PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Caracterización molecular de genes de resistencia a ß-lactámicos, en aislados bacterianos clínicos miembros de la familia Enterobacteriaceae

DUNCAN ESTEBAN CORAL TORRES

Quito, 2020

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Duncan Esteban Coral Torres ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mtr. Maria Fernanda Yauri Bucheli

Directora de la Disertación

Quito, 7 de enero de 2020

“Simplicidad, paciencia y compasión. Estos serán tus mayores tesoros. Sé simple en tus acciones y en tus pensamientos, y regresarás a la fuente del ser. Sé paciente con tus amigos y enemigos, y estarás en concordancia con lo que son las cosas. Sé compasivo contigo mismo, y te reconciliarás con todos los seres del mundo.”

Lao Tzu

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por siempre haberme apoyado, ayudándome a crecer cada día. A mi madre por ser una luz en mi vida, y ser un ejemplo de sacrificio y amor incondicional. A mi hermana, por siempre estar presente y ser un ejemplo de responsabilidad y cariño. A mi padre por su guía y ejemplo.

A mis grandes amigos: Andrea, Camilo, Esteban, Andrés, Nicole, Dayanna, Ignacio, David, Belén, Bryan, Heisel, Gaby e Isabela por todos los momentos que hemos vivido juntos. Gracias por haber sido grandes amigos, me hace feliz haberlos conocidos.

A las personas que integran el laboratorio de microbiología. A Cami y Francisco por su guía, y apoyo a lo largo de este estudio. A Zariana, Andrés y Joss por hacer que las largas horas de trabajo estén llenas de paz y alegría.

Agradezco a la Dra. Iliana Alcocer por haber creído en mí y darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por ser un gran ejemplo no solo de una gran profesional sino de una gran persona, y por haberme inculcado el amor por lo que hago.

A la Mtr. María Fernanda Yauri, por su gran apoyo como directora de esta disertación, siendo siempre una guía, una amiga y demostrándome lo que significa ser un gran profesional.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento de este estudio por medio del Laboratorio de microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas, dirigido por la Dra. Iliana Alcocer.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN 1
2. ABSTRACT 2
3. INTRODUCCIÓN 3
OBJETIVOS 7
OBJETIVO GENERAL 7
OBJETIVO ESPECÍFICOS 7
4. MATERIALES Y MÉTODOS 9
4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO 9
4.2. IDENTIFICACIÓN FENOTIPICA 9
4.3. PERFILES FENOTÍPICOS DE RESISTENCIA 12
4.4. EXTRACCIÓN DE ADN 14
4.5. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA 15
4.6. SECUENCIAMIENTO DE PRODUCTOS DE PCR 17
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS 17
5. RESULTADOS 18
5.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO 18
5.2. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE RESISTENCIA 18
5.3. DETECCIÓN MOLECULAR DE LA PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA 19
5.4. IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES ALÉLICAS 20
6. DISCUSIÓN 21
7. CONCLUSIONES 27
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 28
9. FIGURAS 36
10. TABLAS 39
11. ANEXOS 48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de especies identificadas de la población del estudi.....37

Figura 2. Porcentaje de origen de los aislado 37

Figura 3. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen blaCTX-M-15 38

Figura 4. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen blaTEM 38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos de origen de los aislados analizados 40

Tabla 2. Concentraciones de cada antimicrobiano probado por el sistema VITEK 2™ 41

Tabla 3. Nombre, siglas, concentraciones y rangos de cada antimicrobiano probado por el sistema Difusión en disco 42

Tabla 4. Cebadores utilizados para la detección de genes de resistencia productores de BLEE 43

Tabla 5. Cebadores utilizados para la detección de genes de resistencia productores de carbapenemasas 43

Tabla 6. Pruebas bioquímicas 44

Tabla 7. Perfil de resistencia a antimicrobianos β-lactámicos, BLEE, por el método de difusión en disco. Y resistencia a carbapenems por THM 45

Tabla 8. Perfil de resistencia a antimicrobianos β-lactámicos, BLEE y carbapenems por el método de automatizado VITEK 2™ 46

Tabla 9. Presencia y ausencia de los genes *bla*C_{TX-M}-15, *bla*$_{TEM-1}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$ y *bla*$_{NDM}$. 47

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Estructura química de los β-lactámicos Estructura química de los β-lactámicos 49

Anexo 2. Mecanismos de acción de los β-lactámicos islados 49

1. RESUMEN

Las infecciones por enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) son uno de los factores que más altas tasas de mortalidad y morbilidad producen en ambientes hospitalarios. Por su capacidad de hidrolizar los antibióticos β-lactámicos, usados en su tratamiento. El objetivo de este estudio fue caracterizar los genes que confieren resistencia a antibióticos β-lactámicos en Enterobacterias provenientes de aislados clínicos colectados en un hospital de tercer nivel de la ciudad de Quito, entre octubre del 2016 a mayo del 2017. Se colectaron 153 aislados, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y se identificó su especie por medio pruebas bioquímicas. Para este estudio se seleccionaron los aislados que presentaban producción de enzimas BLEE, este criterio se analizó mediante el método de sinergia de doble disco y sus resultados fueron cotejados con los proporcionados por el centro hospitalario. Se seleccionaron 22 aislados de los cuales 19 fueron identificados como *Escherichia coli* y 3 como *Klebsiella oxytoca*. Los perfiles de resistencia se realizaron por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, en el cual se detectaron altos niveles de resistencia a ampicilina y cefazolina. Además, se probó la capacidad de los aislados de producir enzimas carbapanemasas por el Test de Hodge Modificado (THM), sin embargo, ningún aislado presentó esta capacidad. El análisis de la presencia de los genes de resistencia se realizó con reacción en cadena de la polimerasa empleando cebadores específicos para cada gen codificante de BLEE (*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, *bla*$_{\text{TEM}}$, *bla*$_{\text{SHV}}$) y de enzimas carbapenemasas (*bla*$_{\text{KPC}}$, *bla*$_{\text{IMP}}$, *bla*$_{\text{VIM}}$, *bla*$_{\text{NDM}}$). Para la identificación de la variante alélica, los productos de amplificación fueron secuenciados y analizados. 11 aislados presentaron el gen *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ y 4 el gen *bla*$_{\text{TEM-1}}$. Ninguno de los 22 aislados presento genes de resistencia a carbapenémicos. La presencia de los genes *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ (50%) y *bla*$_{\text{TEM-1}}$ (18,18%), tiene similitudes con lo reportado en otros estudios en Latinoamérica. La predominancia del gen *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ en la población estudiada, denota la capacidad de propagarse de este tipo de genes de resistencia, característica que es observada a nivel mundial.

Palabras clave: β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), enterobacterias, genes de resistencia, resistencia bacteriana, variante alélica.

2. ABSTRACT

Infections with extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing bacteria can cause high mortality and morbidity rates in hospital environments, since they are capable of hydrolyzing β-lactam antibiotics, used in their treatment. The main objective of this study was to characterize genes that confer resistance to β-lactam antibiotics from clinical isolates collected in a third level hospital in Quito, between October 2016 to May 2017. 153 samples were collected, all of them corresponded to the Enterobacteriaceae family and species identification was carried out through biochemical tests. For this study, isolates that showed production of ESBL enzymes were selected, this criterion was analyzed using the double disc synergy method and its results were collated with those provided by the hospital. 22 isolates were selected, of which 19 were identified as *Escherichia coli* and 3 as *Klebsiella oxytoca*. Resistance profiles were performed by the Kirby-Bauer disk diffusion method, in which high levels of resistance to ampicillin and cefazolin were detected. Additionally, the ability of isolates to produce carbapanemasse enzymes was tested by the Modified Hodge Test (MHT), however, no isolate presented this capacity. The genetic presence of the resistance conferring genes was carried out through polymerase chain reaction using primers specific for each ESBL encoding gene (*bla*$_{CTX-M-15}$, *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$) and carbapenemases enzimes (*bla*$_{KPC}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{NDM}$). For the identification of the allelic variant, the amplification products were sequenced and analyzed. 11 isolates presented the *bla*$_{CTX-M-15}$ gene and 4 the *bla*$_{TEM-1}$ gene. None of the 22 isolates presented carbapenemic resistance genes. The presence of the *bla*$_{CTX-M-15}$ (50%) and blaTEM-1 (18.18%) genes are similar to the reports of other studies in Latin America. The presence of the *bla*$_{CTX-M-15}$ (50%) and *bla*$_{TEM-1}$ (18.18%) genes has similarities with those reported in other studies in Latin America. The predominance of the *bla*$_{CTX-M-15}$ gene in the studied population, denotes the ability to spread of this type of resistance gene, a characteristic that is observed worldwide.

Keywords: allelic variant, bacterial resistance, Enterobacteriaceae, extended spectrum betalactamases (ESBL), resistance genes.

3. INTRODUCCIÓN

La familia Enterobacteriaceae comprende más de 30 géneros y alrededor de 100 especies bacterianas. Los miembros de esta familia son bacterias Gram negativas, de forma bacilar y están presentes en el intestino de humanos y otros animales homeotermos, donde forman parte de la microbiota natural (CDC, 2013). Esta familia alberga géneros de importancia clínica, como: *Escherichia, Shigella, Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Salmonella* y *Citrobacter*. Las especies patógenas producen infecciones oportunistas, en especial a pacientes hospitalizados, con sistemas inmunitarios comprometidos: pacientes con VIH, pacientes oncológicos, niños o ancianos (Adeolu, Alnajar, Naushad y Gupta, 2016).

Las infecciones producidas por este grupo de organismos son tratadas, principalmente, con antibióticos del grupo de los β-lactámicos, los cuales comprenden: penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, monobactámicos y carbapenémicos (Blanco et al., 2016). Estos antibióticos son amidas cíclicas que constan de tres átomos de carbono y un átomo de nitrógeno unidos por un enlace beta (Anexo 1). Estos antibióticos actúan debilitando la pared celular bacteriana al inhibir la última etapa de la síntesis del peptidoglicano, un polímero de azúcares y aminoácidos que da forma y resistencia osmótica a la pared. El proceso de formación de la pared celular bacteriana es un proceso dinámico, donde síntesis y autolisis se dan simultáneamente. Al interrumpir el proceso de formación de la pared, el proceso de autolisis continúa, matando finalmente a la célula bacteriana (Zeng y Lin, 2013; Cho, Uehara y Bernhardt, 2014). Un esquema de este proceso se puede observar en el anexo 2.

Un grupo importante de antibióticos β-lactámicos lo constituyen los carbapenémicos. Este tipo de antibiótico cuenta con un mayor espectro de actividad y con una mayor resistencia a las enzimas β-lactamasas. Por esta razón, son empleados como tratamiento alternativo eficaz en casos de infecciones producidas por bacterias multirresistentes. Su mecanismo de acción es similar al de β-lactámicos tradicionales, pero su efectividad y estabilidad son mucho mayores (Doi, Iovleva y Bonomo, 2017). Esto se debe a la presencia de un carbono en la posición C-1 y a la

configuración trans del anillo β-lactámico en los carbonos C-5 y C-6, aumentando su estabilidad frente a enzimas β-lactamasas (Zeng y Lin, 2013).

En la actualidad, la eficacia de estos agentes se ha reducido por el desarrollo de diversos mecanismos de resistencia como: 1) producción de enzimas tipo β-lactamasas que inactivan al antibiótico por hidrólisis; 2) modificación del sitio blanco de acción, disminuyendo la afinidad de unión del antibiótico a la bacteria; 3) cierre de canales porinas, disminuyendo la permeabilidad de la célula bacteriana al antibiótico, y 4) bombas activas, que extraen el antibiótico desde el interior de la célula al exterior (Zeng y Lin, 2013; Cho, Uehara y Bernhardt, 2014; Shaikh, Fatima, Shakil, Rizvi y Kamal, 2015).

Las β-lactamasas son enzimas producidas por bacterias Gram positivas y negativas. Estas enzimas poseen en su sitio activo una molécula de serina o un ion de zinc, los cuales interactúan con los antibióticos β-lactámicos hidrolizando el anillo β-lactámico e inactivando su función antibiótica (Shaikh et al., 2015). Según Ambler James y Penley (1980), las β-lactamasas se pueden clasificar de acuerdo a su similitud aminoacídica en 4 clases: clase A, clase B, clase C y clase D. Las clases A, B y C son considerados serin-β-lactamasas por el residuo de serina presente en el sitio activo de la enzima. La clase B son enzimas tipo metalo-β-lactamasas por la presencia del ión metálico zinc presente en el sitio activo de la enzima. Las β-lactamasas clase A son las enzimas más descritas, tanto en bacterias Gram Negativas como en Gram positivas. En este grupo se encuentran las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), que son enzimas codificadas por genes cromosómicos y plasmidiales. Estas enzimas comprenden las β-lactamasas SHV, TEM, CTX-M, Amp-C y PER (D'Andrea, Arena, Pallecchi y Rossolini, 2013; López, Torres y Prada , 2016).

Entre las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), el tipo CTX-M es el grupo de mayor importancia clínica en la actualidad. La mayoría de estudios que involucran bacterias productoras de BLEE, reportan este grupo (Brolund y Sandegren, 2016). El grupo CTX-M fue descrito por primera vez, a partir de un aislado de *E. coli* en el año 1989 en Munich, Alemania. Debe su nombre a la capacidad de producir la enzima cefotaximasa, que confiere resistencia a la

cefotaxima (Cantón, González y Galán, 2012). Se originó a partir de genes cromosomales presentes en miembros del género *Kluyvera*. Este género de bacterias comprende varias especies ambientales y no suelen estar relacionadas con reportes clínicos (Rossolini, Andrea y Mugnaioli, 2008; Bevan, Jones y Hawkey, 2017).

