33 variantes del gen *bla<sub>GES</sub>*, de esta manera se logró determinar los sitios polimórficos a nivel de secuencia nucleotídica de cada variante del gen en relación a la variante *bla<sub>GES-1</sub>* como se detalla en la figura 13. Las variantes *bla<sub>GES-19</sub>* y *bla<sub>GES-20</sub>* fueron excluidas debido a que su determinación se realiza mediante el análisis con otras técnicas moleculares (Barrios et al., 2012).



De los 20 amplicones purificados y enviados a secuenciar se obtuvo una secuencia consenso en 18 luego de una edición y limpieza en el software MEGA 7. Las 2 restantes no fueron analizadas debido a que no se obtuvo producto secuenciado. De las 18 secuencias, 1 fue identificada *bla*<sub>GES-5</sub> perteneciente al hospital H001 y 17 *bla*<sub>GES-26</sub> provenientes de los hospitales H001, H002, H003 y H004 (Tabla 7). La similitud de las secuencias nucleotídicas también fue confirmada en la plataforma BLAST, en la cual se obtuvo un porcentaje de similitud del 100% con las variantes anteriormente mencionadas.

**Tabla 7.**

*Identificación de las variantes del gen bla<sub>GES</sub> en cepas de Pseudomonas aeruginosa. La tabla detalla el código de la cepa, porcentaje de similitud según BLAST, las mutaciones puntuales y el resultado de la variante obtenida.*

Cepa	% similitud BLAST	Mutaciones puntuales	Resultado	Hospital
GESpae001	100%	493, 591	<i>bla</i> <sub>GES-5</sub>	H001
GESpae002	100%	591	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub>	H001
GESpae009	100%	591	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub>	H001
GESpae011	100%	591	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub>	H001
GESpae015	100%	591	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub>	H001
GESpae016	100%	591	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub>	H001
GESpae018	100%	591	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub>	H001
GESpae026	100%	591	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub>	H001
GESpae028	100%	591	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub>	H003
GESpae031	100%	591	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub>	H001
GESpae032	100%	591	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub>	H001
GESpae037	100%	591	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub>	H002
GESpae044	100%	591	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub>	H001





## CAPÍTULO V

### 5.1 DISCUSIÓN

En el presente estudio, las cepas analizadas provenían en su mayoría de UCI con 22%, similar al estudio de Silva Júnior et al. (2017) y Malkoçoğlu et al. (2017) en donde este servicio fue el de mayor frecuencia con 59% y 45% respectivamente. Un estudio llevado a cabo en un hospital de Quito revela que UCI es el área mayormente afectada por *Pseudomonas aeruginosa* con 41%, seguido de traumatología con 15% (Guano, 2017), dato similar al encontrado en esta investigación con respecto a UCI pero diferente al 2% hallado en traumatología. Por esta razón *Pseudomonas aeruginosa* ocupa un lugar importante dentro de los patógenos nosocomiales debido a que es uno de los principales causantes de IAAS principalmente en UCI (Zaragoza, Ramírez, & López-Pueyo, 2014; Khan et al., 2015).

En esta investigación, medicina interna fue el segundo servicio de mayor frecuencia con 15%. Por el contrario, en el estudio de Estepa et al (2017) los aislados obtenidos de UCI y medicina interna se encontraron en porcentajes bajos con 8% y 5% respectivamente, siendo neumología y cirugía los servicios con mayor número de aislados, ambos con 15%. Estas diferencias se deben a la heterogeneidad de los hospitales incluso dentro de las áreas que los conforman.

Los aislados clínicos de este estudio provinieron principalmente de secreciones con 64% seguido de muestras de sangre con 9% y orina con 7%. Dentro de los tipos de secreciones, traqueal fue la más frecuente con 29%. Un estudio en Brasil demuestra que secreción traqueal está asociado a este microorganismo en 53% (Da Silva Júnior et al., 2017). En un hospital de Quito, un estudio asegura que el tipo de muestra con mayor prevalencia relacionado a este patógeno son heridas y líquidos con 45% y muestras respiratorias con

40% (Guano, 2017), estos datos no son comparables con los resultados de esta investigación ya que fueron expresados de manera diferente según los tipos de muestra. Por otro lado, Ohshima et al. (2017) demuestra que esputo está relacionado en un 55% con este microorganismo distinto al 2% encontrado en esta investigación en torno a este espécimen. La alta variabilidad de muestras biológicas se debe al amplio espectro de enfermedades que puede causar *Pseudomonas aeruginosa* en todos los aparatos y sistemas del cuerpo humano (Fazeli et al., 2012; Oliver et al., 2017).

En cuanto al género de los pacientes, en este estudio los aislados provinieron en su mayoría del sexo masculino con 65%, dato semejante al reportado por Mirsalehian et al. (2017) con 72%; sin embargo, en el estudio de Malkoçoğlu et al. (2017) se evidenció que el sexo femenino fue superior con 55%. En relación a la edad, la mayoría de aislados provinieron de pacientes adultos con 95%, distinto al 65% encontrado en un estudio realizado en Quito y en donde la población geriátrica obtuvo un 27% (Guano, 2017). Este valor es diferente al reportado en esta investigación, ya que no hubo ninguna cepa proveniente de este tipo de población. *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista que afecta a todo tipo de individuo independientemente de su edad o género, ya que su patogenicidad se ve mediada principalmente por su diseminación en el ambiente hospitalario, virulencia de la cepa y el estado inmunológico de los pacientes afectados.

Con respecto a los carbapenémicos, el imipenem presentó un 96.4% (53/55), dato igual al hallado en el estudio de Polotto et al. (2012) con 96.4% (54/56) ambos por método de difusión de disco. Por otra parte, el porcentaje de resistencia al meropenem fue de 81.8% (45/55) mayor al reportado por Polotto et al. (2012) con 75% (42/56) y menor comparado al que se obtuvo en el estudio de Mirsalehian et al. (2017) donde todos los aislados fueron resistentes a este antibiótico. Lo mismo se observó por CMI, en este estudio imipenem y

meropenem presentaron porcentajes de 96.4% y 69.1% similar al estudio de Malkoçoğlu et al. (2017) en donde la resistencia a ambos antibióticos fue de 97.6% y 70.2% respectivamente. En *Pseudomonas aeruginosa*, la resistencia a carbapenémicos se debe principalmente a la pérdida de la porina OprD, sobreexpresión de bombas de eflujo y AmpC (Oliver et al., 2017), sin embargo, las carbapenemasas de clases A, D y B codificadas por elementos genéticos móviles son mecanismos emergentes en la resistencia a estos antibióticos (Nicolau & Oliver, 2010; Malkoçoğlu et al., 2017). En el país, la resistencia a carbapenémicos se ha incrementado en los últimos años (RAM, 2015) pero la presencia de la enzima GES como responsable no se ha investigado a pesar que a nivel de Sudamérica ya se han descrito múltiples variantes.

En este estudio, la resistencia a cefalosporinas de espectro extendido, entre ellas ceftazidima, se encontró en un porcentaje de 98.2% por ambos métodos. Por otro lado, la resistencia hallada en cefepime fue de 69% por difusión de disco y 83.6% por CMI. En el estudio de Al agamy et al. (2016) se evidenció que todos los aislados fueron resistentes a ceftazidima, no obstante, algunos estudios demuestran resistencia reducida a CAZ con 74% (Mirsalehian et al., 2017), 84% (Neyestanaki et al., 2014) por difusión de disco y 15% (Estepa et al., 2017) por CMI. Sin embargo, la resistencia al cefepime se presentó en casi la totalidad de los aislados con respecto a los resultados encontrados en este estudio. Otro antibiótico utilizado fue el aztreonam, el mismo que mostró una susceptibilidad del 49.1% seguido de 45.5% para aislados con resistencia intermedia y 5.5% para resistente. La sensibilidad es similar a lo encontrado en el estudio de Tavajjohi et al. (2011) con 68.6%, no obstante, Al agamy et al. (2016) y De Almeida Silva et al. (2017) obtuvieron 67% y 54% de aislados resistentes a este antimicrobiano respectivamente. Las BLEE son responsables de la resistencia a cefalosporinas de espectro extendido y monobactams pero se inhiben con ácido clavulánico o tazobactam (Oliver et al., 2017). En *Pseudomonas*

*aeruginosa*, se han detectado 32 tipos de BLEE caracterizadas en clases A y D (Lin et al., 2012) y el grado de hidrólisis a ceftazidima, cefepime y aztreonam dependerá del tipo de enzima implicada (Vila & Marco, 2010). La producción de una betalactamasa GES ha sido asociada con resistencia a cefalosporinas de espectro extendido (Poirel et al., 2000); sin embargo, no es considerada como una betalactamasa primaria en esta bacteria ya que a menudo puede encontrarse en combinación con otros mecanismos tales como hiperexpresión de AmpC y enzimas adquiridas tipo OXA, las mismas que confiere sensibilidad reducida a estos antibióticos (Labuschagne, Weldhagen, Ehlers, & Dove, 2008; Lin et al., 2012).

