

PONTIFICA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE MEDICINA

CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

**TRABAJO DE TIULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE
CEFTOLOZANE/AZOBACTAM MEDIANTE EL MÉTODO DE
MICRODILUCIÓN EN CALDO EN CEPAS DE *Pseudomonas
aeruginosa* PROVENIENTES DEL INSPI, AÑO 2019”**

**ANDREA REGINA AJILA ACUÑA
DANIELA BELÉN OÑA IZA**

Director: Mtr. JOSÉ EDUARDO VILLACÍS ACUÑA

QUITO, 2021

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Andrea Regina Ajila Acuña, C.I. 1719314054; autora del trabajo de graduación intitulado: “Determinación de la actividad de Ceftolozane/Tazobactam mediante el método de microdilución en caldo en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes del INSPI, año 2019”, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina-Carrera de Bioquímica:

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

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



Andrea Regina Ajila Acuña
C.I. 1719314054

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Daniela Belén Oña Iza, C.I. 1721925657; autora del trabajo de graduación intitulado: “Determinación de la actividad de Ceftolozane/Tazobactam mediante el método de microdilución en caldo en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes del INSPI, año 2019”, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina-Carrera de Bioquímica:

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

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



Daniela Belén Oña Iza

C.I. 1721925657

DEDICATORIA

A Dios, gracias a tu bendición y protección este deseo se ha convertido en una meta alcanzada.

A mis padres José y Teresa. Su dedicación y su arduo trabajo se ve reflejado en cada logro de mi vida. Gracias por guiar mis pasos y darme todo su amor. Ustedes siempre creyeron en mí.

A mi abuelita Esperanza, gracias por tus oraciones desde el cielo me sigues bendiciendo.

A mis hermanos Daniel y Melissa, gracias por cuidar de mí y por alentarme a ser mejor cada día.

A Holger, Lucy, Karen y abuelita Mercedes, gracias por sus consejos y el inmenso cariño con el que me recibieron en su hogar.

A ti Jhan, gracias por todo tu amor. Me demostraste que la fe nunca se pierde y que ante cada obstáculo superado saldría victoriosa con una sonrisa. Mi brillo de sol y tú, son mi inspiración para seguir adelante.

Gracias por brindarme su apoyo.

Andrea Regina Ajila Acuña.

DEDICATORIA

A Dios, por guiarme durante este largo camino y siempre estar presente en mi vida.

A Amalia y Estefanía, por su apoyo incondicional, por siempre impulsarme a ser mejor y ayudarme a concluir con éxito mi carrera.

A mi familia y amigos, por sus palabras de aliento que me brindaron durante esta etapa y me apoyaron de una u otra manera.

Daniela Belén Oña Iza.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios, por permitirnos culminar con éxito esta etapa de nuestras vidas.

A nuestras familias por su cariño, su apoyo incondicional y por ser nuestro pilar fundamental durante todo este proceso.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Medicina, Carrera de Bioquímica Clínica que nos permitió desarrollarnos y formarnos tanto profesional como personalmente a través del conocimiento impartido por nuestros docentes.

Al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, especialmente a CNR-RAM, Quito. Gracias a todo el equipo que conforma esta área de trabajo, especialmente a Carito, quienes nos transmitieron sus conocimientos y nos ayudaron a sacar esta investigación adelante. Muchas gracias por su paciencia y amabilidad.

A nuestro director de tesis Mtr. Eduardo Villacís, quien con sus conocimientos nos ha ayudado a culminar esta investigación con éxito. Gracias por la confianza y el apoyo durante este largo camino.

A nuestros lectores, PhD. Andrea Zambrano y Mtr. Andrés Zabala, gracias por su tiempo y dedicación a que este trabajo se culmine con éxito.

A Vivi Albán, gracias por su paciencia y su capacidad para guiarnos en el desarrollo de este trabajo.

A Andrea, por los buenos y malos momentos que vivimos durante este proceso. Gracias por ser mi apoyo y una gran amiga. Este logro es de las dos.

A Daniela, por hacer de esta experiencia un bonito recuerdo de nuestra etapa universitaria. Gracias por confiar en mí, en cada momento me demostraste tu sincera amistad. Con esfuerzo y dedicación lo logramos amiga.