La familia CTX-M se divide en 6 grupos.: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-8, CTX-M-25 y KLUC, a los cuales pertenecen 210 variantes reportados actualmente (Ding et al., 2018). El grupo CTX-M-1 y el CTX-M-9 son los que tienen una mayor distribución a nivel mundial, siendo la variante CTX-M-15, que pertenece al grupo CTX-M-1, la que mayor prevalencia tiene (Bevan et al., 2017; Ding et al., 2018; Rivoarilala, Garin, Andriamahery y Collard, 2018).

Las enzimas BLEE del tipo TEM fueron identificadas por primera vez en una *E. coli,* en Atenas (Grecia) en 1965. La paciente de la cual se aisló la primera *E. coli* portadora de esta enzima se llamaba Temoneira, lo que sirvió de inspiración para nombrar “TEM” a esta enzima. Este tipo de enzimas fueron ampliamente reportadas en casos de resistencia a β-lactámicos entre bacterias Gram negativas a finales de los años 90s. En la actualidad, se han reportado 180 variantes de esta enzima, siendo las variantes TEM-1 y TEM-2 las que tienen mayor distribución a nivel mundial. Estas enzimas, son responsables de resistencia a penicilina, ampicilina y cefalosporinas de primera generación (López Velandia, Torres Caycedo y Prada Quiroga, 2016).

Las enzimas tipo SHV fueron descritas por primera vez en 1983, a partir de un aislado de *E. coli*. Su nombre se debe a que presentan una variación en su grupo sulfhidrilo (sulfhydryl variable). Esta variación les otorga gran actividad de resistencia frente a penicilinas y cefalosporinas (López Velandia et al., 2016). Actualmente existen 237 variantes de esta enzima.

Al igual que las enzimas BLEE, las enzimas carbapenemasas pertenecen a las distintas clases dentro de la clasificación de Ambler (Ambler, James y Penley, 1980). En las betalactamasas clase A se encuentra la carbapenemasa tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) reportada en 2001 en Carolina del Norte, a

partir de una *K. pneumoniae* (Yigit et al., 2001). Este tipo de carbapenemasa es considerada como una de las más comunes a nivel mundial, en especial entre aislados de *K. pneumoniae*. Además, e han reportado casos de carbapenemasas KPC en otras especies de la familia Enterobacteriaceae (O'Hara et al., 2014). Este tipo de carbapenemasa se ha convertido en endémica del continente americano, así como parte del sur de Europa. En la base de NCBI (National Center for Biotechnology Information) existen 40 variantes del gen *bla*$_{KPC}$. El primer reporte de una *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa en Ecuador lo realizó Iñiguez et al., en el año 2012, en la ciudad de Azogues, provincia de Cañar. Este tipo de resistencia también se registró en las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca en el año 2013 por Zurita et al.

Otra de las principales enzimas carbapenemasas son las tipo NDM (New Delhi metallo-β-lactamasa), que pertenecen a la clase B, de la clasificación de Ambler (Ambler ,James y Penley, 1980). En los últimos años, se ha convertido en una de las principales carbapenemasas en Asia. De donde se ha distribuido a partes de América y Europa, debido a la gran cantidad de turistas provenientes de dichas zonas (Woerther, Andremont y Kantele, 2017). Existen al menos 8 variantes de la enzima, la mayoría de los cuales se han reportado en aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* (Codjoe y Donkor, 2017; Kelly, Mathema y Larson, 2017). Dentro de esta clase de carbapenemasas, también se encuentran los tipos Imipenem-resistant Pseudomonas (IMP) y el tipo Verona integron-encoded metallo-β-lactamasa (VIM). Las carbapenemasas del tipo IMP presentan 18 variantes, las cuales se presentan en aislados del género *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, aunque también se han observado en miembros de la familia Enterobacteriaceae. Enzimas tipo VIM, que cuentan con 14 variantes, también se han reportado en *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida* y escasamente reportadas entre enterobacterias (Codjoe y Donkor, 2017; Kelly et al., 2017).

La resistencia mediada por enzimas se ha incrementado en los últimos años, convirtiéndose en uno de los problemas más graves que la salud pública mundial debe afrontar. En el informe de la Organización Mundial de la Salud del 28 de enero de 2018 se reconoce que esta problemática es una realidad en cualquier parte del mundo. El problema se agrava al considerar que muchos de los miembros de la

familia Enterobacteriaceae son resistentes a múltiples drogas (OMS, 2018). El Ecuador no es ajeno a esta realidad y desde el año 2010 se ha reportado un incremento de la resistencia bacteriana (Zurita, 2012). Datos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) muestran que, en el año 2014, 30269 personas fueron diagnosticadas con enfermedades relacionadas con infecciones bacterianas (INEC, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) busca potenciar la investigación para el descubrimiento y desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico rápidas y efectivas. Además de nuevos antimicrobianos capaces de inhibir mecanismo de acción de resistencia existentes en bacterias patógenas. El descubrimiento de este tipo de antimicrobianos es una necesidad urgente, cuyos esfuerzos deben enfocarse en las familias de bacterias que representen la mayor amenaza a la salud pública (OMS, 2018).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los genes que confieren resistencia a antibióticos β-lactámicos en Enterobacterias provenientes de aislados clínicos colectados en un hospital de tercer nivel en la ciudad de Quito, Ecuador.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Colectar aislados bacterianos de origen hospitalario resistentes a los principales antibióticos β-lactámicos.
- Identificar la especie de los aislados bacterianos obtenidos mediante el uso de pruebas bioquímicas.
- Analizar la sensibilidad a los principales grupos de antibióticos por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer.

- Identificar la presencia o ausencia de los genes que confieren resistencia a antibióticos β-lactámicos mediante la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Definir la variante alélica de las enzimas de espectro extendido (BLEE) por análisis de secuencias.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los aislados bacterianos fueron colectado de un centro hospitalario de tercer nivel de la ciudad de Quito, Ecuador, entre los meses de octubre del 2016 a mayo del 2017. Los aislados se obtuvieron de diferentes casos clínicos tratados en dicho centro hospitalario. Se solicitó al hospital que proporcione únicamente aislados clínicos que hayan sido identificados como parte de la familia Enterobacteriaceae. El total de aislados colectados fue de 153. En esta disertación se trabajó con 22 aislados seleccionados por la producción enzimática de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE).

4.2. IDENTIFICACIÓN FENOTIPICA

Para confirmar la identificación de cada aislado proporcionado por el centro hospitalario se procedió a realizar una batería de pruebas bioquímicas. Estas comprenden el uso de varios medios diferenciales, para los cuales existen guías que nos permiten identificar el género y especie de las bacterias analizadas. Los medios de cultivo utilizados en este estudio fueron manufacturados por la empresa Difco™, y su forma de acción se detallará a continuación:

Agar Citrato de Simmons: proporciona a la bacteria inoculada citrato como única fuente de carbono y sales de amonio como fuente de nitrógeno. Si los microorganismos son capaces de utilizar estos compuestos crecerán en el medio aumentando su alcalinidad. El medio cuenta con un indicador llamado azul de bromotimol, el cual es de color verde cuando el pH es menor a 6,9. Al aumentar la alcalinidad cambia su color de verde a azul, siendo éste tomado como un resultado positivo (Alcocer, 2010).

Agar triple azúcar y hierro (TSI): este medio contiene tres azúcares (glucosa sucrosa y lactosa), además contiene sulfato ferroso, peptonas y el indicador rojo fenol, el cual es sensible a los cambios de pH. La utilización de los azúcares puede

ocurrir de forma aerobia en el ápice del medio (oxidación) y de forma anaerobia (fermentación) en la base del medio. En los dos procesos, durante las primeras 6 horas de incubación, el microorganismo fermentara la glucosa, después usará la sucrosa hasta las 12 horas de incubación y finalmente utilizara la lactosa hasta las 24 horas de incubación. El uso de los azúcares acidificará el medio, tornándolo de color amarillo. Dependiendo de la capacidad de cada microorganismo para procesar los azúcares, se tendrán diversos resultados (Alcocer, 2010).

Si el microorganismo es capaz de utilizar solamente la glucosa, se observará una coloración rojiza en el ápice y una coloración amarilla en la base del medio. Esto se debe, a que la baja concentración de glucosa en el medio (0,1%), será utilizada en su totalidad hasta las 18 horas. Posterior a esto, el microorganismo utilizara las peptonas presentes en el medio para su crecimiento y liberara amonio (NH_3), alcalinizando el ápice del medio. Debido a que la fermentación en la base del medio de cultivo produce ácidos más estables que la oxidación, la base mantendrá su color amarillo (Alcocer, 2010).

Si el microorganismo es capaz de utilizar los 3 azucares presentes en el medio, acidificara el ápice y la base del mismo. La sucrosa y lactosa se encuentran en una concentración 10 veces mayor a la glucosa, por lo cual al acabar las reservas de glucosa la bacteria tendrá muchos azucares para seguir utilizándolos, dando una coloración amarilla a todo el medio (Alcocer, 2010).

Si el microorganismo no es capaz de utilizar los azucares presentes en el medio. Utilizará las peptonas presentes en el mismo para su crecimiento, lo que alcalinizará el medio dando un color rojo tanto en el ápice como en la base. Los microorganismos que suelen presentar este tipo de reacción, son los bacilos Gram-negativos no entéricos (Alcocer, 2010).

Además de la capacidad de utilizar azucares, también se puede evidenciar la capacidad de generar gas CO_2, como resultado de la fermentación de azucares por parte del microorganismo. Y la capacidad de producir gas sulfhídrico H_2S, ya que el microorganismo degrada el tiosulfato de sodio, presente en el medio, produciendo H_2S. Este H_2S reacciona con el sulfato ferroso del medio, dando una coloración

negra al mismo. Para que este proceso se realice, es necesaria la fermentación de azucares (Alcocer, 2010).

Motilidad, Indol, Lisina (MIL): este medio evalúa la motilidad, la presencia de enzimas triptofanasas y la presencia de la enzima lisina deaminasa y lisina descarboxilasa. Al ser un medio semisólido, las bacterias motiles, podrán irradiar a partir de la inoculación central, mientras que las no motiles solo crecerán en dicha inoculación. Si la bacteria es capaz de oxidar el triptófano producirá acido pirúvico, amoníaco e indol. Este último producto reaccionará al añadir el reactivo de Kovacs y da lugar a un color rojizo en el reactivo como resultado de la unión del indol con el 4-dimetilaminobenzaldehido contenido en el reactivo. Esto se indica como una reacción positiva, mientras que una coloración amarillenta indica un resultado negativo (Alcocer, 2010; BD Diagnostics, 2009).

Para la prueba de lisina deaminasa y lisina descarboxilasa el medio cuenta con el púrpura de bromocresol como indicador de pH. Para que las enzimas funcionen el medio debe encontrarse con un pH ácido, lo cual se da por la previa utilización de la glucosa, presente en el medio, por parte del microorganismo. La acidificación del medio, se evidenciará por la coloración amarilla del mismo, alrededor las 6 horas a partir de la incubación. Si el microorganismo presenta la enzima lisina descarboxilasa, descarboxilará el aminoácido produciendo como resultado final la cadaverina. En grandes cantidades, la cadaverina alcaliniza el medio y lo tornará nuevamente a su color púrpura original, lo cual se tomará como un resultado positivo. En cambio, si la parte inferior del medio presenta una coloración amarillenta, se considerará como un resultado negativo. Si el microorganismo también presenta lisina deaminasa se observará una coloración roja en la parte superior del medio (Alcocer, 2010; Manual Dalynn Biologicals, 2014).

Motilidad, Indol, Ornitina (MIO): este medio comparte ciertas similitudes con el medio MIL. Permite probar la motilidad, la presencia de triptofanasas por medio de la producción del indol y además cuenta con el indicador de pH púrpura de bromocresol. Pero a diferencia del medio MIL, este medio permite probar la presencia de la enzima ornitina descarboxilasa. Al fermentar la dextrosa presente en el medio lo acidifica tornando amarillo al color del medio. Esta fermentación

proporciona las condiciones necesarias para la decarboxilación de la ornitina, aumenta el pH del medio y lo tornan nuevamente de color púrpura. Si el medio mantiene la coloración amarilla se considera como un resultado negativo, mientras que una coloración purpura es considerado un resultado positivo (Alcocer, 2010).

Rojo de Metilo Vogues Proskauer (RM/VP): esta prueba se basa en los diferentes tipos y proporciones de los productos resultantes de la fermentación de la glucosa. Existen dos tipos de fermentaciones:

La fermentación ácido-mixta presenta como productos finales los ácidos: láctico, acético y fórmico los cuales acidifican el medio. Al momento de adicionar el indicador de pH, rojo de metilo, si estos productos se encuentran presentes, la acidez del medio torna de color rojo al indicador, lo que se considera como RM positivo. El pH al cual el indicador presenta la coloración roja es por debajo de 4,4 (Alcocer, 2010).

El segundo tipo de fermentación es la fermentación del 2,3 butanodiol. El producto de esta reacción es la acetoína (acetil-metil-carbonilo), la cual mantendrá el medio con un pH neutro. Al adicionar el indicador de pH alfa naftol, este se tornará de un color rojo, indicando una reacción VP positiva (Alcocer, 2010).

4.3. PERFILES FENOTÍPICOS DE RESISTENCIA

El centro hospitalario proporcionó, junto a los aislados bacterianos, los perfiles de resistencia obtenidos a través del sistema automatizado VITEK 2™. El sistema funciona determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los antibióticos analizados mediante el uso de tarjetas que contienen distintos antibióticos. Los antibióticos usados para cada aislado se encuentran listados en la Tabla 1.