Por otro lado, los aislados clínicos de *P. aeruginosa* presentaron resistencia a piperacilina/tazobactam con 94.5% por CMI pero solo el 32.7% de los aislados fueron resistentes por difusión de disco y 61.8% para resistencia intermedia. Estos datos difieren a lo encontrado en el estudio de Estepa et al. (2017) donde solo el 20% de las cepas mostraron un patrón de resistencia por CMI y del estudio de Ochoa et al. (2013) en el que el 63% eran resistentes a este antibiótico por difusión de disco. En cambio De Almeida Silva et al. (2017) manifiestan que todos sus aislados fueron susceptibles a este antibiótico. La alta resistencia a la combinación de agentes betalactámicos se puede dar por la hiperexpresión de la AmpC cromosómica de *Pseudomonas aeruginosa* (WHONET, 2017).

Adicionalmente, los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* presentaron resistencia a un aminoglucósido en particular, a la gentamicina con 90% por ambos métodos. Sin embargo, la amikacina mostró un patrón mayor de sensibilidad por disco (65.45%) y CMI (76.4%). Otros estudios demuestran que este patógeno manifiesta mayor resistencia a la gentamicina (Neyestanaki et al., 2014; De Almeida Silva et al., 2017; Mirsalehian et al., 2017) y una resistencia variable a la amikacina (Al agamy et al., 2016). La resistencia

encontrada puede deberse a un gen codificante de enzimas modificantes de aminoglucósidos albergadas en el integrón conocidas como acetiltransferasas (Oliver et al., 2017). Esto se demuestran en el estudio de Estepa et al. (2017) en la que la mayoría de sus cepas resistentes (>60% para gentamicina y tobramicina) portaban integrones de clase 1.

Por último, en este estudio se encontró resistencia a la ciprofloxacina con un porcentaje de 96.4% por difusión de disco y 94.5% por CMI. De igual manera se demuestra en los estudios de De Almeida Silva et al. (2017) y Mirsalehian et al. (2017) con 94.3% y 100% respectivamente ambos por técnica de difusión de disco. Por otro lado, la resistencia a este antibiótico se ve reducida en otros estudios como el de Ochoa et al. (2013) con un 64.1% y alrededor del 80% de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* en el de Estepa et al. (2017). La resistencia a fluoroquinolonas en este patógeno depende de la existencia de bombas de expulsión como MexAB-OprM y de mutaciones en topoisomerasas (Fariñas & Martínez, 2013). Frecuentemente se debe a cambios estructurales en ADN girasa y topoisomerasa IV (Oliver et al., 2017) que están mediados por mutaciones en varios genes como *gyrA* o *parC* y que en conjunto condicionan un elevado grado de resistencia (Vila & Marco, 2010).

Todos los aislados de *P. aeruginosa* fueron sensibles al colistín, semejante a otras cepas reportadas (Da Fonseca et al., 2007; Viedma et al., 2009), lo que condiciona al uso de este antibiótico que posee un mayor efecto nefrotóxico pero útil cuando se manejan infecciones por cepas multirresistentes y que incluso llegan a la panresistencia (Gómez et al., 2015); sin embargo, no constituye la última opción terapéutica ya que se han desarrollado nuevas combinaciones de agentes  $\beta$ -lactámicos como ceftolozano/tazobactam y ceftazidima/avibactam con mayor actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* productoras de  $\beta$ -lactamasas de clase A (Pintado, 2016).

Aunque no hay una explicación certera de los errores en las categorías clínicas entre resultados obtenidos por sistemas automatizados y métodos de referencia (Mazzariol et al., 2008), es importante destacar la presencia de mecanismos subyacentes como hiperexpresión de AmpC, bombas eflujo y otras betalactamasas que afectan a los antibióticos betalactámicos y complican la interpretación de resultados en los sistemas automatizados y técnicas manuales (Sader, Fritsche, & Jones, 2006). En el presente estudio se encontró errores en las categorías clínicas en piperacilina/tazobactam y cefepime entre ambas metodologías. Los errores mayores y menores se presentaban en un 1.8% y 60% respectivamente para piperacilina/tazobactam. Estos datos concuerdan con el estudio de Sader, Fritsche, & Jones, (2006) en la que los métodos automatizados como *Vitek*, *Vitek 2* y *Walk Away* muestran errores importantes en piperacilina/tazobactam con índices inaceptables de errores mayores debido a su baja capacidad de detección de resistencia; asimismo, cefepime es otro antibiótico afectado que manifiesta una tendencia hacia falsos intermedios y resistentes semejante a este estudio con un porcentaje de errores mínimos del 18%.

Aunque no hay un método fenotípico estandarizado para la detección de BLEE en *Pseudomonas aeruginosa* (Polotto et al., 2012), la sinergia de doble disco identificó la enzima GES en 52/55 cepas y la PCR en 54/55 cepas para el gen *bla*<sub>GES</sub>. Este dato difiere al estudio de Laudy et al. (2017) en donde el gen se encontró en 11 aislados de *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que la detección fenotípica entre ceftazidima e imipenem identificó la enzima en 6/11. Esta técnica fenotípica puede verse opacada por el efecto inductor del imipenem en la hiperexpresión de una cefalosporinasa cromosómica, la cual puede inhibirse al adicionar oxacilina al medio e incrementar su sensibilidad. No obstante, esta técnica puede reaccionar de manera positiva no solo con la enzima GES, sino también con PER-1 y VEB-1 (Weldhagen et al., 2003).

La cepa GESpae001 del presente estudio dio positivo para el gen *bla*<sub>GES</sub> en el ensayo de PCR y en su análisis de secuencia fue idéntica (100%) y reconocida como *bla*<sub>GES-5</sub>. Esta variante ha sido descrita en varias bacterias Gram negativas y posee una distribución mundial en países como Corea, India, Polonia, Turquía, entre otros (Jeong et al., 2005; Maurya et al., 2014; Laudy et al., 2017; Malkoçoğlu et al., 2017). Dentro del gen *bla*<sub>GES</sub>, esta variante es reconocida por su actividad carbapenemasa (Smith et al., 2012) y que a diferencia de las otras variantes con dicha actividad, esta lo hace de manera más eficiente frente a imipenem (Bae et al., 2007) lo que explicaría la resistencia hallada a los carbapenémicos en esta cepa. En Sudamérica existen varios reportes de esta variante únicamente en Brasil (Da Fonseca et al., 2007; Picão et al., 2010; Ribeiro, Falci, et al., 2014), incluso en especies no comunes como *Kluyvera intermedia* (Ribeiro, Zavascki, et al., 2014).

El gen *bla*<sub>GES-26</sub> encontrado en 17 cepas con producto secuenciado, dieron un resultado positivo en el ensayo de PCR y en su análisis de secuencia fue idéntica (100%) a la variante *bla*<sub>GES-26</sub> descrita en el año 2014 en un aislado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* obtenida de una muestra de lavado broncoalveolar en Estados Unidos. Actualmente no se ha descrito otro reporte de la variante *bla*<sub>GES-26</sub> a nivel mundial y su actividad hidrolítica frente a antibióticos betalactámicos no ha sido determinada (Naas et al., 2017). Los resultados hallados con respecto a *bla*<sub>GES-26</sub> sugieren un estudio más amplio de la variante debido a que provinieron de 4 diferentes hospitales y su frecuencia fue la más predominante. La resistencia antibiótica hallada en este estudio en torno a las variantes encontradas no puede estar mediada únicamente a la producción de BLEE tipo GES, sino involucrar diferentes mecanismos no enzimáticos de la bacteria (Adjei et al., 2017) y que podría explicar el fenotipo de las cepas que portan el gen *bla*<sub>GES-26</sub> en la que se desconoce la actividad hidrolítica.

## CONCLUSIONES

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria comúnmente relacionada a las infecciones asociadas a la atención en salud en pacientes inmunocomprometidos. Las cepas provinieron principalmente de población adulta, tracto respiratorio y el servicio más afectado fue UCI.