Andrea y Daniela.

RESUMEN

Introducción: La creciente prevalencia de infecciones producidas por *Pseudomonas aeruginosa* es una de las principales causas asociadas a la reducción de alternativas terapéuticas antimicrobianas por el desarrollo de resistencias a múltiples antibióticos. Ceftolozane/tazobactam es una nueva combinación antimicrobiana conformada por una cefalosporina anti-*Pseudomonas* y un inhibidor betalactamasa que ha demostrado tener una potente actividad frente a *P. aeruginosa*, así como una estabilidad ante betalactamasas del tipo *AmpC* y su no afectación por la pérdida de porinas de membrana externa (*OprD*) o por la presencia de bombas de expulsión activa. El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad de ceftolozane/tazobactam (CEF/TAZ) frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mediante el método de microdilución en caldo, a partir de aislados conservados en el INSPI durante el año 2019.

Materiales y Métodos: Se realizó un estudio de tipo *in vitro*, observacional, descriptivo y retrospectivo en el que se analizaron 86 cepas de *P. aeruginosa* procedentes del Centro de Referencia Nacional de Resistencia Antimicrobiana. Se trabajaron con 8 diluciones seriadas (0.25 µg/mL a 32 µg/mL) mediante el método de microdilución en caldo tanto para ceftolozane y CEF/TAZ para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). **Resultados:** Se obtuvo la CMI de CEF/TAZ en las cepas de *P. aeruginosa* con un porcentaje de susceptibilidad de 70.93 % y de resistencia con un porcentaje del 23.26 %. Los resultados de las cepas resistentes de *P. aeruginosa* se confirmaron por el sistema automatizado *Vitek 2 Compact*.

Conclusiones: Al ser el primer estudio realizado en Ecuador, se demostró que ceftolozane/tazobactam presentó una adecuada actividad *in vitro* contra aislados de *P. aeruginosa* con un porcentaje de susceptibilidad del 70.93 % y resistencia del 23.26 % respectivamente.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, ceftolozane/tazobactam, microdilución en caldo, resistencia antimicrobiana.

ABSTRACT

Introduction: The increasing prevalence of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* is one of the main causes associated with the reduction of antimicrobial therapeutic alternatives due to the development of resistance to multiple antibiotics. Ceftolozane/tazobactam is a new antimicrobial combination consisting of an anti-*Pseudomonas* cephalosporin and a beta-lactamase inhibitor that has been shown to have potent activity against *P. aeruginosa*, as well as stability against AmpC-type beta-lactamases and it is not affected by the loss of porins external diaphragm (*OprD*) or by the presence of active ejection pumps. The objective of this study was to determine the activity of ceftolozane/tazobactam (CEF/TAZ) against strains of *Pseudomonas aeruginosa* using the broth microdilution method, from isolates conserved in the INSPI during 2019.

Materials and Methods: We develop an *in vitro*, observational, descriptive and retrospective study in which 86 *P. aeruginosa* strains were analyzed from the National Antimicrobial Resistance Reference Center RAM-Quito. Eight doubled serial dilutions (0.25 µg/mL to 32 µg/mL) were used by the broth microdilution method for both ceftolozane and CEF/TAZ to determine the minimum inhibitory concentration (MIC).

Results: The MIC of CEF/TAZ was obtained in the strains of *P. aeruginosa* with a susceptibility percentage of 70.93 % and resistance with a percentage of 23.26 %. The results of the resistant strains of *P. aeruginosa* were confirmed by the automated system Vitek 2 Compact.