En el laboratorio de microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) se realizaron análisis de sensibilidad a antimicrobianos empleando el método de difusión en disco Kirby-Bauer (Bauer, Kirby, Sherris y Turck, 1966; CLSI, 2017).

Por este método se inoculó en caldo de infusión cerebro-corazón (BHI por sus siglas en inglés) los aislados provenientes de la prueba bioquímica TSI que fue utilizada en la identificación fenotípica. Los aislados bacterianos se incubaron a 37 °C por 24 horas a partir de este cultivo en placas de agar nutriente, del cual se obtuvieron colonias aisladas. Al culminar este tiempo, se transfirieron entre 3 a 5 colonias aisladas y bien definidas a caldo Müeller-Hinton (MHB). Se midió su turbidez, con la ayuda del espectrofotómetro BioPhotometer plus de la marca Eppendorf, hasta obtener una medida de 0,5 en la escala de McFarland, la cual corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (CLSI, 2017).

Esta suspensión se sembró en placas de agar Müeller-Hinton (MHA), con la ayuda de cotonetes estériles, en 3 planos rotando la placa 90° por cada plano. Toda la superficie del agar quedó cubierta por una capa uniforme de bacteria que permita una correcta medición de los halos de inhibición. Posterior a la siembra de la bacteria a evaluar, los discos de antibióticos fueron colocados de manera equidistante, con la ayuda de una pinza estéril. Se esperó de 10 a 15 minutos para que los discos se adhieran a la superficie del agar, antes de la incubación de las placas. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 18 horas. Todo este proceso se realizó dentro de los primeros 15 minutos, a partir de la obtención del 0,5 de McFarland y su posterior inoculación (CLSI, 2017).

Los discos de antibióticos utilizados en la determinación de la sensibilidad antibiótica fueron: Ampicilina (10 µg), Ampicilina/Sulbactam (10 µg/10 µg), Piperacilina/tazobactam (100 µg/10 µg), Cefazolina (30 µg), Cefoxitina (30 µg), Ceftriaxona (30 µg), Cefepima (30 µg), Gentamicina (10 µg), Tobramicina (10 µg), Amikacina (30 µg), Ácido nalidíxico (30 µg), Norfloxacina (10 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Levofloxacina (5 µg), Trimetoprima/sulfametoxazol (25 µg) y Aztreonam (30 µg). Se midieron los diámetros de los halos de inhibición obtenidos para cada antibiótico. La interpretación de los resultados siguió los lineamientos establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, CLSI (2017) y se encuentran detallados en la tabla 2.

Para la identificación fenotípica de los aislados productores de BLEE se empleó el método de sinergia de doble disco. En una placa de MHA se inoculó, parte

de la suspensión bacteriana que dió una lectura de 0,5 de McFarland. Se colocaron discos de Cefotaxima (5 µg), Cefotaxima/Ácido Clavulánico (30 µg/10 µg), Ceftazidima (30 µg) y Ceftazidima/Ácido Clavulánico (30 µg/10 µg). Después de incubar por 18 horas a 37 °C, se midió el diámetro del halo de inhibición. Si el halo de inhibición del antibiótico más el inhibidor es 5 mm mayor al del antibióticos sin inhibidor se reporta como una prueba positiva a la producción de BLEE (CLSI, 2017).

La identificación fenotípica de producción de carbapenemasas se realizó por el Test de Hodge Modificado (THM). Se preparó una suspensión de la cepa ATCC 25922de *E. coli* al 0,5 en la escala de McFarland. A continuación, se sembró la suspensión en una placa de MHA, siguiendo la metodología utilizada para los análisis anteriores. Una vez inoculada la placa, se colocó un disco de meropenem (10µg) en el centro de la placa. Con la ayuda de un cotonete estéril, se inoculó en línea recta al microorganismo a analizar, el cual partió del extremo del disco al borde de la placa. Este proceso se repitió en 2 ocasiones, una con la cepa control positivo (*K. pneumoniae* ATCC BAA 1705) y otra con la cepa control negativo (*K. pneumoniae* ATCC BAA 1706). Finalmente, se incubaron las placas a 37 °C por 24 horas. Para la interpretación de los resultados, se observó la interacción entre el organismo analizado y la cepa ATCC 25922 de *E. coli*. Si el microorganismo es capaz de degradar el antibiótico (meropenem) permitirá que la cepa ATCC 25922 de *E. coli* (sensible al antibiótico) pueda crecer formando una hendidura, similar a la forma de un trébol (CLSI, 2017).

4.4. EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción del ADN bacteriano se inocularon los aislados en caldo tripticasa de soya (TSB) e incubaron a 37 °C por 18 horas. A partir de esta suspensión se extrajo el ADN bacteriano de los aislados positivos a las pruebas fenotípicas de BLEE. Se empleó el kit comercial de extracción de ADN total “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”, de la marca Promega®. Se utilizó la guía para extracción de ADN de bacterias Gram negativas proporcionada por el fabricante Promega (2010).

Se colocó 1 ml de la suspensión bacteriana en un microtubo de 1,5 mL se centrifugó a 13000 rpm x g por 2 minutos para precipitar a las células bacterianas y se descartó el sobrenadante. A continuación, se agregó 600 µL de solución de lisis nuclear, se mezcló gentilmente e incubó por 5 minutos a 80 °C. Los tubos se enfriaron a temperatura ambiente. A continuación, se colocó 3 µL de solución de ARNasa y se incubó a 37 °C por 1 hora. Para precipitar las proteínas, se agregó 200 µLde solución de precipitación de proteínas y se agitó con suavidad. Se incubó en hielo por 5 minutos y se centrifugó la solución a 13000 rpm x g por 3 minutos. Con ayuda de una micropipeta se extrajo el sobrenadante procurando evitar la sustancia blanquecina que se formó. El sobrenadante se colocó en un microtubo estéril nuevo conteniendo 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente, mezclándolo delicadamente. Se procedió a centrifugar a 13000 rpm x g por 2 minutos y luego se descartó el sobrenadante. Al precipitado se colocó 600 µL de etanol al 70 %, a temperatura ambiente y se centrifugó por 2 minutos a 13000 rpm x g. Finalmente, se aspiró el etanol y se dejó secar los tubos invertidos y con las tapas abiertas por 15 minutos. Para rehidratar el ADN, se agregó 100 µL de solución rehidratante dejándolo actuar a 4 °C toda la noche. El ADN obtenido fue congelado a -20 °C. Se obtuvieron alícuotas de 20 µL con las cuales se trabajó (Promega, 2010).

4.5. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA

La detección de la presencia de genes que confieren resistencia se realizó con la prueba molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los genes amplificados y relacionados con la producción de BLEE fueron: *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CTX-M}$ y *bla*$_{SHV}$ (Tabla 4). Los cebadores utilizados fueron específicos para cada gen. Para la producción de carbapenemasas, los genes analizados fueron: *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM,}$ *bla*$_{KPC}$ y *bla*$_{NDM}$ (Tabla 5).

El volumen final de cada reacción PCR fue de 25 µL y contenía:12,5 µl de GOTaq® Green Master Mix (Thermo Scientific™), 9,5 µl de Agua libre de nucleasas, 1µL de cada cebador (10 µM) y 1 µl de ADN (10 ng/µL).

El protocolo de amplificación utilizado para el gen *bla*$_{TEM}$ consistió de una denaturación inicial de 94 °C por 5 min, seguida por 25 ciclos de denaturación a 94

°C por 1 min, hibridación de cebadores a 50 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min. La fase de extensión final fue a 72 °C por 8 min (Ranjbar, Ardashiri, Samadi y Afshar, 2018). Para *bla*$_{CTX-M}$, el protocolo utilizado fue: denaturación inicial de 94 °C por 3 min, seguida por 25 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 s, hibridación de cebadores a 59 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min, finalizando con una fase de extensión a 72 °C por 10 min (Fatemeh et al., 2016; Fadil Saedii, Abdelraheim, Abdel Aziz y Swelam, 2017). El gen *bla*$_{SHV}$ usó una denaturación inicial de 94 °C por 2 min, seguida por 25 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 s, hibridación de cebadores a 55 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min. La extensión final fue a 72 °C por 7 min (Kang et al., 2019). Las secuencias de cada uno de estos cebadores se encuentran en la tabla 4.

Para *bla*$_{NDM}$, se utilizó una denaturación inicial de 94 °C por 10 min, seguida por 25 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 s, hibridación de cebadores de 52 °C por 40 s y extensión a 72 °C por 50 s. La fase de extensión final fue a 75 °C por 5 min (Cilveti, 2013). El protocolo para *bla*$_{VIM}$ y *bla*$_{IMP}$ fue: una denaturación inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 30 ciclos de denaturación a 95 °C por 1 min, hibridación de cebadores a 52 °C por 1 min y una extensión a 72 °C por 2 min. La fase de extensión final fue a 72 °C por 10 min (Cilveti, 2013). Para *bla*$_{KPC}$ el protocolo fue una denaturación de 94 °C por 5 min, a continuación 30 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 s, hibridación de cebadores a 55 °C por 30 s y extensión 72 °C por 30 s La fase de extensión final fue a 72 °C por 10 min (Cilveti, 2013). Las secuencias de cebadores pueden encontrarse en la tabla 5.

El termociclador utilizado fue el MultiGene™ Termociclador de Gradiente (modelo TC9600-G-) de la empresa LabNet Internacional. Para cada PCR se utilizó un control positivo que evidenció el buen funcionamiento de los cebadores y protocolos utilizados. El control negativo descartó factores externos (contaminación cruzada) capaces de alterar los resultados obtenidos.

Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis convencional a 100 V por 1 hora, en geles de agarosa al 1%. El buffer utilizado para los geles y la corrida electroforética fue TBE 0,5X (44,5mM Tris Base, 44,5 mM ácido bórico, 12,5mM EDTA). El marcador de peso molecular utilizado fue TrackIt™ 100

pb ADN Ladder (Invitrogen). La tinción se realizó con SYBR® Gold 10.000x (Invitrogen). Para la visualización del gel se empleó el sistema de captura de imagen Molecular Imager ® Gel Doc TM XR+ (BIO-RAD).

4.6. SECUENCIAMIENTO DE PRODUCTOS DE PCR

Los productos de amplificación que presentaron el peso molecular correspondiente al gen determinado fueron enviados a la empresa MACROGEN Inc., Corea del Sur, para su purificación y secuenciamiento. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos correspondiente a cada gen analizado, obtenidas de la base de datos del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). El análisis se realizó con el programa GENEIOUS® Prime 2019, versión 2019.2.1.

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para los análisis porcentuales y de frecuencias se utilizó el programa Excel 2016 de Microsoft.

5. RESULTADOS

5.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

De los 153 aislados provenientes del centro hospitalarios, se seleccionaron los que presentaron el fenotipo BLEE. El cual fue analizado por el método de sinergia de doble disco (14 aislados) o por el método automatizado VITEK 2™ (21 aislados). Se comparó los aislados positivos por cada método, y se seleccionó los que fueron positivos para al menos uno de ellos. Se obtuvo que 22/153 aislados presentaban este fenotipo.

De los 22 aislados fenotípicamente analizados, 19/22 (86,4%) aislados fueron identificados como *Escherichia coli*, mientras que los 3/22 (13,4%) aislados eran individuos de la especie *Klebsiella oxytoca* lo cual representa el (Figura 1). Los resultados de las pruebas bioquímicas obtenidas para cada una de las especies identificadas se encuentran en la Tabla 6.

El origen de los aislados mostró que 12/22 (54,55%) aislados fueron obtenidos a partir de muestras de orina, 4/22 (18,18%) de heridas quirúrgicas, 2/22 (9,09%) punta de catéteres, 1/22 (4,55%) líquido peritoneal, 1/22 (4,55%) secreción de herida quirúrgica, 1/22 (4,55%) sangre y 1/22 (4,55%) de secreción de muñón de histerectomía (Figura 2).

5.2. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE RESISTENCIA

Los valores resultantes de las pruebas de difusión en disco fueron tomados en cuenta, y se las complemento con los resultados entregados por el centro hospitalario. De estas pruebas se determinó que 22/22 (100%) fueron resistentes a ampicilina, 14/22 (63,64%) a ampicilina/sulbactam, 3/22 (13,64%) a piperacilina/tazobactam, 20/22 (90,91%) a cefazolina, 2/22 (9,09%) a cefoxitina, 18/22 (81,82%) a ceftriaxona, 8/22 (36,36%) a cefepima, 3/22 (13,64%) a gentamicina, 2/22 (9,09%) a tobramicina, 1/22 (4,55%) a amikacina, 16/22 (72,73%) a ácido nalidíxico, 15/22 (68,18%) a norfloxacina, 15/22 (68,18%) a ciprofloxacina,

14/22 (63,64%) a levofloxacina, 12/22 (54,55%) a trimetoprima/sulfametoxazol y 13/22 (59,09%) a aztreonam (Tabla 7).

Los resultados de los antibióticos analizados por el método automatizado VITEK 2™ fueron: 2/2 (100%) resistentes a ampicilina, 16/22 (72,73%) a ampicilina/sulbactam, 4/20 (20%) a piperacilina/tazobactam, 1/2 (50%) a cefalotina, 1/2 (50%) a cefuroxima, , 1/11 (9,09%) a cefoxitina, 18/20 (90%) a ceftazidima, 19/21 (90,48%) a ceftriaxona, 19/21 (90,48%) a cefepima, 1/22 (4,55%) a amikacina, 3/22 (13,64%) a gentamicina, 16/22 (72,73%) a ciprofloxacina, 1/2 (50%) a norfloxacina, 1/2 (50%) a trimetoprima/sulfametoxazol y para fosfomicina, nitrofurantoina, tigeciclina y cefotaxima no se encontró ningún aislados resistente a estos antibióticos (Tabla 8).