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* presentaron alta resistencia a la mayoría de los antibióticos evaluados incluyendo los utilizados comúnmente en infecciones causadas por este patógeno manifestando un patrón fenotípico MDR/XDR. Por la importancia de los  $\beta$ -lactámicos en el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*, es necesario conocer los mecanismos involucrados que pueden manifestarse en fenotipos inusuales causados por resistencias adquiridas o intrínsecas que complican la interpretación del perfil de susceptibilidad en equipos automatizados y técnicas manuales.

El análisis de susceptibilidad antibiótica de cefepime y piperacilina/tazobactam frente a *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo BLEE tipo GES constituye un problema para la interpretación del antibiograma debido a los errores encontrados en el sistema automatizado *Vitek 2* en relación al método de difusión de disco, lo que demuestra que este sistema puede generar falsas resistencias sino hay una correcta interpretación de la CMI en *Pseudomonas aeruginosa*.

La sinergia de doble disco entre ceftazidima e imipenem fue útil para la identificación fenotípica de la enzima GES, lo que fue confirmado con la técnica de PCR mediante la presencia del gen *bla*<sub>GES</sub>. La metodología molecular empleada fue útil para diferenciar las 31 variantes del gen a excepción de *bla*<sub>GES-19</sub> y *bla*<sub>GES-20</sub>. La variante de mayor frecuencia fue *bla*<sub>GES-26</sub> mientras que *bla*<sub>GES-5</sub> fue encontrada en 1 cepa. Ambas conforman el primer reporte de las variantes del gen *bla*<sub>GES</sub> en Ecuador.

La variante *bla*<sub>GES-5</sub> con su actividad carbapenemasa y *bla*<sub>GES-26</sub> sin actividad hidrolítica establecida sumado al perfil de susceptibilidad antimicrobiano obtenido sugieren el uso de cefepime, aztreonam y piperacilina/tazobactam en función a la CMI, según el tipo de infección, como alternativas terapéuticas debido a la falta de experiencia clínica suficiente para indicar o contraindicar estos antibióticos en infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* productor de BLEE tipo GES considerado sensible a estos agentes.

En conclusión, este estudio demostró la presencia de 2 variantes del gen como *bla*<sub>GES-5</sub> y *bla*<sub>GES-26</sub> en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas a partir de aislados clínicos de 4 diferentes hospitales de la ciudad de Quito y constituyen el primer reporte de variantes del gen *bla*<sub>GES</sub> en Ecuador. Estas variantes se presentan como un mecanismo de resistencia importante debido a su actividad hidrolítica frente a antibióticos betalactámicos y gran capacidad de diseminación en bacterias Gram negativas.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con estudios sobre *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo BLEE tipo GES en todo el país con el fin de determinar las variantes circulantes, nuevos reportes, prevalencia y perfil de susceptibilidad, además de estudios de clonalidad de las cepas para determinar posibles brotes.

A pesar de la inexistencia de métodos estandarizados para la detección fenotípica de BLEE tipo GES en *Pseudomonas aeruginosa* y la complejidad de implementar métodos moleculares en laboratorios clínicos de rutina u hospitales recomendamos no usar la sinergia de doble disco entre ceftazidima e imipenem debido a la baja relevancia en la interpretación del antibiograma además de no diferenciar BLEE tipo GES de PER y VEB.

Se recomienda el estudio de otros mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa* como impermeabilidad de membrana, bombas de expulsión activa y mutaciones en cromosoma, así mismo, la presencia de otras betalactamasas o de mecanismos combinados responsables de fenotipos MDR o XDR.

Debido a la larga preocupación que data sobre la precisión de equipos automatizados comerciales se recomienda realizar estudios con el fin de comparar metodologías entre microdilución en caldo y sistemas automatizados para cefepime y piperacilina/tazobactam con *Pseudomonas aeruginosa* fenotipos BLEE.

Por la alta resistencia antibiótica encontrada en *Pseudomonas aeruginosa*, se recomienda continuar con estudios que prueben la eficacia de nuevas combinaciones de agentes betalactámicos como ceftolozano/tazobactam o ceftazidima/avibactam para determinar el comportamiento fenotípico de las cepas estudio y ampliar las opciones terapéuticas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adjei, C. B., Govinden, U., Moodley, K., & Essack, S. Y. (2017). Molecular characterisation of multidrug-resistant *P. aeruginosa* from a private hospital in Durban, South Africa. *Southern African Journal of Infectious Diseases*, 33(2), 1–4. <https://doi.org/10.1080/23120053.2017.1382090>
- Alagamy, M. H., Jeannot, K., El-mahdy, T. S., Samaha, H. A., Shibl, A. M., Plésiat, P., & Courvalin, P. (2016). Diversity of Molecular Mechanisms Conferring Carbapenem Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Saudi Arabia. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2016/4379686>
- Ayala, S. (2011). Detección de genes que codifican la resistencia a carbapenemes (tipo Serin  $\beta$ -lactamasas) en *Pseudomonas aeruginosa*. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Bae, I. K., Lee, Y. N., Jeong, S. H., Hong, S. G., Lee, J. H., Lee, S. H., ... Youn, H. (2007). Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58(4), 465–468. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.02.013>
- Bălășoiu, M., Bălășoiu, A., Mănescu, R., Avramescu, C., & Ionete, O. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* resistance phenotypes and phenotypic highlighting methods. *Current Health Sciences Journal*, 40(2), 85–92. <https://doi.org/10.12865/CHSJ.40.02.01>
- Barrios, H., Garza-Ramos, U., Ochoa-Sanchez, L. E., Reyna-Flores, F., Rojas-Moreno, T.,

- Morfin-Otero, R., ... Amaya-Larios, I. Y. (2012). A plasmid-encoded class 1 integron contains GES-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates in Mexico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(7), 4032–4034. <https://doi.org/10.1128/AAC.05980-11>
- Bebrone, C., Bogaerts, P., Delbrück, H., Bennink, S., Kupper, M. B., De Castro, R. R., ... Hoffmann, K. M. (2013). GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-type  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(1), 396–401. <https://doi.org/10.1128/AAC.01784-12>
- Bobenchik, A., Deak, E., Hindler, J., Charlton, C., & Humphries, R. (2017). Performance of *Vitek 2* for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* with *Vitek 2* (2009 FDA) and CLSI M100S 26th Edition Breakpoints. *Journal of Clinical Microbiology*, *55*(2), 450–456.
- Bogaerts, P., Naas, T., El Garch, F., Cuzon, G., Deplano, A., Delaire, T., ... Glupczynski, Y. (2010). GES extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(11), 4872–4878. <https://doi.org/10.1128/AAC.00871-10>
- Bonnin, R., Docobo, F., Poirel, L., Villegas, M., & Nordmann, P. (2014). Emergence of OXA-72-producing *Acinetobacter pittii* clinical isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *43*(2), 195–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.10.005>
- Bonnin, R., Nordmann, P., Potron, A., Lecuyer, H., Zahar, J., & Poirel, L. (2011).

- Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), 349–354.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00773-10>
- Brenner, D., Krieg, N., & Staley, J. (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (Volume 2:). New York, NY, USA: Springer.
- Cambray, G., Guerout, A.-M., & Mazel, D. (2010). Integrons. *Annual Review of Genetics*, 44(1), 141–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163504>
- Campana, E. H., Xavier, D. E., Petrolini, F. V. B., Cordeiro-Moura, J. R., Araujo, M. R. E. de, & Gales, A. C. (2017). Carbapenem-resistant and cephalosporin-susceptible: a worrisome phenotype among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21(1), 57–62.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.10.008>
- Castanheira, M., Mendes, R., Walsh, T., Gales, A., & Jones, R. (2004). Emergence of the Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* Strain from Brazil: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6), 2344–2345.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2344-2345.2004>
- CDC. (2018). Antibiotic / Antimicrobial Resistance. Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved from <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- CLSI. (2017). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. Guideline 27Th Edition.
- Cuzon, G., Bogaerts, P., Bauraing, C., Huang, T.-D., Bonnin, R., Glupczynski, Y., & Naas, T. (2016). Spread of Plasmids Carrying Multiple GES Variants. *Antimicrobial Agents*

and *Chemotherapy*, 60(8), 5040–5043. <https://doi.org/10.1128/AAC.00360-16>

Da Fonseca, E., Vieira, V., Cipriano, R., & Vicente, A. (2007). Emergence of *bla*<sub>GES-5</sub> in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(3), 576–577. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl517>