Conclusions: Being the first study carried out in Ecuador, it was shown that ceftolozane/tazobactam presented adequate *in vitro* activity against isolates of *P. aeruginosa* with a susceptibility percentage of 70.93 % and resistance of 23.26 % respectively.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, ceftolozane/tazobactam, broth microdilution, antimicrobial resistance.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN.....	II
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
CAPÍTULO I.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3 OBJETIVOS.....	4
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	4
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.3.3 LIMITACIÓN DEL ESTUDIO.....	4
CAPÍTULO II.....	5
2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....	5
2.1.1 Antecedentes.....	5
2.2 MARCO TEÓRICO.....	6
2.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
2.2.1.1 Historia y taxonomía.....	6
2.2.1.2 Características microbiológicas.....	7
2.2.2 Mecanismos de resistencia.....	9
2.2.2.1 Resistencia intrínseca.....	9
2.2.2.2 Resistencia adquirida.....	11
2.2.2.3 Resistencia adaptativa.....	12
2.2.3 Detección de carbapenemasas.....	14
2.2.4 Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con determinación de la CMI..	15
2.2.5 Método de difusión en agar.....	16

2.2.5.1 Difusión en disco	16
2.2.5.2 Epsilon test (E-test)	17
2.2.6 Método de dilución	17
2.2.6.1 Macrodilución en caldo.....	17
2.2.6.2 Microdilución en caldo	17
2.2.7 Ceftolozane/tazobactam	18
2.2 MARCO CONCEPTUAL.....	20
CAPÍTULO III	22
3.1 MARCO METODOLÓGICO.....	22
3.1.1 MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1.1.1 Tipo de estudio.....	22
3.1.1.2 Muestra	22
3.1.1.3 Criterios de inclusión	22
3.1.1.4 Criterios de exclusión	22
3.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	24
3.3 FASES DEL ESTUDIO	26
3.3.1 Fase I: Solicitudes, permisos y autorizaciones	26
3.3.2 Fase II: Recolección de información	26
3.3.3 Fase III: Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	26
3.3.4 Fase IV: Control de calidad de los procedimientos de laboratorio.....	28
3.3.5 Fase V: Desecho de material biológico.....	30
3.3.6 Fase VI: Análisis estadísticos de datos.....	30
3.4 ASPECTOS ÉTICOS.....	30
CAPÍTULO IV.....	31
4. RESULTADOS	31
4.1. Descripción general de la población en el estudio	31
4.2 Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana	32
4.3 Implementación de microdilución en caldo ceftolozane/tazobactam	50

4.4 Determinación de CMI para ceftolozane/tazobactam en aislados de <i>P. aeruginosa</i>	34
5. DISCUSIÓN	37
6. CONCLUSIONES	42
7. RECOMENDACIONES	60
8. BIBLIOGRAFÍA	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismos de resistencia intrínseca a los antibióticos en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
Figura 2 Situaciones comunes para la manifestación de resistencias adaptativas.....	12
Figura 3 Mecanismos de resistencia a antibióticos mediada por biopelículas	13
Figura 4 Estructuras químicas de Ceftolozane y Tazobactam.....	18

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Distribución de los micropocillos para la microdilución de ceftolozane. ... ¡Error! Marcador no definido.	
Tabla 2 Solución de trabajo de ceftolozane/tazobactam.	62
Tabla 3 Distribución de los micropocillos para la microdilución en caldo de ceftolozane/tazobactam.	63
Tabla 4 Plantilla de recolección de datos.	64
Tabla 5 Tabla de contingencia de variables clínico-epidemiológicas.	32
Tabla 6 Perfiles de susceptibilidad de las 86 cepas de <i>P. aeruginosa</i>	33
Tabla 7 Resultados de reproducibilidad cepas ATCC para ceftolozane/tazobactam ...	34
Tabla 8 Resultados de la CMI de ceftolozane y ceftolozane/tazobactam de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> , realizado por las investigadoras.	35
Tabla 9 Relación del servicio hospitalario frente aislados sensibles y resistentes de <i>P. aeruginosa</i> a ceftolozane/tazobactam.	36
Tabla 10 Comparación de los métodos de microdilución en caldo y sistema automatizado Vitek 2 Compact de 10 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a ceftolozane/tazobactam.	36

ANEXOS

Anexo 1 Carta de autorización al INSPI.....	52
Anexo 2 Carta de aprobación del estudio del Comité de ética de la Universidad San Francisco de Quito.....	54
Anexo 3 Protocolo de preparación de la solución madre de ceftolozane.....	56
Anexo 4 Preparación de solución de trabajo para ceftolozane.....	57
Anexo 5 Protocolo de preparación de la solución madre de tazobactam.	60
Anexo 6 Fotografías de las microplacas del método de microdilución en caldo ceftolozane/tazobactam (CEF/TAZ).....	64
Anexo 7 Protocolo de desecho de material biológico.....	65
Anexo 8 Autorización del INSPI.....	66