En la prueba de sinergia de doble disco se encontró que para cefotaxima/ácido clavulánico vs cefotaxima 14/153 aislados dieron positivo para producción de BLEE, mientras que en ceftazidima/ácido clavulánico vs. Ceftazidima, 11/153 aislados dieron un resultado positivo (CLSI, 2018). Los 11 aislados positivos para ceftazidima también lo fueron para cefotaxima, por que determinó que 14/153 aislados fueron positivos para BLEE por este método (Tabla 7). En el análisis por VITEK 2™, se determinó que 21 aislados presentaban el fenotipo BLEE, siendo el aislado CB-QCA 4562, el único identificado como negativo para la producción de BLEE por parte del centro hospitalario, pero dando un resultado positivo por el método de sinergia de doble disco (Tabla 8).

En relación a la detección fenotípica de la producción de carbapenemasas por el método THM, ningún aislado fue positivo a la producción de carbapenemasas. En los análisis realizados por VITEK 2™, no se detectó ningún aislado resistente a los 4 carbapenémicos probados (doripenem, ertapenem, imipenem y meropenem).

5.3. DETECCIÓN MOLECULAR DE LA PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA

La visualización de los productos de PCR permitió identificar la presencia de genes productores de BLEE y carbapenemasas. Se comparó las bandas obtenidas

en los geles de electroforesis convencional con el marcador de peso molecular, buscando aquellas que coincidían con el control positivo (Tabla 3).

De los 22 aislados analizados, 11 (50%) presentaron el gen *bla*$_{CTX-M}$ y 4 (18,18%) presentaron el gen *bla*$_{TEM}$. Ningún aislado presentó el gen *bla*$_{SHV}$.

Ningún de los 22 aislados estudiados dio positivo a la presencia de los 4 genes analizados para la producción de carbapenemasas: *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM,}$ *bla*$_{KPC}$ y *bla*$_{NDM}$.

5.4. IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES ALÉLICAS

La identificación de las variantes alélicas se realizó a partir de las secuencias obtenidas por secuenciamiento. Se obtuvo todas las variantes alélicas de los 2 genes reportados (*bla*$_{CTX-M}$ y *bla*$_{TEM}$) en los análisis moleculares preliminares.

Para el gen *bla*$_{TEM}$ el NCBI reporta 180 alelos, de los cuales se encontró que los 4 aislados portadores de este gen, pertenecían a la variante *bla*$_{TEM-1}$ (número de accesión NG_050145.1) (tabla 9).

El NCBI reporta 210 variantes alélicas para el gen *bla*$_{CTX-M}$. Los 11 aislados portadores del gen fueron identificados con la variante alélica *bla*$_{CTX-M-15}$ (número de accesión NG_048935.1) (tabla 9).

6. DISCUSIÓN

Las bacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) son una verdadera amenaza para la sociedad, siendo cada vez un mayor problema para los sistemas de salud a nivel mundial. El presente estudio demostró que *Escherichia coli* fue la especie predominante en la población estudiada, con el 19/22 (86,36%) de aislados identificados. Este resultado se encuentra en sintonía con lo reportado para el país por Delgado et al., (2016), Supliguicha et al., (2017) y Pachay, (2018). La predominancia de *E. coli* productora de BLEE entre los aislados de origen clínico, no solo se observa en el país, sino en varias partes del continente americano, como es el caso del estudio de Blanco et al., (2016)(Villegas et al., 2016) el cual reporta un porcentaje similar de aislados de *E. coli* de origen clínico en Colombia, y de Morones et al., (2016) en México.

Junto a *E. coli*, el género bacteriano mayormente descrito en otros estudios de bacterias productoras de BLEE, es el género *Klebsiella*, llegado a ser endémica en varios de países de América (Guzmán, Labarca, Villegas y Gotuzzo, 2014). El estudio reportó la presencia de 3/22 (13,64%) aislados de la especie *Klebsiella oxytoca*. Si bien, *Klebsiella pneumoniae* suele ser el mayor representante de este género, estudios realizados en el país y el continente han encontrado q*ue K. oxytoca* está presente en un porcentaje similar a *K. pneumoniae*, alineándose con los resultados obtenidos en esta investigación (Delgado et al., 2016; Guillén, R. et, 2016; Morones et al., 2016; Supliguicha et al., 2017).

La mayoría de los aislados fueron obtenidos a partir de muestras de orina 12/22 (54,55%) y de heridas quirúrgicas 4/22 (18,18%). Todos los aislados fueron identificadas como *Escherichia coli*. La predominancia de *E. coli* en los aislados procedentes de muestras de orina se debe a que *E. coli* es una bacteria comensal del sistema digestivo de todos los animales homeotermos. La cercanía anatómica entre el ano e inicio de la uretra, sobretodo en la anatomía femenina, aumenta la posibilidad de infecciones del tracto urinario (ITU) (Foxman, 2014; Villar et al., 2014; Flores et al., 2015; Mathers et al., 2015) (Villar et al., 2014; Flores, Walker, Caparon, y Hultgren, 2015; Mathers, Peirano y Pitout, 2015;). El segundo origen más común

reportado fue de aislados obtenidos de punta de catéter 2/22 (9,09%). Todos los aislados obtenidos de punta de catéteres fueron identificados como *K. oxytoca*. Los distintos orígenes de cada aislado se relacionan a infecciones bacterianas asociadas a la atención en salud., Estudios como el de Rivera, Rodriguez, Flores, Serquén y Arce, (2015) demuestra la capacidad de estas dos especies, en especial de *K. oxytoca*, de sobrevivir en superficies inanimadas dentro de los hospitales. Esto explicaría el porqué de su origen (López, 2014; Rivera et al., 2015).

Al analizar los perfiles de resistencia obtenidos con el método de difusión en disco, las resistencias predominantes fueron a ampicilina, cefazolina y ceftriaxona. Para el método automatizado VITEK 2™ los perfiles de resistencia predominantes fueron a ampicilina/sulbactam, ceftazidima, ceftriaxona y cefepima. Si bien, los antibióticos para los que existen un mayor porcentaje de resistencia, difiere entre un método y otro, a excepción de ceftriaxona, se observa que la resistencia a cefalosporinas está bien marcada. Se presenta resistencia tanto para cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima y ceftriaxona), y cuarta generación (cefepima). Esto supone un grave problema en el tratamiento de infecciones relacionadas a bacterias que presentan esta resistencia. Porque las cefalosporinas son usadas como un tratamiento efectivo y de amplio espectro para tratar infecciones relacionadas con bacterias Gram positivas y Gram negativas. Además, se usan como terapia alternativa para pacientes alérgicos a las penicilinas (Macy y Contreras, 2015; Oliveira et al., 2015). Su inactivación se traduce en el incremento en el uso de antibióticos reservados para casos de resistencia, como los carbapenémicos. Este problema aumenta el riesgo de generar resistencias a estas alternativas terapéuticas (Oliveira et al., 2015). Al comparar los perfiles de resistencia obtenidos con estudios similares a nivel nacional, vemos que la resistencia a ampicilina, ampicilina/sulbactam y trimetoprima/sulfametoxazol se ha incrementado en gran medida en los últimos años. Estos resultados concuerdan con lo reportado con el presente estudio y por estudios realizados en Latinoamérica por Villar et al., 2014; INSPI, 2015; Delgado et al., 2016.

En la detección fenotípica de enzimas BLEE por la prueba de sinergia de doble disco, solo 14/153 aislado colectados presentaron el fenotipo BLEE. Mientras que, por el método automatizado VITEK 2™, 21/153 aislados lo presentaron. Un menor

número de aislados identificados con el fenotipo BLEE por el método de sinergia de doble disco, se explicaría porque este método puede estar sujeto a errores como: fallo humano al momento de medir el halo de inhibición, exceso en el tiempo de incubación del aislado a analizar, mala toma del inóculo inicial, entre otros (Numanovic, Hukic, Delibegovic, Tihic y Pasic, 2013; Shah, Shrimali y Mulla, 2016).

Sin embargo, el método de sinergia de doble disco presenta ciertas ventajas como: la reproducibilidad, el bajo costo y la capacidad de realizarlo sin necesidad de equipos especializados. Este método sigue siendo uno de los más utilizados y sus resultados siguen teniendo validez (Kaluzna, Zalas-Wiecek y Gospodarek, 2014).

El método automatizado VITEK 2™tiene ventajas sobre el método manual, incrementando la efectividad y rapidez en la obtención de resultados. Esto lo hace ideal para ambientes hospitalarios donde, la cantidad de muestras procesadas y la rapidez en la detección de sensibilidad a antibióticos es crucial para un correcto y temprano tratamiento de los pacientes. Sin embargo, estudios demuestran que el método automatizado VITEK 2™ está sujeto a errores, en especial en la detección de mecanismos de resistencias como es el caso de *E. coli* productoras de BLEE (Kaluzna et al., 2014; Rhodes et al., 2014). En el estudio de Kaluzna et al. (2014) se compara la efectividad de los dos métodos en la detección de *E. coli* productoras de BLEE, siendo el método de sinergia de doble disco el que mayor porcentaje de resultados consistentes obtuvo (95,2%). Mientras que el método automatizado VITEK 2™ presentó una sensibilidad del 81,4%. Este sería el caso de la cepa CB-QCA 4562, la cual fue detectada como negativa para la producción de BLEE por el método automatizado VITEK 2™, y como positiva por el método de sinergia de doble disco. Si bien el método automatizado VITEK 2™ presenta una ligera desventaja frente al método manual, sus beneficios sobrepasan esta leve falencia. Por lo que un uso en conjunto de los dos métodos es recomendado, y no se puede descartar ninguno de los dos resultados (Kaluzna et al., 2014).

La producción de carbapenemasas evaluada por el Test de Hodge Modificado (THM) indicó que el 100% de los aislados analizados no presentaron producción de estas enzimas. Los resultados obtenidos por el método automatizado VITEK 2™, mostró el mismo resultado. Debido a que el THM puede estar sujeto a errores de

interpretación de la forma de trébol característica de un resultado positivo. La confirmación por VITEK 2™ donde ningún aislado presentó resistencia a carbapenems, indicó que las lecturas del THM fueron acertadas. En el estudio planteado por Codjoe y Donkor (2017) la ausencia de la evidencia fenotípica no significa que los aislados no sean portadores de genes relacionados a dichas resistencias.

Desde el surgimiento de las primeras bacterias productoras de BLEE, las enzimas mayormente reportadas eran las de los tipos TEM y SHV. En la actualidad las enzimas predominantes corresponden al tipo CTX-M (Blanco et al., 2016). Cada una de las variantes de CTX-M está relacionado con un mayor o menor índice de resistencia a ciertos tipos de antibióticos β-lactámicos. Por este motivo, el análisis molecular de genes de resistencia es siempre necesario y complementario a los análisis fenotípicos. En el caso de esta investigación se encontró que 11/22 (50%), presentaban el gen *bla*$_{\text{CTX-M}}$, en específico la variante *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$. Esta variante, se caracteriza por ser prevalente a escala mundial, siendo reportada en América del Norte y Sur, África, Asia y Europa. Solo en China la variante predominante es la *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ (Nicolas-Chanoine et al., 2008; Chen et al., 2014; Seiffert et al., 2014; Sidjabat y Paterson, 2015; Fatemeh et al., 2016). La presencia de *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ está en relación con los resultados documentados por Delgado et al. (2016) para Ecuador y por Colquechagua, Sevilla y Gonzales, (2015) y Blanco et al., (2016) para Colombia y Perú respectivamente. Cantón et al., (2012) explican que la rápida propagación de este tipo de enzima BLEE se debe a la facilidad con la que puede ser transmitida dentro plataformas genéticas móviles como plásmidos y transposones, lo que explicaría la predominancia de esta enzima en particular. Cantón et al. (2012) también reporta la relación de la variante *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ con el plásmido FII, el cual es llamado “plásmido de resistencia epidémica” por su capacidad de adquirir genes de resistencia. (Cantón et al., 2012).

Los aislados que presentaron el gen *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ mostraron altos porcentajes de resistencia a penicilinas, cefalosporinas (primera, segunda y tercera generación) y quinolonas. La resistencia a otro tipo de antibiótico, como las quinolonas, se relaciona con lo descrito por Flores-Mireles et al., (2015). Este estudio mostró que los genes de resistencia a quinolonas, como el gen *qnrB* son heredados junto a

genes de resistencia a β-lactámicos como el gen *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ (Flores-Mireles et al., 2015). Esta relación, también se observa en el estudio realizado por Azargun et al. (2018). En donde se observa una gran prevalencia de resistencia a quinolonas en aislados portadores del gen *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, lo cual se esperaba por la relación entre dichas resistencias.

Los 4 aislados de *E. coli.* productores de la enzima TEM presentaron la variante alélica *bla*$_{\text{TEM-1}}$. La producción de la enzima TEM está relacionada con resistencia a ampicilina, penicilina y cefalosporinas. Otros estudios realizados en Ecuador demuestran que la variante *bla*$_{\text{TEM-1}}$ es la predominante en el país (Delgado et al., 2016). Al igual, el estudio de Díaz (2017), reportó que las variantes alélicas presentes fueron *bla*$_{\text{TEM-1}}$ y *bla*$_{\text{TEM-214}}$, siendo *bla*$_{\text{TEM-1}}$ la predominante, alineándose con los resultados obtenidos en el presente estudio.