Da Silva Júnior, V. V., Ferreira, L. D., Alves, L. R., Cabral, A. B., Jácome, P. R. L. de A., Araújo, P. S. R. de, ... Maciel, M. A. V. (2017). Detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring *bla*<sub>GES-1</sub> and *bla*<sub>GES-11</sub> in Recife, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(6), 764–768. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0532-2016>

De Almeida Silva, K. de C. F., Calomino, M. A., Deutsch, G., de Castilho, S. R., de Paula, G. R., Esper, L. M. R., & Teixeira, L. A. (2017). Molecular characterization of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. *Burns*, 43(1), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.07.002>

Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., ... Yu, G. (2015). Resistance integrons: class 1 , 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(45), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>

Endimiani, A., Luzzaro, F., Pini, B., Amicosante, G., Maria Rossolini, G., & Toniolo, A. Q. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to expression of the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. *BMC Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-52>

Estepa, V., Rojo, B., Azcona, J. M., Olarte, I., Torres, C., & Sáenz, Y. (2017). Characterisation of carbapenem-resistance mechanisms in clinical *Pseudomonas*

- aeruginosa* isolates recovered in a Spanish hospital. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 35(3), 141–147. <https://doi.org/10.1016/J.EIMCE.2017.02.001>
- EUCAST. (2017). Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. European Committee on Antimicrobial Susceptibility.
- Fariñas, M., & Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias Gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos Gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 31(6), 402–409. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.016>
- Fazeli, H., Akbari, R., Moghim, S., Narimani, T., Arabestani, M., & Ghoddousi, A. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients, hospital means and personnel's specimens. *Journal of Research in Medical Sciences*, 17(4), 332–337. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3526125/#!po=82.1429>
- Galván, M., Castañeda, L., Galindo, M., & Morales, M. (2017). Infecciones asociadas con la atención de la salud y su resistencia antimicrobiana. *Rev Esp Méd Quir*, 22(1), 1–13.
- Garza, U., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Tamayo-Legorreta, E., Catalan-Najera, J. C., Morfin-Otero, R., ... Silva-Sanchez, J. (2015). Widespread of ESBL and carbapenemase GES-type genes on carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: A multicenter study in Mexican hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 81(2), 135–137. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.029>

- Gillings, M. R. (2014). Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2), 257–277. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>
- Girlich, D., Naas, T., & Nordmann, P. (2004). Biochemical Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa* These include : Biochemical Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6), 2043–2048. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2043>
- Gómez, J., García, E., & Hernández, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter*, 28(1), 1–9.
- Guano, A. (2017). Infección nosocomial: Prevalencia de *Pseudomonas aeruginosa* en aislamientos microbiológicos y su resistencia a los carbapenémicos en pacientes del Hospital Carlos Andrade Marín en el periodo Julio - Diciembre 2016.(Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/13054/1/T-UCE-0006-021-2017.pdf>
- Guevara, A., Sierra, C., & Waard, J. (2012). Caracterización molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos provenientes de cuatro hospitales de Venezuela. *Revista Chilena de Infectología*, 29(6), 614–621.
- Hong, J. S., Yoon, E.-J., Lee, H., Jeong, S. H., & Lee, K. (2016). Clonal dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 isolates carrying *bla*<sub>IMP-6</sub> and emergence of *bla*<sub>GES-24</sub> and *bla*<sub>IMP-10</sub> on novel genomic islands PAGI-15 and -16 in South Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(12), 7216–7223. <https://doi.org/10.1128/AAC.01601-16>.Address
- Jeon, J., Lee, J., Lee, J., Park, K., Karim, A., Lee, C.-R., ... Lee, S. (2015). Structural Basis

for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9654–9692. <https://doi.org/10.3390/ijms16059654>

Jeong, S. H., Bae, I. K., Kim, D., Hong, S. G., Song, J. S., Lee, J. H., & Lee, S. H. (2005). First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum B-lactamases in Korea [2]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(11), 4809–4810. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4809-4810.2005>

Jiménez, M. A. (2013). Vigilancia microbiológica año 2011: una herramienta para el control de las infecciones intrahospitalarias, área de cuidados intensivos HCAM. (Tesis de postgrado). Universidad San Francisco de Quito. Retrieved from <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/2815/1/109185.pdf>

Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., Jameson, J., & Loscalzo, J. (2016). *Harrison: Principios De Medicina Interna* (19 edición). España: McGraw Hill.

Khan, H. A., Ahmad, A., & Mehboob, R. (2015). Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(7), 509–514. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.001>

Kiratisin, P., Apisarnthanarak, A., Laesripa, C., & Saifon, P. (2008). Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), 2818–2824. <https://doi.org/10.1128/AAC.00171-08>

- Kotsakis, S. D., Papagiannitsis, C. C., Tzelepi, E., Legakis, N. J., Miriagou, V., & Tzouvelekis, L. S. (2010). GES-13, a  $\beta$ -lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(3), 1331–1333. <https://doi.org/10.1128/AAC.01561-09>
- Krebs, J., Goldstein, E., & Kilpatrick, S. (2014). *Lewin's genes X* (11 edición). Ontario: Jones and Barlett.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Labarca, J. A., Salles, M. J. C., Seas, C., & Guzmán-Blanco, M. (2016). Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Critical Reviews in Microbiology*, *42*(2), 276–292. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.940494>
- Labuschagne, C. D. J., Weldhagen, G. F., Ehlers, M. M., & Dove, M. G. (2008). Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *31*(6), 527–530. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.020>
- Laudy, A. E., Róg, P., Smolinska-Król, K., Ćmiel, M., Szołczyńska, A., Patzer, J., ... Tyski, S. (2017). Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods. *PLoS ONE*, *12*(6), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180121>

- Lin, S., Liu, M., Lin, C., & Shi, Z. (2012). Phenotypic detection and polymerase chain reaction screening of extended-spectrum $\beta$ -lactamases produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 45(3), 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2011.11.015>
- López, D., Torres, M., & Prada, C. (2015). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos : Impacto en la salud pública en Colombia. *Revista Universidad Y Salud*, 18(1), 190–202.
- Luján, D. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamérica*, 48(4), 465–474.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Malhotra, K., Walia, R., Aslam, S., & Goyal, M. (2012). Carbapenemases : The New Face of Antimicrobial. *Indian Journal of Clinical Practice*, 23(1), 6–8.
- Malkoçoğlu, G., Aktaş, E., Bayraktar, B., Otlu, B., & Bulut, M. E. (2017). VIM-1, VIM-2, and GES-5 Carbapenemases Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates at a Tertiary Hospital in Istanbul, Turkey. *Microbial Drug Resistance*, 23(3), 328–334. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0012>
- Marín, M., & Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21(1), 42–55.

- Marsili, F. (2015). Tipificación molecular de plásmidos que confieren resistencia a cefotaxima. Retrieved from <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/colecciones/bitstream/handle/123456789/8059/2.2.3.pdf>
- Martínez, J. A. (2016). Approach to directed therapy after knowledge of the isolate: carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Rev Esp Quimioter*, 29(1), 31–34.
- Maurya, A. P., Choudhury, D., & Bhattacharjee, A. (2014). A report on the presence of GES-5 extended spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* associated with urinary tract infection from north-east India. *Indian Journal of Medical Research*, 140(4), 565–567.
- Mavroidi, A. (2000). Carbapenem-hydrolysing VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(6), 1041–1043. <https://doi.org/10.1093/jac/46.6.1041>
- Mazzariol, A., Aldegheri, M., Ligozzi, M., Cascio, G. Lo, Koncan, R., & Fontana, R. (2008). Performance of *Vitek 2* in antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates with different mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 2095–2098. <https://doi.org/10.1128/JCM.02216-07>
- MDM. (2017). Inseto Patrón McFarland. Retrieved from <http://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2017/07/Patrón-McFarland-05072017-O-P.PD-311-INSERTO-05072017-MDM-científica.pdf>

- Mirsalehian, A., Neyestanaki, D., Taherikalani, M., Jabalameli, F., & Emaneini, M. (2017). Determination of carbapenem resistance mechanism in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients, in Tehran, Iran. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 7(3), 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.jegh.2017.04.002>
- Morejón, M. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*, 52(4), 272–280. [https://doi.org/10.1016/0294-3506\(95\)80190-1](https://doi.org/10.1016/0294-3506(95)80190-1)
- Moreno, K. (2013). Carbapenémicos: Tipos y mecanismos de resistencias bacterianas. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXX*, 599–605.
- MSP. (2013). Cuadro Nacional de Medicamentos Básicos 9na. revisión. Retrieved from <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21672es/s21672es.pdf>
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2014). *Microbiología Médica* (Séptima ed). Barcelona: Elsevier.
- Mustafa, M., Chalhoub, H., Denis, O., Deplano, A., Vergison, A., Rodriguez, H., ... Van Bambeke, F. (2016). Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients through Northern Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1–25. <https://doi.org/10.1128/AAC.01046-16>
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., ... Iorga, B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 917–919. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>
- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández, F., & Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos.

*Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(7), 524–534.

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>

Neyestanaki, D. K., Mirsalehian, A., Rezagholizadeh, F., Jabalameli, F., Taherikalani, M., & Emaneini, M. (2014). Determination of extended spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases and AmpC-beta-lactamases among carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns*, 40(8), 1556–1561.  
<https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.02.010>

Nicolau, C. J., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 28, 19–28.  
[https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70004-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70004-5)

Ochoa, S. A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., López-Martínez, B., ... Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 70(2), 138–150.

Ohshima, T., Asai, S., Miyazawa, M., Yamamoto, Y., Hisada, A., Kumazawa, C., ... Miyachi, H. (2017). The implementation of a hospital-wide practice for the selective use of carbapenems based on the monitoring of susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 42(4), 176–181.

Oliver, A. (2017). Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: Role of high-risk clones in multidrug resistance. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 35(3), 137–138.

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.11.006>

Oliver, A., Mulet, X., López, C., & Juan, C. (2017). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*, 21–22, 41–59.

<https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>

OMS. (2015). Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria. Organización Mundial de la Salud. Retrieved from [http://www.who.int/gpsc/country\\_work/burden\\_hcai/es/](http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/es/)

OMS. (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Organización Mundial de la Salud. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>

OPS. (2011). Vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención en salud (Volumen Módulo 1). Organización Panamericana de la Salud. Retrieved from [http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2011/SPA\\_Modulo\\_I\\_Final.pdf](http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2011/SPA_Modulo_I_Final.pdf)

OPS. (2012). Vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención de la salud. Organización Panamericana de la Salud. Retrieved from [http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=22315&Itemid=270](http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22315&Itemid=270)

Ossa, A. C., Echeverri, L. M., Santos, Z. M., García, M. G., Agudelo, Y., Ramírez, F., & Ospina, S. (2014). Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection, in a tertiary hospital in Colombia. *Revista Chilena de Infectología : Órgano Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 31(4), 393–9. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000400003>

Pasteran, F., Faccone, D., Petroni, A., Rapoport, M., Galas, M., Vázquez, M., & Procopio,

- A. (2005). Novel variant *bla*<sub>VIM-11</sub> of the metallo- $\beta$ -lactamase *bla*<sub>VIM</sub> family in a GES-1 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), 474–5. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.474-475.2005>
- Peña, C., Suarez, C., Ocampo-Sosa, A., Murillas, J., Almirante, B., Pomar, V., ... Martínez-Martínez, L. (2013). Effect of adequate single-drug vs combination antimicrobial therapy on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: A post hoc analysis of a prospective cohort. *Clinical Infectious Diseases*, 57(2), 208–216. <https://doi.org/10.1093/cid/cit223>
- Picão, R. C., Santos, A. F., Nicoletti, A. G., Furtado, G. H., & Gales, A. C. (2010). Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(4), 796–797. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq024>
- Piersigilli, A., Enrico, M. C., Bongiovanni, M. E., Bilbao, L. E., Martínez, G., & Ledesma, E. M. (2009). Aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido en un centro privado de Córdoba. *Revista Chilena de Infectología*, 26(4), 331–335. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182009000500004>
- Pincus, D. H. (2010). Microbial identification using the bioMérieux VITEK® 2 system. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Retrieved from [https://store.pda.org/tableofcontents/ermm\\_v2\\_ch01.pdf](https://store.pda.org/tableofcontents/ermm_v2_ch01.pdf)
- Pintado, V. (2016). Fármacos antiguos y nuevos en el tratamiento de la infección por bacterias multirresistentes. *Rev Esp Quimioter*, 29(1), 39–42.
- Poirel, L., Bonnin, R., & Nordmann, P. (2011). Genetic Basis of Antibiotic Resistance in Pathogenic *Acinetobacter* Species. *IUBMB Life*, 63(12), 1061–1067.

<https://doi.org/10.1002/iub.532>

- Poirel, L., Thomas, I., Naas, T., Karim, A., & Nordmann, P. (2000). Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 622–32. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.622-632.2000>
- Polotto, M., Casella, T., de Lucca Oliveira, M. G., Rúbio, F. G., Nogueira, M. L., de Almeida, M. T., & Nogueira, M. C. (2012). Detection of *P. aeruginosa* harboring *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>GES-1</sub> and *bla*<sub>GES-5</sub>, *bla*<sub>IMP-1</sub> and *bla*<sub>SPM-1</sub> causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-176>
- Popowska, M., & Krawczyk-Balska, A. (2013). Broad-host-range IncP-1 plasmids and their resistance potential. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00044>
- RAM. (2015). Datos de Resistencia Bacteriana Ecuador - 2015. Retrieved from <http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ram/datos-vigilancia/>
- Ribeiro, V. B., Falci, D. R., Rozales, F. P., Barth, A. L., & Zavascki, A. P. (2014). Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 18(2), 231–232. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.12.002>
- Ribeiro, V. B., Zavascki, A. P., Rozales, F. P., Pagano, M., Magagnin, C. M., Nodari, C. S., ... Bartha, A. L. (2014). Detection of *bla*<sub>GES-5</sub> in carbapenem-Resistant *Kluyvera intermedia* isolates recovered from the hospital environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 622–623. <https://doi.org/10.1128/AAC.02271-13>

- Rivera, M., Rodríguez, C., & Huayán, G. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* productora de betalactamasa clásica y de espectro extendido en resevorios de un servicio de neonatología. *English Journal*, 25(2), 250–251.
- Ryder, C., Byrd, M., & Wozniak, D. J. (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion of Microbiology*, 10(6), 644–648. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.010>
- Sader, H. S., Fritsche, T. R., & Jones, R. N. (2006). Accuracy of three automated systems (*MicroScan WalkAway*, *VITEK*, and *VITEK 2*) for susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* against five broad-spectrum beta-lactam agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 1101–1104. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.1101-1104.2006>
- Sanders, C. C., Peyret, M., Moland, E. S., Shubert, C., Thomson, K. S., Boeufgras, J. M., & Sanders, W. E. (2000). Ability of the *VITEK 2* advanced expert system to identify  $\beta$ -lactam phenotypes in isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2), 570–574.
- Sevillano, E., Gallego, L., & García-Lobo, J. M. (2009). First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathologie Biologie*, 57(6), 493–495. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.05.002>
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>

- Smith, C. A., Frase, H., Toth, M., Kumarasiri, M., Wiafe, K., Munoz, J., ... Vakulenko, S. B. (2012). Structural basis for progression toward the carbapenemase activity in the GES family of  $\beta$ -lactamases. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(48), 19512–19515. <https://doi.org/10.1021/ja308197j>
- Steward, C. D., Mohammed, J. M., Swenson, J. M., Stocker, S. A., Williams, P. P., Gaynes, R. P., ... Tenover, F. C. (2003). Antimicrobial susceptibility testing of carbapenems: Multicenter validity testing and accuracy levels of five antimicrobial test methods for detecting resistance in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(1), 351–358. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.351-358.2003>
- Tamma, P. D., & Rodriguez-Baño, J. (2017). The use of noncarbapenem  $\beta$ -lactams for the treatment of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase infections. *Clinical Infectious Diseases*, *64*(7), 972–980. <https://doi.org/10.1093/cid/cix034>
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2008). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Retrieved from <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
- Tavajjohi, Z., Moniri, R., & Khorshidi, A. (2011). Detection and characterization of multidrug resistance and extended-spectrum-beta-lactamase-producing (ESBLs) *Pseudomonas aeruginosa* isolates in teaching hospital. *African Journal of Microbiology Research*, *5*(20), 3223–3228. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.260>
- Torres, E., Villanueva, R., & Bou, G. (2009). Comparison of different methods of determining  $\beta$ -lactam susceptibility in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, *58*, 625–629. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.005587-0>

UNAM. (n.d.). Pruebas Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Retrieved

from

[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U3c\\_PruebasBioquimicas\\_17461.PDF](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U3c_PruebasBioquimicas_17461.PDF)

Varón, F., Hernández, Á., Molina, F., Poveda, C. M., Mezad, R. A., Castro, H., ... Alí-Munive, A. (2016). Traqueobronquitis y neumonía asociadas a ventilación mecánica en unidades de cuidado intensivo de Latinoamérica: epidemiología, curso clínico y desenlaces. *Infectio*, 74–80. <https://doi.org/10.22354/in.v21i2.650>

Viedma, E., Juan, C., Acosta, J., Zamorano, L., Otero, J. R., Sanz, F., ... Oliver, A. (2009). Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum  $\beta$ -lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(11), 4930–4933. <https://doi.org/10.1128/AAC.00900-09>

Vila, J., & Marco, F. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 28(10), 726–736. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.05.001>

Vincent, J., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Moreno, R., Anzueto, A., ... Reinhart, K. (2009). International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *Journal of American Medical Association*, 302(21), 2323–2329.