LISTA DE SIGLAS

- AST:** Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana
- BLEE:** Betalactamasa de espectro extendido
- CAMHB:** Caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes
- CEF/TAZ:** Ceftolozane/tazobactam
- CIAs:** Infecciones intraabdominales complicadas
- CIM:** Método de inactivación de carbapenémicos
- CMI:** Concentración mínima inhibitoria
- CLSI:** Clinical & Laboratory Standards Institute
- cUTIs:** Infecciones complicadas del tracto urinario
- DPA:** Ácido dipicolínico
- EARS:** Red europea de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- ECDC:** Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades
- FDA:** Food and Drug Administration
- GES:** Guiana extended spectrum
- HABP:** Neumonía adquirida en el hospital
- IAAS:** Infecciones asociadas a la atención de la salud
- mCIM:** Método de inactivación de carbapenémicos modificados
- MDR:** Resistencia a múltiples fármacos
- MHT:** Prueba Hodge modificada
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- OPS:** Organización Panamericana de la Salud
- OXA:** Oxacilinas
- PBP:** Proteínas de unión a la penicilina
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- ReLAVRA:** Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos
- SENTRY:** Antimicrobial Surveillance Program
- UCI:** Unidad de cuidados intensivos
- VABP:** Neumonía asociada al ventilador
- XDR:** Extremadamente resistente

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Las bacterias resistentes a múltiples fármacos (MDR) no solo han representado un problema a nivel mundial en términos de aumento de morbilidad y mortalidad en los pacientes, sino que también suponen enormes costos adicionales para el sistema sanitario (García Fernández et al., 2019). A fines del 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en sus directrices para la prevención y el control estableció un listado de bacterias resistentes a los antibióticos, advirtiendo la necesidad de desarrollar nuevas moléculas contra patógenos de alta prioridad como Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* (Organización Mundial de la Salud, 2017).

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo que se encuentra distribuido de manera ubicua en la naturaleza, suelo y agua (Yi-Wei, Sussman, Dongyou, & Schwartzman, 2015). Respecto a infecciones humanas, se lo clasifica como un patógeno oportunista, que presenta bajos requerimientos nutricionales y puede adaptarse a condiciones hostiles que otros organismos no son capaces de tolerar. Además, manifiesta una notable capacidad para desarrollar resistencia a los agentes antimicrobianos mediante numerosos mecanismos en evolución ya sean intrínsecos o adquiridos (Yi-Wei et al., 2015).

A nivel mundial, *Pseudomonas aeruginosa* es considerado la quinta causa más común de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS), provocando así el aumento constante de la resistencia a los antimicrobianos (Goodlet & Nicolau, 2017). En los últimos años, la prevalencia de cepas de *P. aeruginosa* MDR se ha elevado, con tasas de entre el 15 % y el 30 % en países desarrollados como Estados Unidos y España respectivamente (Horcajada, 2019); en países de América Latina, México reportó 11.60 % y Venezuela un 10.30 % mostrando así las tasas más altas a nivel de la región (Huerta-Gutiérrez et al., 2019). Con frecuencia, en países en vías de desarrollo, se suministran antibióticos sin receta en un 78 %, lo que ocasiona que la gama de agentes terapéuticos activos sea cada vez más limitada por la aparición y propagación de resistencia a los antibióticos (Auta et al., 2019).

Considerando un incremento en términos de resistencia, se han desarrollado nuevos antibióticos que poseen una mayor actividad contra *P. aeruginosa* y que actúan como

sustitutos prometedores en la terapia antimicrobiana. Ceftolozane/tazobactam (CEF/TAZ) es una combinación antimicrobiana de amplio espectro, activa frente a bacterias Gram negativas incluyendo *P. aeruginosa*, formada por una cefalosporina de quinta generación, una penicilina sulfona y un inhibidor de betalactamasas irreversible (Barnes et al., 2018). Ceftolozane/tazobactam, también conocido como Zerbaxa, cuenta con la aprobación de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, *por sus siglas en inglés* Food and Drug Administration) y de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) (Helio, Jones, & Castanheira, 2014).