En la identificación fenotípica de BLEE, 9 aislados presentaron un perfil de resistencia concordante con el fenotipo, pero no presentaron ninguno de los genes codificantes de BLEE analizados. Como Rivera et al., (2015) plantea, es posible que los aislados sean portadores de otro tipo de genes relacionados con producción de BLEE como *bla*$_{\text{PER}}$, *bla*$_{\text{VEB}}$, *bla*$_{\text{GES}}$, *bla*$_{\text{BES}}$, *bla*$_{\text{TLA}}$, y *bla*$_{\text{OXA}}$ (Aggeliki et al., 2014; Bajpai, Pandey, Varma y Bhatambare, 2017). Otra opción sugiere, que los aislados que presentan el fenotipo BLEE son portadores del gen cromosómico inducible AmpC (Rivera et al., 2015). La presencia de este gen está relacionada con la resistencia a penicilinas, cefalosporinas, cafamicinas y aztreonam. Este gen está presente en el cromosoma de algunas bacterias, y también puede ser adquirido a través de elementos genéticos móviles como plásmidos (Sidjabat y Paterson, 2015; Alonso et al., 2016).

Los análisis moleculares demostraron que ninguno de los 22 aislados analizados presentaron los genes relacionados con la producción de carbapenemasas tipo *bla*$_{\text{IMP}}$, *bla*$_{\text{VIM}}$, *bla*$_{\text{KPC}}$ y *bla*$_{\text{NDM}}$. Estudios desarrollados, en toda Latinoamérica, han reportado que la resistencia a carbapenems es un problema que va en incremento (Villegas et al., 2016; Escandón, Reyes, Gutiérrez y Villegas, 2017). Este aumento de las tasas de resistencia a carbapenémicos, radica en que estos son usados como la siguiente línea de defensa en infecciones producidas por bacterias

productoras de BLEE. Los carbapenémicos, al pertenecer a la familia de los β-lactámicos, no presentan toxicidad al momento de ser usados como tratamiento. Otros antibióticos de última línea, como la colistina, presentan cierto grado de toxicidad al ser utilizados en los pacientes (Villegas et al., 2016). Si el uso de carbapenémicos se ve comprometido aumentaría el uso de colistina y tigeciclina. Estos antibióticos presentan cierto grado de toxicidad para el paciente, dificultando el tratamiento. Estudios como el de Villegas et al., (2016) y Escandón et al., (2017) ratifican que la resistencia a carbapenémicos se ha vuelto endémica en muchos países latinoamericanos y que su prevalencia aumenta cada vez. Este aumento se debe a que existen aislados que no presentan un fenotipo resistentes a carbapenemasas, sin embargo son portadores de genes de resistencia, diseminándolos de manera silenciosa (Codjoe y Donkor, 2017).

7. CONCLUSIONES

1. La identificación de los aislados bacterianos obtenida en el laboratorio por pruebas bioquímicas coincidió con lo reportado por la casa de salud.

2. La especie predominante en este estudio fue *E. coli* seguida de *K. oxytoca*. Los urocultivos fueron el origen de las muestras más común entre los aislados estudiados.

3. Los métodos de identificación de resistencias difusión en disco y VITEK 2™, son precisos y efectivos. Sin embargo, análisis moleculares enfocados a descifrar este tipo de resistencias son necesarios para complementar los resultados.

4. Las altas tasas de resistencia a β-lactámicos de espectro extendido presentan un grave problema para los sistemas de salud. Los genes que confieren este tipo de resistencias suelen estar asociados a genes codificantes de resistencia a otros tipos de antibióticos. Esto da como resultado co-resistencias dificultando aún más un adecuado tratamiento.

5. La presencia de los genes *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ 11/22 (50%) y *bla*$_{\text{TEM-1}}$ 4/22(18,18%), concuerdan con otros resultados reportados por otros estudios en Latinoamérica. La presencia del gen *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, cuyo tipo es predominante a nivel mundial, denota la eficaz capacidad de flujo de esta resistencia a nivel mundial.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A. Bauer, W. Kirby, J. Sherris y M. Turck. (1966). Antibiotic Susceptibility Testing By A Standardized Single Disk Method. *The American Journal Of Clinical Pathology*, *45*(4), 493–496.

Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S. y Gupta, R. S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(12), 5575–5599. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485.

Aggeliki, P., Evgenia, G., Georgia, V., Vassiliki, K., Theodoros, P., Spyros, P. y Athanassios, T. (2014). Test for Phenotypic Detection of ESBLs among Enterobacteriaceae Producing Various β-Lactamases. *J Clin Microbiol*, *52*(5), 1483–1489. https://doi.org/10.1128/JCM.03361-13.

Alcocer, I. 2010. Manual de laboratorio de Microbiología. Pontificia Universidad Católica del Ecuador pp75.

Alonso, N., Miró, E., Pascual, V., Rivera, A., Simó, M., Garcia, M. C., … Coll, P. (2016). Molecular characterisation of acquired and overproduced chromosomal blaAmpC in Escherichia coli clinical isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *47*(1), 62–68. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.10.007.

Ambler, R., James, B. y Penley, E. (1980). The structure of β-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *289*(1036), 321–331. https://doi.org/10.1007/BF01425545.

Azargun, R., Sadeghi, M. R., Hossein, M., Barhaghi, S., Kafil, H. S., Yeganeh, F., … Ghotaslou, R. (2018). The prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and ESBL-production in enterobacteriaceae isolated from urinary tract infections. *Infection and Drug Resistance*, *11*, 1007–1014. https://doi.org/10.2147/IDR.S160720.

Bajpai, T., Pandey, M., Varma, M. y Bhatambare, G. S. (2017). Prevalence of TEM , SHV , and CTX ‐ M Beta ‐ Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna Journal of Medicine*, *7*(1), 12–16.

BD Diagnostics. (2009). *Difco and BBL Manual Manual of Microbiological Culture Media 2nd Edition*. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C.

Bevan, E. R., Jones, A. M., & Hawkey, P. M. (2017). Global epidemiology of CTX-M β-lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(8), 2145–2155. https://doi.org/10.1093/jac/dkx146.

Blanco, V. M., Maya, J. J., Correa, A., Perenguez, M., Muñoz, J. S., Motoa, G., … Villegas, M. V. (2016). Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por Escherichia coli productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *34*(9), 559–565. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.11.017.

Brolund, A. y Sandegren, L. (2016). Characterization of ESBL disseminating plasmids. *Infectious Diseases*, *48*(1), 18–25. https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1062536.

Cantón, R., González-Alba, J. M. y Galán, J. C. (2012). CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*, *3*(APR). https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110.

CDC, C. for D. C. and P. (CDC) J. K. E. L. R. B. Z. L. R. et. (2013). Vital Signs : Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, *62*(9), 165–170.

Chen, L. F., Freeman, J. T., Nicholson, B., Keiger, A., Lancaster, S., Joyce, M., … Anderson, D. J. (2014). Widespread dissemination of CTX-M-15 genotype extended-spectrum-β- lactamase-producing enterobacteriaceae among patients presenting to community hospitals in the southeastern United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(2), 1200–1202. https://doi.org/10.1128/AAC.01099-13.

Cho, H., Uehara, T. y Bernhardt, T. G. (2014). Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell*, *159*(6), 1300–1311. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.017.

Cilveti, C. (2013). *FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Genotipaje de la resistencia a antimicrobianos en bacterias entéricas productoras de carbapenemasas y pruebas de inhibición con*

secreciones peptídicas de anfibios nativos Disertación.

CLSI. (2017). *Clinical and Laboratory Standards Institute antimicrobial susceptibility testing standards M02, M07, and M11*.

Codjoe, F. y Donkor, E. (2017). Carbapenem Resistance: A Review. *Medical Sciences*, *6*(1), 1. https://doi.org/10.3390/medsci6010001.

Colquechagua, F., Sevilla, C. y Gonzales, E. (2015). Artículo Original DE ESPECTRO EXTENDIDO EN MUESTRAS FECALES EN EL ENTEROBACTERIACEAE IN FECAL SAMPLES AT THE NATIONAL. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *32*(1), 26–32.

D'Andrea, M. M., Arena, F., Pallecchi, L. y Rossolini, G. M. (2013). CTX-M-type β-lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, *303*(6–7), 305–317. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008.

Dalynn biologicals. (2014). Motility Indole Lysine Medium (MIL). Tubed Media Product Line. Catalogue No. TM63.

Delgado, D. Y. C., Barrigas, Z. P. T., Astutillo, S. G. O., Jaramillo, A. P. A. y Ausili, A. (2016). Detection and molecular characterization of β-lactamase genes in clinical isolates of Gram-negative bacteria in Southern Ecuador. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *20*(6), 627–630. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.07.001.

Díaz, V. (2017). Caracterización molecular de genes de resistencia a β- lactámicos en aislados clínicos de Escherichia coli provenientes de urocultivos y pruebas de inhibición con péptidos de Boana rosenbergi y Rana sp. Trabajo de disertación previo a la obtención del título de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Ding, H. F., Liu, B. G., Gao, Y. L., Zhong, X. H., Duan, S. S. y Yuan, L. (2018). Divergence of affinities, serotypes and virulence factor between CTX-M Escherichia coli and non-CTX-M producers. *Poultry Science*, *97*(3), 980–985. https://doi.org/10.3382/ps/pex376.

Doi, Y., Iovleva, A. y Bonomo, R. A. (2017). The ecology of extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) in the developed world. *Journal of travel medicine*, *24*(1), S44–S51. https://doi.org/10.1093/jtm/taw102.

Ederer, G. M., Lund, M. E., Blazevic, D. J., Reller, L. B. y Mirrett, S. (1975). Motility indole lysine sulfide medium. *Journal of Clinical Microbiology*, *2*(3), 266–267.

Escandón-Vargas, K., Reyes, S., Gutiérrez, S. y Villegas, M. V. (2017). The

epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *15*(3), 277–297. https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1268918.

Fadil Saedii, A. A., Abdelraheim, A. R., Abdel Aziz, A. A. y Swelam, S. H. (2017). ESBL-Producing E.Coli and Klebsiella among Patients Treated at Minia University Hospitals. *Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies*, *05*(02). https://doi.org/10.4172/2329-8731.1000156.

Fatemeh, F., Hamed, A., Ali, H., Hossein, G., Latif, G. y Parastoo, H. (2016). Antibiotic susceptibility patterns in CTX-M-15-producing Enterobacteraceae isolated from healthy Afghan refugees in Iran. *African Journal of Microbiology Research*, *10*(11), 357–362. https://doi.org/10.5897/ajmr2015.7803.

Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M. y Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(5), 269–284. https://doi.org/10.1038/nrmicro3432.

Foxman, B. (2014). Urinary Tract Infection Syndromes Occurrence, Recurrence, Bacteriology, Risk Factors, and Disease Burden. Infectious Disease Clinics of North America, 28(1), 1-13. https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.003.

Guillén, R. et, al. (2016). Detección molecular de belactamasas de espectro extendido (BLEE) en enterobacterias aisladas en Asunción. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, *14*(1), 8–16. https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(01)08-016.

Guzmán-Blanco, M., Labarca, J. A., Villegas, M. V. y Gotuzzo, E. (2014). Extended spectrum β-lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *18*(4), 421–433. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.10.005.

Instituto Nacional de Etadísticas y Censo (INEC)(2017, Mayo 1). VDatos. Tomado de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/vdatos/.

Iñiguez, D., Zurita, J., Alcocer, I., Ortega, D., Gómez, A. M. y Maldonado, L. (2012). Klebsiella pneumoniae productora de carbapenemasa tipo KPC-2: primer reporte en el Ecuador. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito)*, *37*(1–2), 40–43. Recuperado de http://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CIENCIAS_MEDICAS/article/view/1087.

Kaluzna, E., Zalas-Wiecek, P. y Gospodarek, E. (2014). Comparison of detection

methods for extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli strains. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, *68*(June), 808–813. https://doi.org/10.5604/17322693.1108873.

Kang, H., Wang, L., Li, Y., Lu, Y., Fan, W., Bi, R., … Gu, B. (2019). Dissemination of Multidrug-Resistant *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* with Class 1, Class 2, and Atypical Class 1 Integrons in China. *Microbial Drug Resistance*, *00*(00), mdr.2018.0229. https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0229.

Kelly, A. M., Mathema, B. y Larson, E. L. (2017). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *50*(2), 127–134. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.012.

López-Cerero, L. (2014). Papel del ambiente hospitalario y los equipamientos en la transmisión de las infecciones nosocomiales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *32*(7), 459–464. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.10.004.

López Velandia, D. P., Torres Caycedo, M. I. y Prada Quiroga, C. F. (2016). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Universidad y Salud*, *18*(1), 190. https://doi.org/10.22267/rus.161801.30.

Macy, E. y Contreras, R. (2015). Adverse reactions associated with oral and parenteral use of cephalosporins: A retrospective population-based analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *135*(3), 745-752.e5. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.062.

Marín, M. y Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *21*(1), 42–55. https://doi.org/10.1157/13042137

Mathers, A. J., Peirano, G. y Pitout, J. D. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 565–591. https://doi.org/10.1128/CMR.00116-14.

Morones-Esquivel, I., Salgado-Muñoz, T. G., Gonzaga-López, T. I., Matamoros-Mejía, A. P., Terán-González, J. O., Arteaga-Vázquez, S., … Meza-Oviedo, D. (2016). Enterobacterias con betalactamasas de espectro extendido en hemocultivos y urocultivos. *Medicina Interna de Mexico*, *32*(4), 381–387.

Nicolas-Chanoine, M. H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M. P.,

Caniça, M. M., … Johnson, J. R. (2008). Intercontinental emergence of Escherichia coli clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *61*(2), 273–281. https://doi.org/10.1093/jac/dkm464.