Vourli, S., Giakkoupi, P., Miriagou, V., Tzelepi, E., Vatopoulos, A. C., & Tzouvelekis, L. S. (2004). Novel GES/IBC extended-spectrum  $\beta$ -lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 234(2), 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.03.028>

- Walther, J., & Hoiby, N. (2007). Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(3), 470–482. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm226>
- Wang, C., Cai, P., Chang, D., & Mi, Z. (2006). A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(6), 1261–1262. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl116>
- Weldhagen, G. F., Poirel, L., & Nordmann, P. (2003). Ambler Class A Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2385–2392. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2385-2392.2003>
- WHONET. (2017). Protocolo de trabajo: RED WHONET ARGENTINA. Retrieved from <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/Protocolo-WHONET-consensuado-2017-final.pdf>
- Xu, Z., Li, L., Shi, L., & Shirliff, M. E. (2012). Class 1 integron in *Staphylococci*. *Mol Biol Rep*, 29(17), 3230–3238. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.02.036>
- Zaragoza, R., Ramírez, P., & López-Pueyo, M. J. (2014). Infección nosocomial en las unidades de cuidados intensivos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clinica*, 32(5), 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.02.006>

## 6 ANEXOS

### Anexo 1. Aprobación CEISH-PUCE

Pontificia Universidad  
Católica del Ecuador

Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos



Quito, 07 de diciembre de 2017  
Oficio-CEISH-395-2017

Señores estudiantes  
Andrés Sebastián Méndez Morales  
Andrea Carolina Sarmiento Ninahualpa  
Carrera de Bioquímica Clínica  
Facultad de Medicina de la PUCE  
Presente.

Estimados estudiantes:

El Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la PUCE, en sesión del 16.11.2017, estudió el proyecto titulado "Caracterización de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo GES en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas a partir de aislados clínicos de hospitales de la ciudad de Quito, de enero a diciembre de 2016".

El Comité considera que el proyecto está bien presentado. No requiere consentimiento informado ya que se trabaja con cupos existentes, por lo tanto, el proyecto se aprueba.

Deseamos éxitos en su investigación

Con nuestra consideración y estima.

  
Dra. Taura Arcus Terán  
Presidenta  
Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos - PUCE



LAI/yar

Av. de la Libertad s/n y Simón Bolívar  
Avenida Occidental 4484  
Tel: (052) 2 299 72 00 ext. 2342  
Quito - Ecuador



**Anexo 2. Control de calidad de medios de cultivo.** En la tabla se detalla los parámetros evaluados en el control de calidad de los diferentes medios según el CLSI 2017 y la norma ISO/TS11133-2.

	<b>Agar base sangre 5%</b>	<b>Agar MacConkey</b>	<b>Agar Mueller Hinton</b>	<b>Resultado</b>
<b>Lote</b>	SB240118	AMC240118	AMH240118	-
<b>Fecha de elaboración</b>	24-01-18	24-01-18	24-01-18	-
<b>Fecha de expiración</b>	24-02-18	24-02-18	24-02-18	-
<b>Color</b>	Rojo	Rojo	Ámbar	Conforme
<b>Volumen</b>	25 mL c/u	25 mL c/u	25 mL (4 mm) c/u	Conforme
<b>Presentación</b>	Bi Petri plástico	Mono Petri plástico	Mono Petri plástico	Conforme
<b>ph</b>	7.3	7.1	7.3	Conforme
<b>Esterilidad</b>	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Conforme

#### **AGAR MACCONKEY**

<b>Microorganismo</b>	<b>Características</b>	<b>Selectividad</b>	<b>Productividad</b>	<b>Resultado</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Colonias rosadas y bacilos Gram negativos	No	Si	Conforme
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	Colonias verdes y bacilos Gram negativos	No	Si	Conforme
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Sin crecimiento	Si	No	Conforme

**Anexo 3. Control de calidad de discos.** En la siguiente tabla se detallan los antibióticos utilizados para el estudio frente a cepas ATCC® según los parámetros del CLSI 2017. Acrónimos, FEP: cefepime, CIP: ciprofloxacino, ATM: aztreonam, TZP: piperacilina/tazobactam, MER: meropenem, AMK: amikacina, GEN: gentamicina, IMI: imipenem, CAZ: ceftazidima,

<i>OXOID</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa ATCC ®27853</i>			
Disco	Concentración (µg)	Lote	Caducidad	Rango óptimo (mm)	Diámetro (mm)	Resultado
FEP	30	1958231	nov-19	25-31	29	Conforme
CIP	5	1958938	nov-19	25-33	27	Conforme
ATM	30	170508C	jul-19	23-29	29	Conforme
AMK	30	1883413	jul-19	18-26	23	Conforme
GEN	10	170703A	mar-20	17-23	19	Conforme
MER	10	2199515	ago-18	27-33	29	Conforme
CAZ	30	1985000	ene-18	22-29	25	Conforme
IMI	10	170825A	feb-19	20-28	24	Conforme
TZP	110	1954842	nov-19	25-33	28	Conforme

<i>OXOID</i>			<i>Escherichia coli ATCC ® 25922</i>			
Disco	Concentración (µg)	Lote	Caducidad	Rango óptimo (mm)	Diámetro (mm)	Resultado
FEP	30	1958231	nov-19	31-37	35	Conforme
CIP	5	1958938	nov-19	30-40	40	Conforme
ATM	30	170508C	jul-19	28-36	34	Conforme
AMK	30	1883413	jul-19	19-26	25	Conforme
GEN	10	170703A	mar-20	19-26	24	Conforme
MER	10	2199515	ago-18	28-35	34	Conforme
CAZ	30	1985000	ene-18	25-32	29	Conforme
IMI	10	170825A	feb-19	26-32	32	Conforme
TZP	110	1954842	nov-19	24-30	30	Conforme

**Anexo 4. Control de calidad de tarjetas Vitek 2.** La tabla indica la evaluación de la funcionalidad de las tarjetas GN y AST-N272. Acrónimos, FEP: cefepime, CIP: ciprofloxacino, TZP: piperacilina/tazobactam, MER: meropenem, AMK: amikacina, GEN: gentamicina, IMI: imipenem, CAZ: ceftazidima, SAM: ampicilina/sulbactam, FOX: ceftioxitin, CRO: ceftriaxona, COL: colistín, DOR: doripenem, ETP: ertapenem, TGC: tigeciclina.