La actividad antimicrobiana de CEF/TAZ se ha evaluado en países de América Latina como Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, México y Panamá (Ponce de Leon et al., 2020), sin embargo, hasta la fecha no se han realizado investigaciones con aislamientos procedentes de Ecuador. Debido a la importancia clínica de este antimicrobiano en *P. aeruginosa* se propone la presente investigación en la que se usaron cepas aisladas de *P. aeruginosa* del año 2019, procedentes de Centro Nacional de Referencia a los Antimicrobianos (CNR-RAM) del INSPI-Quito para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de ceftolozane y ceftolozane/tazobactam con la finalidad de determinar su perfil de susceptibilidad, siendo este el primer estudio realizado en el Ecuador.

Por esta razón, se pretende responder a la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la actividad de ceftolozane/tazobactam frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mediante el método de microdilución en caldo, a partir de aislados conservados en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública en el año 2019?

1.2 JUSTIFICACIÓN

La sobreutilización de antibióticos ha prolongado la estancia hospitalaria de los pacientes debido a la generación de resistencia antimicrobiana. Según Sorbera y colaboradores (2014) afirman: “En el tratamiento de infecciones resistentes a antimicrobianos en comparación con infecciones no resistentes a antimicrobianos ha existido una prolongación de estadía en hospitales (6 a 12 días), aumento de la mortalidad e incremento de costos médicos” (p. 825), por lo que se busca combatir esta resistencia antimicrobiana con el desarrollo de un nuevo agente antimicrobiano como lo es ceftolozane/tazobactam, una cefalosporina anti-*Pseudomonas* con un inhibidor betalactamasa.

P. aeruginosa posee múltiples mecanismos de resistencia a varios antimicrobianos de uso común, por lo cual, es una prioridad la implementación de nuevas opciones terapéuticas que no se vean afectadas por la interacción de los mecanismos de resistencia de este microorganismo como son: producción de betalactamasas, pérdida de porina y bombas de eflujo (Cluck, Lewis, Stayer, Spivey, & Moorman, 2015). La combinación ceftolozane/tazobactam, es particularmente activa contra aislados MDR incluyendo la resistencia a los carbapenémicos, siendo un gran aporte para tratar infecciones causadas por bacterias Gram negativas incluido *P. aeruginosa* (Ortiz de la Rosa, Nordmann, & Poirel, 2019).

Uno de los aspectos más relevantes de CEF/TAZ es la estabilidad que ceftolozane presenta a la hidrólisis del PDC (*Pseudomonas* derived cephalosporin, cefalosporina derivada de *Pseudomonas*). A diferencia de tazobactam, ceftolozane inhibe las PBP (penicillin-binding proteins, proteínas de unión a penicilina) permitiendo que tazobactam se dirija a otras serin-betalactamasas y betalactamasas de espectro extendido (BLEE) que suelen estar presentes en *P. aeruginosa* (Barnes et al., 2018). En Estados Unidos, Europa y Asia la resistencia a ceftolozane/tazobactam, en comparación con los antimicrobianos anti-*Pseudomonas* fue mínima y, la susceptibilidad a esta molécula se ha mantenido en microorganismos que muestran resistencia a otros agentes antimicrobianos de uso común (Sorbera, Chung, Ho, & Marzella, 2014).

En base al análisis microbiológico y clínico, es necesario una evaluación de la actividad de ceftolozane/tazobactam con el fin de generar evidencia científica sobre la cual se respalde la posible mejora en características como permeabilidad de la membrana externa y estabilidad frente a la betalactamasa cromosómica de *AmpC* en comparación

con otros antibióticos betalactámicos mediante del método de microdilución en caldo en cepas de *P. aeruginosa* y, además, contribuir con la vigilancia de resistencia antimicrobiana en el país.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* frente a ceftolozane/tazobactam mediante el método de microdilución en caldo, a partir de aislados conservados en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública durante el año 2019.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar la técnica de microdilución en caldo para ceftolozane/tazobactam en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de aislados conservados en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública durante el año 2019.
- Establecer el perfil de sensibilidad de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos a partir de aislados conservados en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública durante el año 2019 frente a ceftolozane/tazobactam por el método de microdilución en caldo.
- Determinar la sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* con el tipo de muestra y el servicio hospitalario de acuerdo con la información de los aislados proporcionada por el INSPI.