Numanovic, F., Hukic, M., Delibegovic, Z., Tihic, N. y Pasic, S. (2013). Comparison of double disk synergy test , VITEK 2 and Check- MDR CT102 for detection of ESBL producing isolates. *Acta Medica Academica 2013*, *42*(1), 15–24. https://doi.org/10.5644/ama2006-124.66.

O'Hara, J. A., Hu, F., Ahn, C., Nelson, J., Rivera, J. I., Pasculle, A. W. y Doi, Y. (2014). Molecular epidemiology of KPC-producing Escherichia coli: Occurrence of ST131-fimH30 subclone harboring pKpQIL-like IncFIIk plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(7), 4234–4237. https://doi.org/10.1128/AAC.02182-13.

Oliveira, M. C., Oliveira, C. R. A., Gonçalves, K. V., Santos, M. S., Tardelli, A. C. S. y Nobre, V. A. (2015). Enterobacteriaceae resistant to third generation cephalosporins upon hospital admission: Risk factors and clinical outcomes. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *19*(3), 239–245. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.01.006.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo [Comunicado de prensa]. Recuperado de: https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/.

Pachay, S. (2018). Las infecciones bacterianas y su resistencia a los antibióticos. Caso de estudio: Hospital Oncológico "Dr. Julio Villacreses Colmont Solca", Portoviejo. *Universidad y Sociedad*, *10*(3), 134–141. https://doi.org/10.3182/20120611-3-IE-4029.00015.

Promega, C. (2010). *Isolation of Genomic DNA from Whole Blood Wizard ® Genomic DNA Purification Kit*. 1123–1126. Recuperado de www.promega.com.

Ranjbar, R., Ardashiri, M., Samadi, S. y Afshar, D. (2018). Distribution of extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) among salmonella serogroups isolated from pediatric patients. *Iranian Journal of Microbiology*, *10*(5), 294–299.

Rhodes, N. J., Richardson, C. L., Heraty, R., Liu, J., Malczynski, M., Qi, C. y Scheetz, M. H. (2014). Unacceptably high error rates in Vitek 2 testing of cefepime

susceptibility in extended-spectrum-β-lactamase-producing Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(7), 3757–3761. https://doi.org/10.1128/AAC.00041-14.

Rivera, M., Rodriguez, C., Flores, R., Serquén, L. y Arce, Z. (2015). Betalactamasas De Espectro Extendido Tipo Tem. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, *32*(4), 752–755.

Rivoarilala, O. L., Garin, B., Andriamahery, F. y Collard, J. M. (2018). Rapid in vitro detection of CTX-M groups 1, 2, 8, 9 resistance genes by LAMP assays. *PLoS ONE*, *13*(7), 1–15. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200421.

Rossolini, G. M., Andrea, M. M. D. y Mugnaioli, C. (2008). *The spread of CTX-M-type extended-spectrum b -lactamases*. *14*, 33–41.

Seiffert, S. N., Marschall, J., Perreten, V., Carattoli, A., Furrer, H. y Endimiani, A. (2014). Emergence of Klebsiella pneumoniae co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *International journal of antimicrobial agents*, *44*(3), 260–262. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.05.008.

Shah, K., Shrimali, G. y Mulla, S. (2016). *COMPARISON OF DOUBLE DISC DIFFUSION METHOD AND VITEK 2 COMPACT SYSTEM TO SCREEN THE ESBL PRODUCERS IN INTENSIVE CARE UNIT IN HOSPITAL*. *7*(9), 7–9.

Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D. y Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *22*(1), 90–101. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002.

Sidjabat, H. y Paterson, D. (2015). Multidrug-resistant Escherichia coli in Asia: Epidemiology and management. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *13*(5), 575–591. https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1028365.

Supliguicha Torres, M., José Supliguicha Torres, P., Estefanía Ortega, V., Beatriz Pacurucu, C., Patricia Lema, J., Alexandra Santander, P., … Sebastián Urdiales, B. (2017). *Factores de riesgo para la infección del tracto urinario por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido Resumen Risk factors for infection of urinary tract by extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae*. *36*.

Villar, H. E., Jugo, M. B., Macan, A., Visser, M., Hidalgo, M. y Maccallini, G. C. (2014). Frequency and antibiotic susceptibility patterns of urinary pathogens in male

outpatients in Argentina. *Journal of Infection in Developing Countries*, *8*(6), 699–704. https://doi.org/10.3855/jidc.3766.

Villegas, M. V., Pallares, C. J., Escandón-Vargas, K., Hernández-Gómez, C., Correa, A., Álvarez, C., … Guzmán-Blanco, M. (2016). Characterization and clinical impact of bloodstream infection caused by carbapenemase-producing enterobacteriaceae in seven Latin American countries. *PLoS ONE*, *11*(4), 1–13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154092.

Woerther, P. L., Andremont, A. y Kantele, A. (2017). Travel-acquired ESBL-producing Enterobacteriaceae: impact of colonization at individual and community level. *Journal of travel medicine*, *24*(1), S29–S34. https://doi.org/10.1093/jtm/taw101.

Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-sanchez, A., Biddle, J. W. y Steward, C. D. (2001). Novel Carbapenem-Hydrolyzing ᴹᴸ-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of. *Society*, *45*(4), 1151–1161. https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151.

Zeng, X. y Lin, J. (2013). Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, *4*(MAY), 1–9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00128.

Zurita, J., Alcocer, I., Ortega-paredes, D., Barba, P. y Yauri, F. (2013). Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in Klebsiella pneumoniae Carbapenem-hydrolysing b -lactamase KPC-2 in Klebsiella pneumoniae isolated in Ecuadorian hospitals. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *1*(February 2018), 6–8. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2013.06.001.

9. FIGURAS

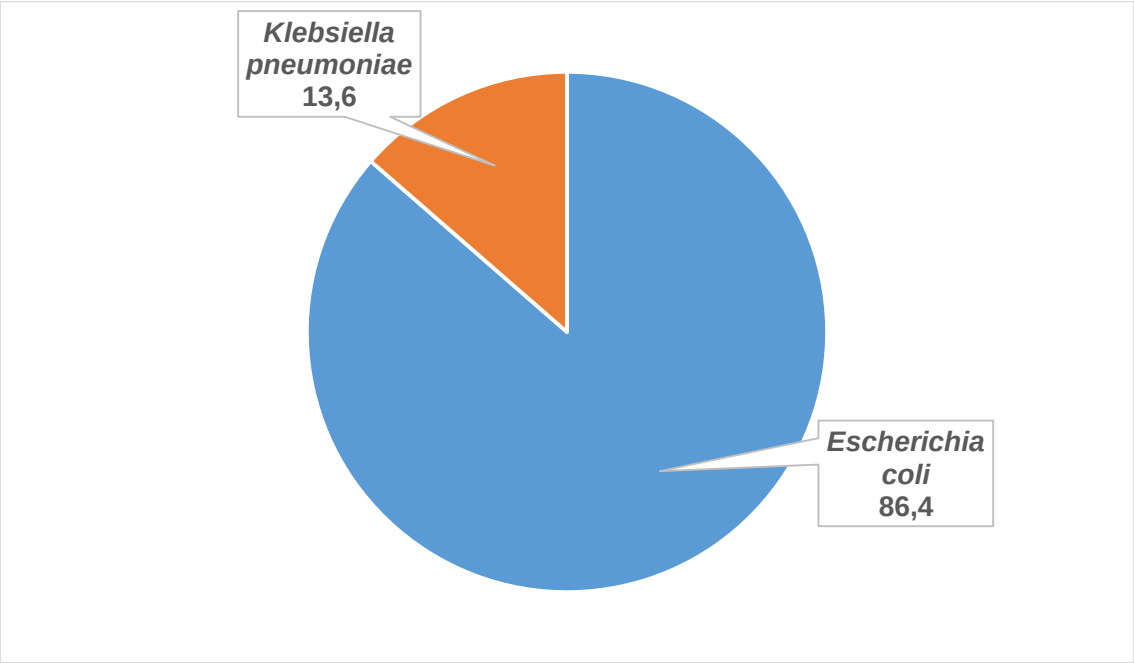


Figura 1. Porcentaje de especies identificadas de la población del estudio

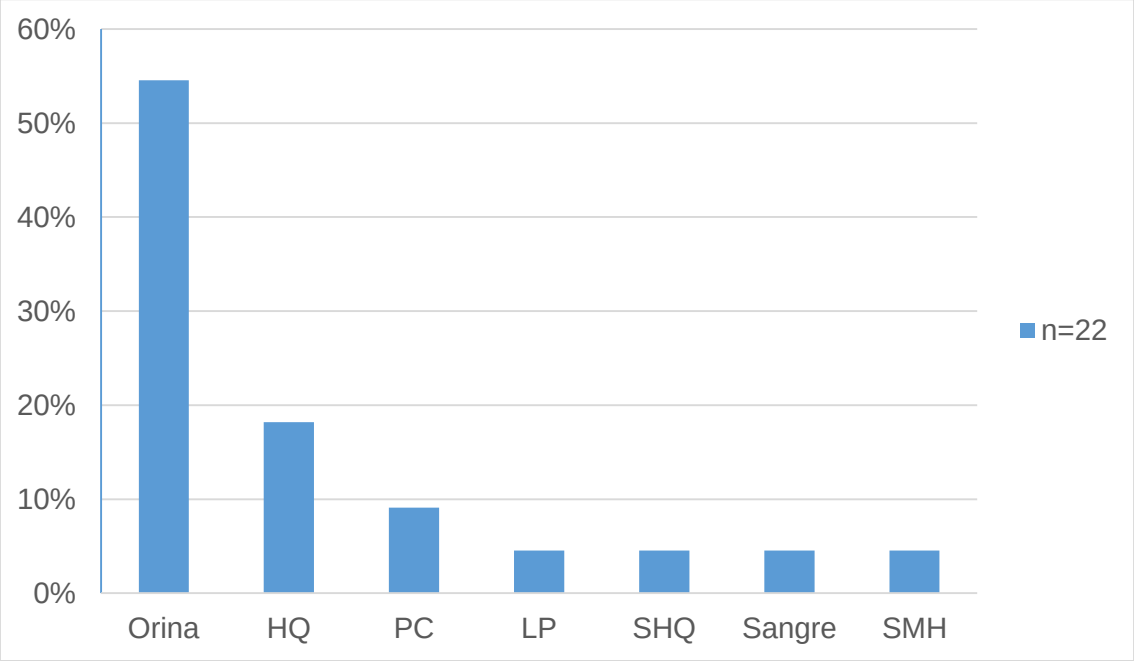


Figura 2. Porcentaje de origen de los aislados. HQ, herida quirúrgica; PC, punta de catéter; LP, Líquido peritoneal; SHQ, secreción de herida quirúrgica; SMH, secreción de muñón de histerectomía.

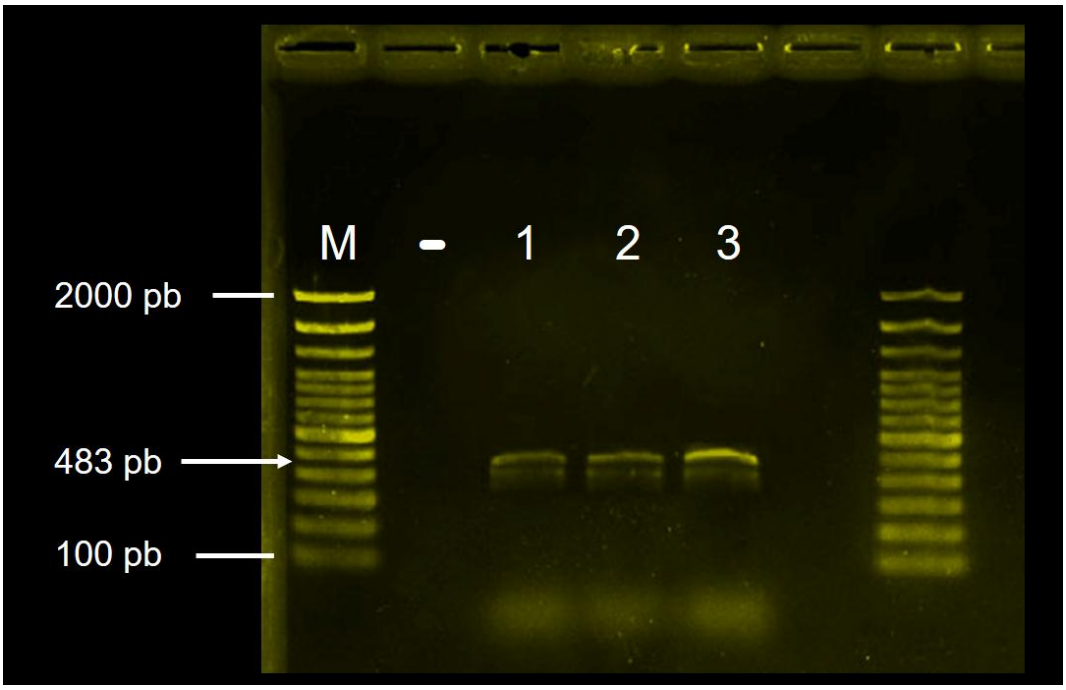


Figura 3. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen blaCTX-M-15. M, marcador de peso molecular (100 pb); -, control negativo; 1, CB-QCA 4562; 2, CB-QCA 4609; 3, CB-QCA 4668.