*Escherichia coli* ATCC® 25922

30-01-2018

**Tarjeta GN**

**Nivel de confianza:** identificación excelente

**Nivel de identificación:**99% de probabilidad

**Tarjeta AST-N272**

Antibiótico	Hallado	Esperado	Antibiótico	Hallado	Esperado
AMK	≤ 2	≤ 2 - 4	DOR	≤ 0.12	≤ 0.12
SAM	≤ 2	≤ 2 - 8	ETP	≤ 0.5	≤ 0.5
FEP	≤ 1	≤ 1	GEN	≤ 1	≤ 1
FOX	≤ 4	≤ 4 - 8	IPM	≤ 0.25	≤ 0.25
CAZ	≤ 1	≤ 1	MEM	≤ 0.25	≤ 0.25
CRO	≤ 1	≤ 1	TZP	≤ 4	≤ 4
CIP	≤ 0.25	≤ 0.25	TGC	≤ 0.5	≤ 0.5
COL	≤ 0.5	≤ 0.5 - 1			

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853

30-01-2018

**Tarjeta GN**

**Nivel de confianza:** identificación excelente

**Nivel de identificación:**97% de probabilidad

**Tarjeta AST-N272**

Antibiótico	Hallado	Esperado	Antibiótico	Hallado	Esperado
AMK	≤ 2	≤ 2 - 4	DOR	0.25	≤ 0.12 - 0.5
FEP	≤ 1	≤ 1 - 8	ETP	4	2 - ≥ 8
CAZ	≤ 1	≤ 1 - 4	GEN	≤ 1	≤ 1 - 2
CRO	16	8 - ≥ 64	IPM	2	1 - 4
CIP	≤ 0.25	≤ 0.25 - 1	MEM	≤ 0.25	≤ 0.25 - 1
COL	≤ 0.5	≤ 0.5 - 2	TZP	≤ 4	≤ 4 - 8

**Anexo 5. Sustratos de la tarjeta GN de Vitek 2 (Biomerieux).**

<b>DETALLES BIOQUÍMICOS</b>			
<b>Cód.</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Cód.</b>	<b>Sustrato</b>
2	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	33	SACCHAROSE/SUCROSE
3	ADONITOL	34	D-TAGATOSE
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	35	D-TREHALOSE
5	L-ARABITOL	36	CITRATE(SODIUM)
7	D-CELLOBIOSE	37	MALONATE
9	BETA-GALACTOSIDASE	39	5-KETO-D-GLUCONATE
10	H2S PRODUCTION	40	L-LACTATE alkalisation
11	BETA-N-ACETYL- GLUCOSAMINIDASE	41	ALPHA-GLUCOSIDASE
12	Glutamyl Arylamidase pNA	42	SUCCINATE alkalisation
13	D-GLUCOSE	43	Beta-N-ACETYL- GALACTOSAMINIDASE
14	GAMMA-GLUTAMYL- TRANSFERASE	44	ALPHA-GALACTOSIDASE
15	FERMENTATION/GLUCOSE	45	PHOSPHATASE
17	BETA-GLUCOSIDASE	46	Glycine ARYLAMIDASE
18	D-MALTOSE	47	ORNITHINE DECARBOXILASE
19	D-MANNITOL	48	LYSINE DECARBOXILASE
20	D-MANNOSE	53	L-HISTIDINE assimilation
21	BETA-XYLOSIDASE	56	COUMARATE
22	BETA-Alanine arylamidase pNA	57	BETA-GLUCORINIDASE
23	L-Proline ARYLAMIDASE	58	O/129 RESISTANCE (comp. Vibrio)
26	LIPASE	59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE
27	PALATINOSE	61	L-MALATE asimilation
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	62	ELLMAN
31	UREASE	64	L-LACTATE assimilation
32	D-SORBITOL		

## Anexo 6. Control de calidad de la PCR

---

<b>Protocolo:</b> PCR – GES		<b>Responsables:</b> Andrés Méndez y Andrea Sarmiento		<b>Fecha de realización:</b> 05-02-2018
<b>MASTER MIX</b>				
<b>REACTIVOS</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>C+ OPS 193</b>	<b>C- CEPA SIN GEN</b>	
Agua molecular	-	10 µl	10 µl	
Forward 10 µM	0.4 µM	1 µl	1 µl	
Reverse 10 µM	0.4 µM	1 µl	1 µl	
TAQ 2X	0.96X	12 µl	12 µl	
C+	-	1 µl	-	
C-	-	-	1 µl	
<b>VOLUMEN FINAL</b>	-	25 µl	25 µl	

---

---

<b>Protocolo:</b> PCR – GES		<b>Responsables:</b> Andrés Méndez y Andrea Sarmiento		<b>Fecha de realización:</b> 05-02-2018
<b>ELECTROFORESIS</b>				
<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>CONDICIONES</b>			
Agarosa	2%			
Vol. amplicón	4 µl			
Voltaje	90 V			
Tiempo	40 min			
Ladder	2 µl			
Tinción	Et Br			
Vol. TAE 1X	1 L			

---

**Resultado:** Se observó migración del control positivo para el gen *bla<sub>GES</sub>* a un peso aproximado de 864 pb en la escala del marcador de peso molecular y ausencia de corrida para el control negativo

### **Anexo 7. Protocolo de purificación de amplicones.**

1. Mezclar partes iguales entre reactivo membrane binding y amplicones.
2. Reposar por un minuto a temperatura ambiente.
3. Preparar columna de purificación y añadir el producto anteriormente mencionado.
4. Reposar por un minuto a temperatura ambiente.
5. Añadir 700  $\mu$ l del reactivo membrane wash.
6. Centrifugar por un minuto a 14.000 rpm.
7. Descartar sobrenadante del tubo colector y secar.
8. Añadir 500  $\mu$ l del reactivo membrane wash.
9. Centrifugar por cinco minutos a 14.000 rpm.
10. Descartar sobrenadante del tubo colector y secar.
11. Centrifugar por un minuto a 14.000 rpm.
12. Llevar columna a tubo Eppendorf® de 1.5 ml
13. Añadir 50  $\mu$ l de agua molecular libre de nucleasas.
14. Reposar por un minuto a temperatura ambiente.
15. Centrifugar por un minuto a 14.000 rpm.
16. Quitar columna, tapar y sellar el producto final decantado.
17. Rotular.

**Anexo 8. Perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mediante método de difusión de disco.** La tabla indica el código de la cepa, los antibióticos utilizados y el resultado de la sinergia entre imipenem y ceftazidima para visualización fenotípica de la enzima GES. Acrónimos, FEP: cefepime, CIP: ciprofloxacino, ATM: aztreonam, TZP: piperacilina/tazobactam, MER: meropenem, AMK: amikacina, GEN: gentamicina, IMI: imipenem, CAZ: ceftazidima.

Código	ANTIBIÓTICOS																		
	FEP	mm	CIP	mm	ATM	mm	TZP	mm	MER	mm	AMK	mm	GEN	mm	IMI	mm	CAZ	mm	Sinergia
GESpae001	I	17	R	14	S	32	I	19	R	6	S	24	R	6	R	9	R	10	(+)
GESpae002	R	11	R	13	I	21	I	15	R	11	S	19	R	6	R	12	R	6	(+)
GESpae003	I	15	R	9	S	23	I	20	R	13	S	20	R	6	R	12	R	7	(+)
GESpae004	R	9	R	9	I	17	R	12	I	16	I	16	R	6	R	12	R	6	(+)
GESpae005	I	16	R	10	S	24	S	21	S	19	S	19	R	6	R	13	R	9	(+)
GESpae006	R	14	R	9	S	22	I	16	S	19	S	19	R	6	R	13	R	9	(+)
GESpae007	I	15	R	9	I	20	I	18	S	19	S	19	R	6	R	11	R	9	(+)
GESpae008	R	10	R	9	I	21	R	13	R	11	S	21	R	6	R	12	R	6	(+)
GESpae009	R	14	R	8	S	22	I	17	R	13	S	19	R	6	R	13	R	6	(+)
GESpae010	I	16	R	10	S	23	I	19	R	13	S	19	R	6	R	13	R	9	(+)
GESpae011	R	14	R	11	I	21	I	17	S	19	S	19	R	6	R	13	R	6	(+)
GESpae013	R	10	R	8	I	21	R	13	R	12	S	17	R	6	R	12	R	6	(+)
GESpae014	R	6	S	32	S	26	S	25	R	13	R	14	R	6	R	14	R	6	(-)
GESpae015	R	6	R	9	I	18	I	16	R	12	S	19	R	6	R	12	R	7	(+)
GESpae016	R	11	R	11	I	20	R	13	R	9	S	17	R	6	R	13	R	6	(+)
GESpae017	R	12	R	9	I	18	I	15	R	13	S	19	R	6	R	13	R	6	(+)
GESpae018	R	6	R	10	R	9	R	7	R	7	R	14	R	6	R	13	R	6	(+)
GESpae019	R	6	R	9	I	16	R	9	I	17	S	19	R	6	R	12	R	6	(+)