1.3.3 LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

La investigación se centra en determinar la actividad de *Pseudomonas aeruginosa* frente a la combinación de antibióticos ceftolozane/tazobactam, en cepas conservadas en el INSPI-Quito mediante el método de microdilución en caldo para determinar la resistencia o sensibilidad a los mismos, sin llegar a la caracterización molecular de estas.

CAPÍTULO II

2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1.1 Antecedentes

Pseudomonas aeruginosa se encuentra entre las principales causas de infección asociada a la asistencia sanitaria a nivel mundial. El Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Intrahospitalarias de Estados Unidos presentó una publicación acerca de los datos obtenidos de *P. aeruginosa* durante los años 1986-2002, determinando que este microorganismo es la segunda causa de neumonía (18.10 %), la tercera causa de infecciones urinarias (16.30 %) y el octavo patógeno más frecuentemente aislado del torrente sanguíneo (3.40 %) (Hirsch & Tam, 2012). Sin embargo, durante el año 2003 existió un incremento elevado de aislamientos resistentes a diferencia de los años mencionados anteriormente, convirtiéndose así en una problemática alarmante debido a que las tasas de resistencia a imipenem, quinolonas y cefalosporinas de tercera generación aumentaron en 15.90 % y 20 % respectivamente, siendo estos medicamentos los de primer uso en la terapia antimicrobiana (Hirsch & Tam, 2012).

Durante los años 2005-2009 en América Latina, *P. aeruginosa* ocupaba el quinto lugar de los microorganismos que con mayor frecuencia se aislaban en los hospitales (Villa et al, 2013). En este mismo rango de años, el sistema de vigilancia del Grupo para el Control de Resistencia Bacteriana de Bogotá (GREBO) obtuvo un total de 203.401 aislados, de los cuales 66.936 corresponden a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y 136.465 de salas de hospitalización, y se encontró que el 4.90 % correspondió a *P. aeruginosa* es decir, 9905 casos del total de cepas aisladas, de los cuales 3558 provenían de la UCI y 6347 en salas de hospitalización (Villa et al., 2013).

En Ecuador, en el año 2010, el Sistema de Vigilancia y Control de las Infecciones Intrahospitalarias reportaron 486 casos y 573 eventos de infecciones intrahospitalarias por *P. aeruginosa*, observando un incremento del 10 % respecto al año 2009 con una prevalencia del 8 %, mientras que en el año 2011 reportaron 489 casos y 547 eventos de infecciones intrahospitalarias con una prevalencia del 3.75 % (Hospital de Especialidades Eugenio Espejo, 2011). En el reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador, durante el periodo 2014 al 2017 se evidenció que los aislados hospitalarios de *P. aeruginosa* presentaron porcentajes de resistencia hasta del 30 % para carbapenémicos como imipenem y meropenem (Ministerio de Salud Pública, 2019).

A nivel mundial, debido al aumento de la mortalidad de los pacientes, se han realizado diversos esfuerzos para promover la investigación sobre el tratamiento de microorganismos resistentes basados en el descubrimiento y desarrollo de nuevos antimicrobianos (Olarte, Cáceres, & Cortés, 2018). Es por ello, que se han desarrollado nuevas combinaciones de cefalosporinas con inhibidores de betalactamasas como ceftolozane/tazobactam, que brinda una mejor alternativa para el manejo de los pacientes con infecciones por microorganismos resistentes mediante la ampliación del espectro antimicrobiano (Olarte, Cáceres, & Cortés, 2018).