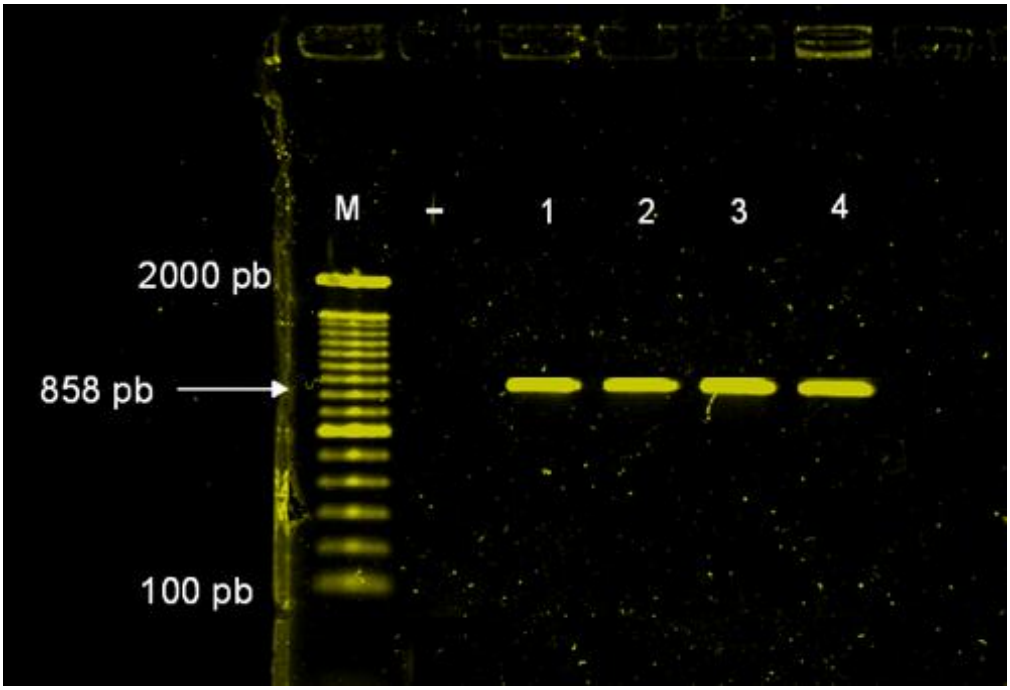


Figura 4. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen blaTEM. M, marcador de peso molecular (100 pb); -, control negativo; 1, CB-QCA 456; 2, CB-QCA 4697; 3, CB-QCA 4699; 4, CB-QCA 4991.

10. TABLAS

Tabla 1. Datos de origen de los aislados analizados

Código PUCE	Fecha colecta PUCE	Muestra	Identificación
CB-QCA 4562	23/1/2017	LP	*E. coli*
CB-QCA 4563	23/1/2017	HQ	*E. coli*
CB-QCA 4567	24/1/2017	Orina	*E. coli*
CB-QCA 4609	3/2/2017	Orina	*E. coli*
CB-QCA 4610	3/2/2017	Orina	*E. coli*
CB-QCA 4668	15/2/2017	HQ	*E. coli*
CB-QCA 4683	20/2/2017	HQ	*E. coli*
CB-QCA 4687	20/2/2017	Orina	*E. coli*
CB-QCA 4688	20/2/2017	HQ	*E. coli*
CB-QCA 4694	16/3/2017	Orina	*E. coli*
CB-QCA 4697	23/2/2017	Orina	*E. coli*
CB-QCA 4699	23/2/2017	Orina	*E. coli*
CB-QCA 4702	23/2/2017	SHQ	*E. coli*
CB-QCA 4711	1/3/2017	Sangre	*K. oxytoca*
CB-QCA 4719	3/3/2017	PC	*K. oxytoca*
CB-QCA 4731	6/3/2017	Orina	*E. coli*
CB-QCA 4757	14/3/2017	Orina	*E. coli*
CB-QCA 4786	17/3/2017	PC	*K. oxytoca*
CB-QCA 4852	3/4/2017	Orina	*E. coli*
CB-QCA 4990	12/5/2017	Orina	*E. coli*
CB-QCA 4991	12/5/2017	Orina	*E. coli*
CB-QCA 5004	23/5/2017	SMH	*E. coli*

CB-QCA, Colección Bacteriana Quito Católica; HQ, herida quirúrgica; PC, punta de catéter; LP, Líquido peritoneal; SHQ, secreción de herida quirúrgica; SMH, secreción de muñón de histerectomía.

Tabla 2. Concentraciones de cada antimicrobiano probado por el sistema VITEK 2™

Antibiótico	Siglas	Concentración	S	I	R
			Intervalos en mm		
Ampicilina	AM	10µg	≥17	14-16	≤13
Ácido nalidíxico	NA	30µg	≥19	14-18	≤13
Amikacina	AMK	30µg	≥17	15-16	≤14
Ampicilina/Sulbactam	SAM	10µg/10µg	≥15	12-14	≤13
Aztreonam	ATM	30µg	≥21	18-20	≤17
Cefazolina	CZ	30µg	≥15	-	≤14
Cefepima	FEP	30µg	≥15	-	≤15
Cefoxitina	FOX	30µg	≥18	15-17	≤14
Ceftriaxona	CRO	30µg	≥21	14-20	≤13
Ciprofloxacina	CIP	5µg	≥21	16-20	≤15
Gentamicina	GN	10µg	≥15	13-14	≤12
Levofloxacina	LVX	5µg	≥17	14-16	≤13
Norfloxacina	NOR	10µg	≥17	13-16	≤12
Piperacilina/tazobactam	TZP	100µg/10µg	≥21	18-20	≤17
Tobramicina	TOB	10µg	≥15	13-14	≤12
Trimetropima/sulfametoxazol	SXT	1,25µg/23,75µg	≥16	11-15	≤10

S, sensible; I, indeterminado; R, resistente

Tabla 3. Nombre, siglas, concentraciones y rangos de cada antimicrobiano probado por el sistema Difusión en disco

Antibiótico	Siglas	Concentración	S	I	R
			Intervalos en mm		
Ampicilina	AM	10µg	≥17	14-16	≤13
Ácido nalidíxico	NA	30µg	≥19	14-18	≤13
Amikacina	AMK	30µg	≥17	15-16	≤14
Ampicilina/Sulbactam	SAM	10µg/10µg	≥15	12-14	≤13
Aztreonam	ATM	30µg	≥21	18-20	≤17
Cefazolina	CZ	30µg	≥15	-	≤14
Cefepima	FEP	30µg	≥15	-	≤15
Cefoxitina	FOX	30µg	≥18	15-17	≤14
Ceftriaxona	CRO	30µg	≥21	14-20	≤13
Ciprofloxacina	CIP	5µg	≥21	16-20	≤15
Gentamicina	GN	10µg	≥15	13-14	≤12
Levofloxacina	LVX	5µg	≥17	14-16	≤13
Norfloxacina	NOR	10µg	≥17	13-16	≤12
Piperacilina/tazobactam	TZP	100µg/10µg	≥21	18-20	≤17
Tobramicina	TOB	10µg	≥15	13-14	≤12
Trimetropima/sulfametoxazol	SXT	1,25µg/23,75µg	≥16	11-15	≤10

S, sensible; I, indeterminado; R, resistente

Tabla 4. Cebadores utilizados para la detección de genes de resistencia productores de BLEE

Cebador	Secuencia	Blanco	Amplicón	Referencia
CTX-M forward	ATAAAACCGGCAGCGGTG	*bla*$_{CTX-M-15}$	483 pb	Fatemeh et al., 2016
CTX-M reverse	GAATTTTGACGATCGGGG	*bla*$_{CTX-M-15}$	484 pb	Fatemeh et al., 2017
TEM forward	ATGAGTATTCAACATTTCCG	*bla*$_{TEM}$	858 pb	Ranjbar et al., 2018
TEM reverse	CCAATGCTTAATCAGTGAGG	*bla*$_{TEM}$	859 pb	Ranjbar et al., 2019
SHV forward	TTTATCGGCCYTCACTCAAGG	*bla*$_{SHV}$	862 pb	Kang et al., 2019
SHV reverse	GCTGCGGGCCGGATAACG	*bla*$_{SHV}$	863 pb	Kang et al., 2020

Tabla 5. Cebadores utilizados para la detección de genes de resistencia productores de carbapenemasas

Cebador	Secuencia	Blanco	Amplicón	Referencia
KPC forward	CGGAACCATTCGCTAAACTC	*bla*$_{KPC}$	738 pb	Cilveti, 2013.
KPC reverse	GGCCTCGCTGTRCTTGTCAT	*bla*$_{KPC}$	739 pb	Cilveti, 2013.
VIM forward	ATGGTGTTTGGTCGCATATC	*bla*$_{VIM}$	500 pb	Cilveti, 2013.
VIM reverse	TGGGCCATTCAGCCAGATC	*bla*$_{VIM}$	501 pb	Cilveti, 2013.
IMP forward	GAAGGGCGTTTATGTTCATACTT	*bla*$_{IMP}$	587 pb	Cilveti, 2013.
IMP reverse	GTTTTGCCTTACCATATTTGGA	*bla*$_{IMP}$	588 pb	Cilveti, 2013.
NDM forward	CACCTCATGTTTGAATTCGCC	*bla*$_{NDM}$	984 pb	Cilveti, 2013.
NDM reverse	CTCTGTCACATCGAAATCGC	*bla*$_{NDM}$	985 pb	Cilveti, 2013.

Tabla 6. Pruebas bioquímicas

CIT	K/A	H2S	GAS	RM	VP	MOT	IND	LYS	ORN	Identificación
-	A/A	-	+	+	-	+	+	+	+	*Escherichia coli*
+	A/A	-	+	-	+	-	+	+	-	*Klebsiella oxytoca*

CIT, citrato; K, alcalino; A, ácido; H2S, gas sulfídrico; RM, VP, tipo de fermentación; MOT, motilidad; IND, indol; LYS, lisina; ORN; +, prueba positiva; -, prueba negativa.

Tabla 7. Perfil de resistencia a antimicrobianos β-lactámicos, BLEE, por el método de difusión en disco. Y resistencia a carbapenems por THM

Código PUCE	Fecha de cultivo	Origen	Identificación	AM	AMK	ATM	CIP	CRO	CZ	FEP	FOX	GN	LVX	NA	NOR	SAM	SXT	TOB	TZP	BLEE	Hodge
CB-QCA 4562	23/1/2017	LP	*E. coli*	R6	S23	S37	R6	S37	I21	S36	S29	R6	R10	R6	R6	R10	S30	S15	S26	POS	NEG
CB-QCA 4563	23/1/2017	HQ	*E. coli*	R6	S19	R14	R6	R10	R6	R16	S25	R6	R10	R6	R6	R10	R6	R10	S22	POS	NEG
CB-QCA 4567	24/1/2017	Orina	*E. coli*	R6	S20	S3	R6	S32	S23	S30	S25	S23	R10	R6	R6	R10	S22	I13	S22	POS	NEG
CB-QCA 4609	3/2/2017	Orina	*E. coli*	R6																POS	NEG
CB-QCA 4610	3/2/2017	Orina	*E. coli*	R6	R6	I19	R6	R12	R6	I21	S20	S21	R6	R6	R6	S16	S24	S21	S25	POS	NEG
CB-QCA 4668	15/2/2017	HQ	*E. coli*	R6	S18	R14	R6	R10	R6	R18	S22	S22	S17	R6	R6	R11	R6	S15	I20	POS	NEG
CB-QCA 4683	20/2/2017	HQ	*E. coli*	R6	S20	R16	R6	R11	R6	I19	S23	S22	R7	R6	R6	R11	R6	S15	S21	POS	NEG
CB-QCA 4687	20/2/2017	Orina	*E. coli*	R6	S25	I18	S37	R10	R6	I21	S25	S23	S39	S21	S31	S16	I15	S26	S27	POS	NEG
CB-QCA 4688	20/2/2017	HQ	*E. coli*	R6	S21	R14	R6	R11	R6	I19	S23	S21	R7	R6	R6	R10	R6	S15	S21	POS	NEG
CB-QCA 4694	16/3/2017	Orina	*E. coli*	R6	S21	S30	R6	I20	R7	S28	R12	S23	R6	R6	R6	R10	R7	I14	I20	POS	NEG
CB-QCA 4697	23/2/2017	Orina	*E. coli*	R6	S26	S24	I16	R15	R8	S29	S29	S28	I16	R6	I13	I13	R6	S27	S29	POS	NEG
CB-QCA 4699	23/2/2017	Orina	*E. coli*	R6	S20	R6	R6	R6	R6	R10	R6	R7	R6	R6	R6	R6	R6	R11	I19	POS	NEG
CB-QCA 4702	23/2/2017	SHQ	*E. coli*	R6	S20	R15	R6	R10	R6	R17	S22	S22	R7	R6	R6	I12	R6	S16	S21	POS	NEG
CB-QCA 4711	1/3/2017	Sangre	*K. oxytoca*	R6	S25	R15	S35	R19	R6	S28	S28	S23	S32	S25	S33	R6	S29	S26	R14	POS	NEG
CB-QCA 4719	3/3/2017	PC	*K. oxytoca*	R6	S23	R15	S32	R16	R6	S25	S25	S23	S33	S31	S32	R6	S27	S26	R13	POS	NEG
CB-QCA 4731	6/3/2017	Orina	*E. coli*	R6	S20	R17	R6	R6	R6	R14	S20	S23	R6	R6	R6	I14	R6	S22	S25	POS	NEG
CB-QCA 4757	14/3/2017	Orina	*E. coli*	R6	S24	R10	R6	R6	R6	R14	S24	S25	R10	R6	R6	I14	S29	S20	S28	POS	NEG
CB-QCA 4786	17/3/2017	PC	*K. oxytoca*	R6	S24	R11	S28	R18	R6	S25	S27	S26	S28	S23	S26	R6	S30	S21	R15	POS	NEG
CB-QCA 4852	3/4/2017	Orina	*E. coli*	R6	S29	R13	R6	R10	R6	I19	S26	S24	R6	R6	R6	S17	S26	S26	S29	POS	NEG
CB-QCA 4990	12/5/2017	Orina	*E. coli*	R6	S20	S22	R6	R13	R6	I22	S26	S20	R6	R6	R6	S19	R6	S21	S27	POS	NEG
CB-QCA 4991	12/5/2017	Orina	*E. coli*	R6	S21	S31	S33	S41	I20	S30	S23	S22	S32	S23	S25		R6	S22	S24	POS	NEG
CB-QCA 5004	23/5/2017	SMH	*E. coli*	R6	S17	R13	R6	R6	R6	R14	S24	S20	R6	R6	R6	R10	R6	I14	I20	POS	NEG

CB-QCA, Colección Bacteriana Quito Católica HQ, herida quirúrgica; PC, punta de catéter; LP, Líquido peritoneal; SHQ, secreción de herida quirúrgica; SMH, secreción de muñón de histerectomía. AM, ampicilina; AMK, amikacina; ATM, aztreonam; CIP, ciprofloxacina; CRO, ceftriaxona, CZ, cefazolina; FEP, cefepima; FOX, cefoxitina, GN, gentamicina; LVX, levofloxacina; NA, ácido nalidíxico; NOR, norfloxacina, SAM, Ampicilina/sulbactam; SXT, trimetoprima/sulfametoxazol; TOB, tobramicina; TZP, piperacilina/tazobactam; BLEE, β- lactamasas de espectro extendido; Hodge, test modificado de Hodge (resistencia a carbapenémicos).