GESpae021	R	13	R	9	I	16	I	17	R	12	S	19	R	6	R	13	R	6	(+)
GESpae022	R	13	R	9	S	22	I	15	R	14	S	18	R	6	R	13	R	8	(+)
GESpae023	R	11	R	9	S	22	R	13	R	14	S	18	R	6	R	13	R	6	(+)
GESpae024	R	10	R	9	I	21	R	12	R	13	I	15	R	6	R	9	R	6	(+)
GESpae025	I	15	R	6	I	18	I	15	R	10	S	18	R	6	R	9	R	10	(-)
GESpae026	R	11	R	9	S	24	R	13	R	14	S	18	R	6	R	13	R	6	(+)
GESpae027	R	8	R	11	I	20	R	13	R	9	I	15	R	6	R	13	R	6	(+)
GESpae028	R	9	R	9	S	22	R	10	R	9	S	17	R	6	R	13	R	6	(+)
GESpae030	I	15	R	12	S	24	I	17	R	6	S	21	R	6	R	6	R	8	(+)
GESpae031	R	13	R	6	S	24	I	15	R	12	S	20	R	6	R	13	R	6	(+)
GESpae032	R	9	R	10	I	20	R	11	R	10	S	18	R	6	R	13	R	6	(+)
GESpae034	R	13	R	10	I	20	I	15	R	9	S	18	R	6	R	13	R	6	(+)
GESpae036	I	15	R	9	S	22	I	17	R	15	S	19	R	6	R	13	R	6	(+)
GESpae037	R	12	S	34	S	26	S	29	S	20	S	20	R	11	R	12	R	6	(+)
GESpae038	R	12	R	9	S	24	I	15	R	11	S	20	R	6	R	12	R	6	(+)
GESpae039	R	14	R	9	S	25	I	16	R	14	S	24	R	6	R	12	R	6	(+)
GESpae040	R	8	R	9	I	19	R	11	R	10	I	16	R	6	R	12	R	6	(+)
GESpae041	I	17	R	8	S	24	I	20	R	13	S	24	R	6	R	12	R	8	(+)
GESpae042	R	8	R	12	R	15	R	12	R	8	I	15	R	6	R	11	R	6	(+)
GESpae043	R	12	R	6	I	20	I	16	R	6	R	6	S	15	R	6	R	6	(-)
GESpae044	R	12	R	6	S	22	I	16	R	15	R	8	R	6	R	14	R	6	(+)
GESpae045	I	17	R	11	S	23	I	20	R	15	S	18	R	6	R	12	R	8	(+)
GESpae046	R	14	R	9	I	21	I	18	R	13	S	18	R	6	R	13	R	7	(+)
GESpae047	R	12	R	6	I	18	I	16	R	10	I	15	R	6	R	11	R	6	(+)
GESpae048	R	11	R	7	I	18	R	14	R	9	I	15	R	6	R	10	R	6	(+)
GESpae049	R	6	R	6	R	6	R	6	S	21	R	6	R	6	S	28	R	12	(+)
GESpae050	R	14	R	10	I	20	I	17	R	13	S	18	R	6	R	13	R	6	(+)

GESpae051	R	6	R	6	I	18	R	11	R	8	R	6	R	6	I	18	R	14	(+)
GESpae052	I	15	R	12	I	20	I	18	R	14	S	22	R	6	R	13	R	8	(+)
GESpae053	I	16	R	12	S	26	I	20	I	16	S	20	R	6	R	13	R	12	(+)
GESpae054	I	17	R	12	S	26	I	20	I	17	S	19	R	6	R	13	R	12	(+)
GESpae055	S	19	R	13	I	20	I	18	R	12	S	21	R	11	R	14	I	16	(+)
GESpae056	R	13	R	9	S	25	I	16	R	12	S	17	R	6	R	13	R	6	(+)
GESpae057	I	16	R	12	S	29	I	18	R	15	S	20	R	6	R	11	R	10	(+)
GESpae058	I	15	R	11	S	27	I	18	R	14	S	20	R	6	R	13	R	10	(+)
GESpae059	I	15	R	11	S	26	I	18	R	15	S	22	R	6	R	14	R	10	(+)
GESpae060	R	6	R	10	S	27	R	13	R	14	S	19	R	6	R	14	R	6	(+)

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A.

**Anexo 9. Perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mediante método automatizado Vitek 2.** La tabla indica el código de la cepa y los antibióticos utilizados en el estudio. Acrónimos, FEP: cefepime, CIP: ciprofloxacino, COL: colistín, TZP: piperacilina/tazobactam, MER: meropenem, AMK: amikacina, GEN: gentamicina, IMI: imipenem, CAZ: ceftazidima y DOR: doripenem.

Código	ANTIBIÓTICOS																			
	FEP	MIC	CIP	MIC	COL	MIC	TZP	MIC	MER	MIC	AMK	MIC	GEN	MIC	IMI	MIC	CAZ	MIC	DOR	MIC
GESpae001	I	16	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae002	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	S	16	R	>8	R	8	R	>32	R	>4
GESpae003	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	I	4	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae004	R	>32	R	>2	S	1	R	>64	R	>8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae005	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae006	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	I	32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae007	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	I	32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae008	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae009	R	32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae010	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	I	4	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae011	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	I	4	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae013	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	I	4	R	>32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae014	R	>32	S	≤0.25	S	≤.5	S	16	R	>8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae015	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	I	4	I	32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae016	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	I	32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae017	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	I	4	S	>8	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae018	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	R	>32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae019	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	I	4	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae021	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	I	32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4

GESpae022	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae023	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae024	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae025	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae026	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae027	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	I	32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae028	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae030	I	16	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	S	4	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae031	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae032	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	I	32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae034	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae036	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	I	4	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae037	R	>32	S	≤.25	S	≤.5	S	≤4	I	4	S	8	R	>8	S	2	R	>32	I	4
GESpae038	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae039	R	32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	S	8	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae040	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae041	R	32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	S	8	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae042	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	I	32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae043	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	R	32	I	8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae044	R	32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	R	32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae045	I	16	R	>2	S	≤.5	R	>64	I	4	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae046	R	32	R	>2	S	≤.5	R	>64	I	4	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae047	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	I	32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae048	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	S	16	R	>8	R	>8	R	16	R	>4
GESpae049	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	S	2	R	>32	R	>8	S	2	I	>32	S	2
GESpae050	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	I	4	I	32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae051	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	>8	R	>32	R	>8	R	>8	R	32	R	>4

GESpae052	R	32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	I	32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae053	I	16	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae054	I	16	R	>2	S	≤.5	R	>64	I	4	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae055	I	16	I	2	S	≤.5	I	64	R	>8	S	≤2	I	8	R	>8	R	32	R	>4
GESpae056	R	>32	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae057	I	16	R	>2	S	≤.5	R	>64	I	4	S	8	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae058	I	16	R	>2	S	≤.5	R	>64	R	8	I	32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4
GESpae059	S	8	R	>2	S	≤.5	R	>64	I	4	S	16	R	>8	R	>8	R	>32	I	4
GESpae060	R	32	R	>2	S	≤.5	R	>64	I	4	I	32	R	>8	R	>8	R	>32	R	>4

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A.

**Anexo 10. Identificación fenotípica y genotípica de enzima GES en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.** La tabla detalla el código de la cepa, resultado de la identificación del gen *bla<sub>GES</sub>* por técnica de PCR y la identificación de la enzima GES por sinergia de doble disco entre ceftazidima e imipenem.

<b>Código</b>	<b>IMI- CAZ</b>	<b>PCR</b>	<b>Código</b>	<b>IMI- CAZ</b>	<b>PCR</b>
GESpae001	+	+	GESpae032	+	+
GESpae002	+	+	GESpae034	+	+
GESpae003	+	+	GESpae036	+	+
GESpae004	+	+	GESpae037	+	+
GESpae005	+	+	GESpae038	+	+
GESpae006	+	+	GESpae039	+	+
GESpae007	+	+	GESpae040	+	+
GESpae008	+	+	GESpae041	+	+
GESpae009	+	+	GESpae042	+	+
GESpae010	+	+	GESpae043	-	+
GESpae011	+	+	GESpae044	+	+
GESpae013	+	+	GESpae045	+	+
GESpae014	-	-	GESpae046	+	+
GESpae015	+	+	GESpae047	+	+
GESpae016	+	+	GESpae048	+	+
GESpae017	+	+	GESpae049	+	+
GESpae018	+	+	GESpae050	+	+
GESpae019	+	+	GESpae051	+	+
GESpae021	+	+	GESpae052	+	+
GESpae022	+	+	GESpae053	+	+
GESpae023	+	+	GESpae054	+	+
GESpae024	+	+	GESpae055	+	+
GESpae025	-	+	GESpae056	+	+
GESpae026	+	+	GESpae057	+	+
GESpae027	+	+	GESpae058	+	+
GESpae028	+	+	GESpae059	+	+
GESpae030	+	+	GESpae060	+	+
GESpae031	+	+			

*Elaborado por:* Méndez, A. & Sarmiento, A.