Ceftolozane es una nueva cefalosporina recientemente descubierta que se está introduciendo en el mercado. Este antibiótico posee una buena actividad *in vitro* contra *P. aeruginosa* que no afectada a gran parte de los mecanismos de resistencia a betalactamasas como son las de tipo *AmpC*, *MexAB* y *MexXY*. La combinación con el inhibidor de betalactamasa, tazobactam, extiende el espectro de actividad de ceftolozane contra muchas betalactamasas de espectro extendido que producen las enterobacterias y *P. aeruginosa* (Giani, Arena, & Pollini, 2018).

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1.1 Historia y taxonomía

A finales del siglo XIX en el Instituto Tecnológico de Karlsruhe ubicado en Alemania, el docente Walter Migula, describió por primera vez al género bacteriano *Pseudomonas* como “células con órganos polares que puede formarse en algunas especies”, sin embargo, lo que denominó como esporas” en realidad eran gránulos refráctiles de materiales de reserva. En 1872, el investigador Schroeter planteó el término *aeruginosa*, haciendo referencia a la manifestación de los colores verdeazulado que la bacteria presentaba en ciertas condiciones del medio de cultivo (Paz Zarza et al., 2019). Posteriormente, los profesionales en el área de microbiología reconocieron a esta especie bacteriana productora de pirocina con una nomenclatura oficial “*Pseudomonas aeruginosa*” debido a su homogeneidad fenotípica.

Respecto a la taxonomía de *Pseudomonas spp.* existieron varias modificaciones que se basaron a partir de su morfología bacteriana, factores de patogenicidad y perfil metabólico. En el año 1973, Palleroni reportó una clasificación genotípica basada en la secuenciación de la subunidad del ARNr 16S, en la que analizó el género *Pseudomonas* y lo dividió en cinco subgrupos, quedando solo las especies más representativas del primer grupo en el grupo original (Paz Zarza et al., 2019). Hoy en día, la taxonomía de

este microorganismo es la siguiente: dominio *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Pseudomonadales*, familia *Pseudomonadaceae* y el género *Pseudomonas*.

2.2.1.2 Características microbiológicas

A nivel microbiológico, *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo que es capaz de sobrevivir en una amplia gama de entornos. Se caracteriza por ser una bacteria en forma de bastón con un tamaño aproximadamente de 1.5 a 5 µm de largo y 0.5 a 1 µm de diámetro, posee un flagelo polar que le otorga la motilidad necesaria, y crece a una temperatura de 37 a 42 ° C (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2016). Además, es considerada como una bacteria aerobia facultativa, ya que en ocasiones puede desarrollarse en condiciones anaerobias mediante el uso de arginina y nitrógeno como terminal de aceptación de protones (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2016).

Pseudomonas aeruginosa es catalasa y oxidasa positiva, del grupo no fermentadores lo que lo confiere la incapacidad de fermentar lactosa, pero una gran cantidad de cepas oxidan glucosa debido a poseen la capacidad de utilizar fuentes de carbono y nitrógeno, consiguiendo energía por medio de la oxidación de azúcares (Paz Zarza et al., 2019).

Un cultivo *P. aeruginosa* puede producir múltiples tipos de colonias, en ciertos casos algunas cepas producen hemólisis. Las colonias son de forma redondas y lisas llegando a producir una variedad de pigmentos hidrosolubles que le dan dicha coloración, como la piocianina (pigmento azulado verdoso no fluorescente), pioverdina (pigmento verde amarillento fluorescente), piorrubina (pigmento rojo oscuro) o piomelanina (pigmento negro) (Brooks et al., 2011).

2.2.1.3 Epidemiología

La OMS ha proporcionado información relevante sobre la multirresistencia de *Pseudomonas aeruginosa* debido a que se considera como la quinta amenaza para la salud humana, por lo cual se sugiere realizar talleres y conversatorios acerca de la multirresistencia antimicrobiana que hasta la actualidad no han podido sobrellevarse adecuadamente (Montero, 2013).