Tabla 8. Perfil de resistencia a antimicrobianos β-lactámicos, BLEE y carbapenems por el método de automatizado VITEK 2™

CÓDIGO PUCE	BLEE	AM	AMK	CF	CIP	CRO	CS	CTX	CAZ	CXM	FEP	FOS	FOX	GM	NIF	NOR	SAM	SXT	TGC	TZP	DORI	ETP	IPM	MEM
CB-QCA 4562	NEG		S(4)		R(4)	S(1)	S(0,5)		S(1)		S(1)		S(4)	R(16)			R(32)		S(0,5)	S(4)	S(0,12)	S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4563	POS		R(16)		R(4)	R(64)	S(0,5)		R(16)		R(64)		S(4)	R(16)			R(32)		S(0,5)	S(8)	S(0,12)	S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4567	POS		S(16)		R(4)	R(64)	S(0,5)		R(16)		R(64)		S(4)	S(1)			R(32)		S(0,5)	S(8)	S(0,12)	S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4609	POS		S(2)		S(0,25)	R(16)	S(0,5)		R(2)*		R(2)*		S(4)	S(1)			R(32)		S(0,5)	S(8)	S(0,12)	S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4610	POS		S(2)		R(4)	R(16)	S(0,5)		R(16)		R(2)*		S(8)	S(1)			S(4)		S(0,5)	S(4)	S(0,12)	S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4668	POS		S(8)		R(4)	R(64)	S(0,5)		R(16)		R(2)*		S(4)	S(1)			R(32)		S(0,5)	S(8)	S(0,12)	S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4683	POS		S(8)		R(4)	R(64)	S(0,5)		R(16)		R(2)*			S(1)			R(32)		S(0,5)	S(8)			S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4687	POS		S(2)		S(0,25)	R(64)	S(0,5)		R(16)		R(64)			S(1)			I(16)		S(0,5)	S(4)			S(0,25)	
CB-QCA 4688	POS		S(8)		R(4)	R(64)	S(0,5)		R(16)		R(2)*			S(1)			R(32)		S(0,5)	S(8)		S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4694	POS		S(16)		R(4)	R(8)	S(0,5)		R(4)*		R(1)*			S(2)			R(32)		S(0,5)	I(64)	S(0,12)	S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4697	POS		S(2)		R(4)	R(34)	S(0,5)		R(1)*		R(1)*		S(4)	S(1)			R(32)		S(0,5)	S(4)	S(0,12)	S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4699	POS		S(16)		R(4)	R(64)	S(0,5)		R(64)		R(64)		R(64)	R(16)			R(32)		S(0,5)	R(128)	S(0,12)	S(1)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4702	POS		S(8)		R(4)	R(64)	S(0,5)		R(16)		R(2)*		S(8)	S(1)			R(32)		S(0,5)	S(8)		S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4711	POS		S(2)		S(0,25)	R(8)	S(0,5)		R(1)*		R(1)*			S(1)			R(32)		S(0,5)	R(128)	S(0,12)	S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4719	POS		S(2)		S(0,25)	R(8)	S(0,5)		R(1)*		R(1)*			S(1)			R(32)		S(0,5)	R(128)	S(0,12)	S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4731	POS		S(2)		R(4)	R(32)	S(0,5)		R(1)*		R(2)*			S(1)			I(16)		S(0,5)	S(4)	S(0,12)	S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4757	POS		S(2)		R(4)	R(64)	S(0,5)		R(16)		R(64)			S(1)			I(16)		S(0,5)	S(4)		S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4786	POS		S(2)		S(0,25)	R(8)	S(0,5)		S(1)		S(1)		S(4)	S(1)			R(32)		S(0,5)	R(128)	S(0,12)	S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4852	POS		S(2)		R(4)	R(64)			R(16)		R(4)*			S(1)			I(16)		S(0,5)	S(4)			S(0,25)	S(0,25)
CB-QCA 4990	POS	R(32)	S(2)	R(64)	R(4)					R(64)	R(1)*	S(16)		S(1)	S(16)	R(16)	S(4)	S(20)				S(0,5)		S(0,25)
CB-QCA 4991	POS	R(23)	S(4)	I(16)	S(0,25)	S(1)		S(1)		S(4)		S(16)		S(1)	S(16)	S(0,5)	R(32)	R(32)				S(0,5)		S(0,25)
CB-QCA 5004	POS		S(16)		R(4)	R(64)			R(16)		R(64)		S(4)	S(1)			R(32)		S(0,5)	I(64)		S(0,5)	S(0,25)	S(0,25)

CB-QCA, Colección Bacteriana Quito Católica; BLEE, β- lactamasa de espectro extendido; AM, ampicilina; AMK, amikacina; CF, cefalotina; CIP, ciprofloxacina; CRO ceftriaxona; CS, colistina; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; CXM, cefuroxima; FEP, cefepima; FOS, fosfomicina; FOX, cefoxitina; GM, gentamicina; NIF nitrofurantoina; NOR, norfloxacina; SAM, Ampicilina/sulbactam; SXT, trimetoprima/sulfametoxazol; TGC, tigeciclina; TZP, piperacilina/tazobactam; DORI, doripenem ETP, ertapenem; IMP, imipenem; MEM, meropenem; R, resistente; I, intermedio; S, sensible; los valores junto a “I”, “R” o “S” indican la concentración inhibitoria mínima (MIC) para el antimicrobiano respectivo. *Representa resistencia a pesar de estar bajo la MIC.

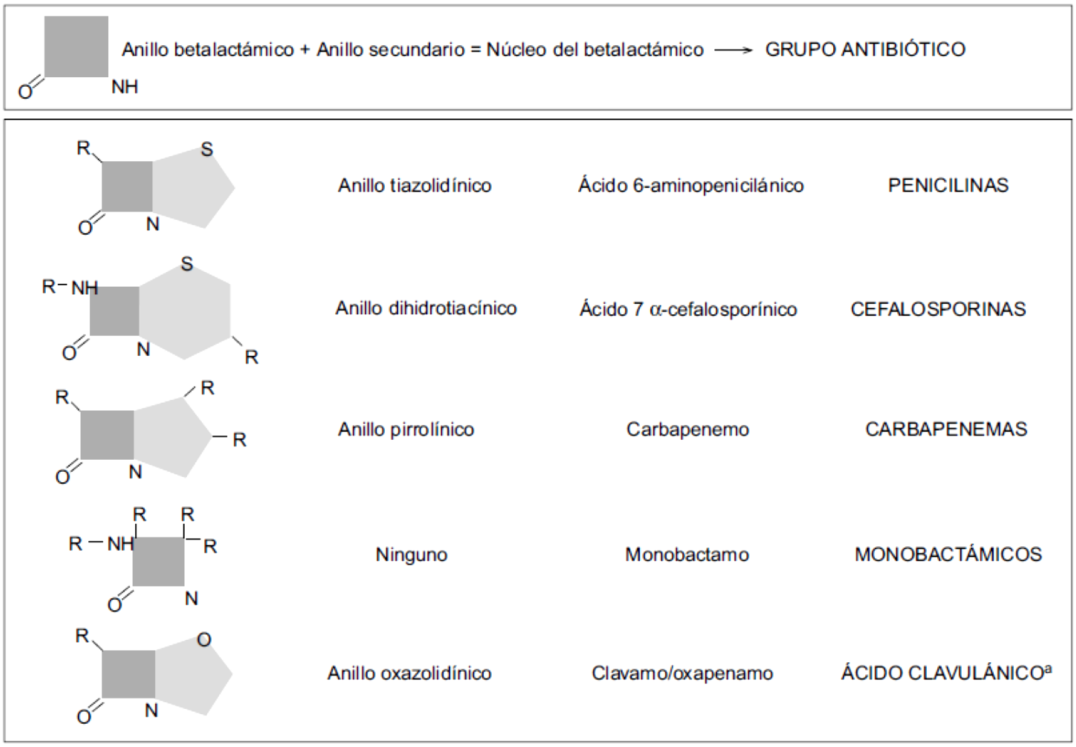
Tabla 9. Presencia y ausencia de los genes *bla*$_{CTX-M-15}$, *bla*$_{TEM-1}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$ y *bla*$_{NDM}$.

Código PUCE	Identificación	*bla*$_{CTX-M-15}$	*bla*$_{TEM}$	*bla*$_{SHV}$	*bla*$_{KPC}$	*bla*$_{VIM}$	*bla*$_{IMP}$	*bla*$_{NDM}$
CB-QCA 4562	*E. coli*	1	1	0	0	0	0	0
CB-QCA 4563	*E. coli*	0	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4567	*E. coli*	0	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4609	*E. coli*	1	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4610	*E. coli*	0	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4668	*E. coli*	1	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4683	*E. coli*	1	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4687	*E. coli*	0	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4688	*E. coli*	1	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4694	*E. coli*	0	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4697	*E. coli*	0	1	0	0	0	0	0
CB-QCA 4699	*E. coli*	1	1	0	0	0	0	0
CB-QCA 4702	*E. coli*	1	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4711	*K. oxytoca*	0	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4719	*K. oxytoca*	0	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4731	*E. coli*	1	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4757	*E. coli*	1	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4786	*K. oxytoca*	0	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4852	*E. coli*	1	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4990	*E. coli*	0	0	0	0	0	0	0
CB-QCA 4991	*E. coli*	0	1	0	0	0	0	0
CB-QCA 5004	*E. coli*	1	0	0	0	0	0	0

CB-QCA, Colección Bacteriana Quito Católica; el número “1” representa presencia y el número “0” representa ausencia.

11. ANEXOS

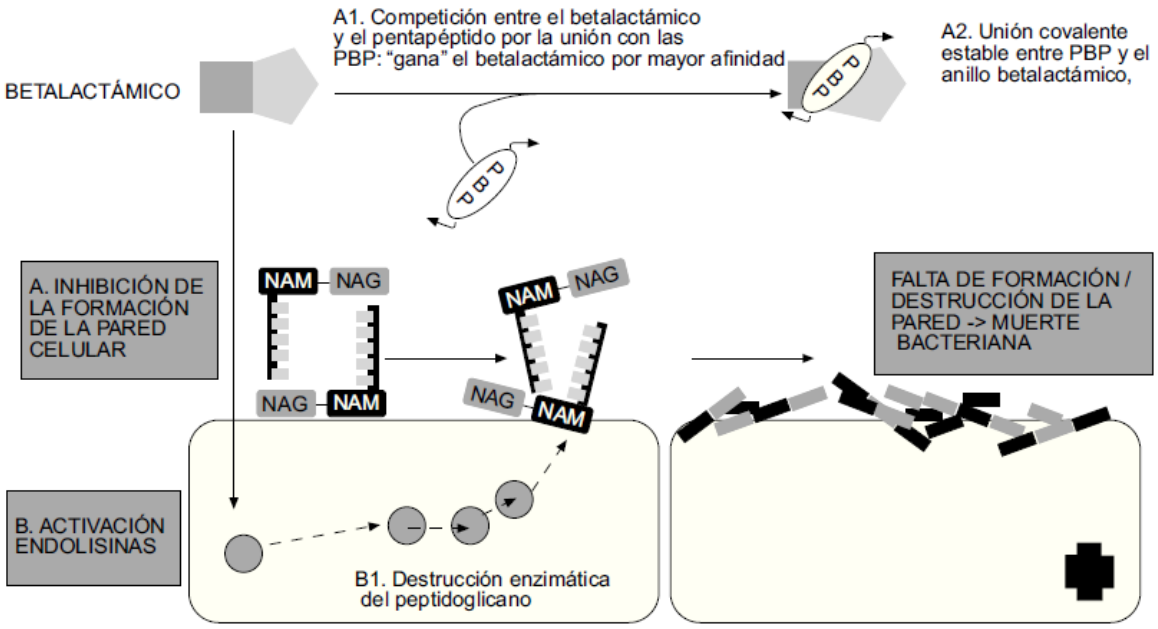
Anexo 1. Estructura química de los β-lactámicos



[a]Todos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.

Tomado de Marín y Gudiol (2003).

Anexo 2. Mecanismos de acción de los β-lactámicos



NAM: Ácido N-acetilmurámico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina: PBP: Penicillin Binding Protein

Tomado de Marín y Gudiol (2003).