P. aeruginosa es considerado como uno de los principales patógenos en el entorno intrahospitalario o también conocido como microorganismos “problema o conflictivos”, por lo que tiene una gran capacidad para desarrollar resistencias ya sea por mutaciones

cromosómicas o debido a la adquisición de genes localizados en elementos transferibles (Ruiz-Garbajosa & Cantón, 2017). Las infecciones causadas por estos genes perjudican la adecuación de la terapia antimicrobiana empírica y definitivo, por lo que en diversos artículos se plantean temas sobre la introducción de nuevos antibióticos con una potente actividad frente a *P. aeruginosa* MDR y extremadamente resistente (XDR, *por sus siglas en inglés* extensively drug) para abrir nuevos horizontes en cuanto al tratamiento de las infecciones relacionadas con esta bacteria (Ruiz-Garbajosa & Cantón, 2017).

El programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY ha mencionado en sus informes de 1997 y 2001 que América Latina presentó altos niveles de resistencia antimicrobiana en comparación con otras regiones como América del Norte y Europa. De igual manera, el Programa Europeo para la Vigilancia de Resistencia a Antimicrobianos (EARSS) publicado en 2007, determina que las tasas de resistencia a carbapenémicos en seis países ha superado el 25 %, y Grecia presentó la tasa de resistencia más alta con un 51 % (Ossa-Giraldo et al., 2014).

Los datos reportados por el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC, *por sus siglas en inglés* European Center for Disease Prevention and Control), para el año 2014 fue del 13 % para cepas de *P. aeruginosa* resistentes a más de 3 familias de antibióticos junto con un incremento del 3 % de aislados multi-resistentes en este año; mientras que en los años 2007 y 2010 se observó un incremento del 12 % y 15 % respectivamente (Ruiz-Garbajosa & Cantón, 2016). Así mismo, la elevada policlonalidad de *P. aeruginosa* también se ha correlacionado con clones de alto riesgo demostrando la expansión y agrupación de cepas MDR que, en presencia de una elevada presión antibiótica, son capaces de seleccionarse y persistir a lo largo del tiempo (Ruiz-Garbajosa & Cantón, 2016).

A nivel de América del Sur, este patógeno ocupa el quinto lugar en infecciones sanguíneas relacionadas con catéteres venosos centrales en personas adultas representando el 8.5 % del año 2016 en Brasil (Tuon et al., 2020). Es por ello que los representantes de laboratorio considerados como referencia en los países que integran la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos (ReLAVRA) coordinada por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la OMS presentaron un consenso latinoamericano, en el cual se propuso un estudio piloto que incluye tres microorganismos Gram negativos que son de importancia en el ambiente hospitalario: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. y así poder categorizar, definir y notificar microorganismos MDR, lo que permitió reducir la

resistencia a los antimicrobianos mediante un marco estandarizado y consensuado (Pearson et al., 2019).

2.2.2 Mecanismos de resistencia

P. aeruginosa presenta varios mecanismos de resistencia como alteraciones o pérdida de porinas, hiperproducción de la betalactamasa cromosómica *AmpC*, sobreexpresión de bombas de expulsión activa y betalactamasa plasmídicas, los mismos que se han expresado en distintas familias de antimicrobianos como son los betalactámicos, sulfonamidas, quinolonas y aminoglucósidos (Luján Roca, 2014).

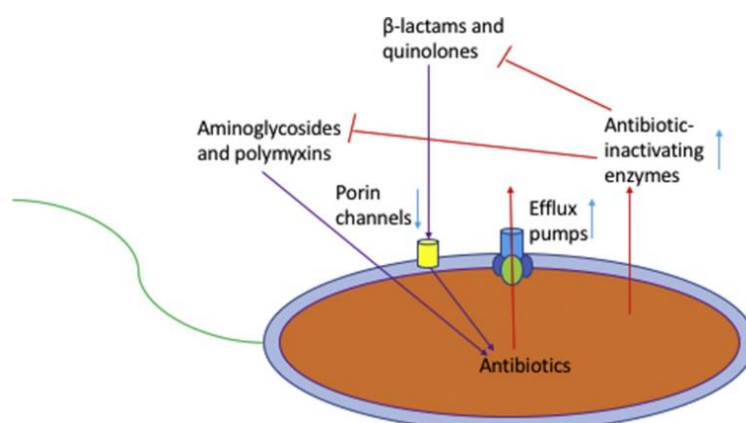
En general, los mecanismos de resistencia más representativos que ha presentado *P. aeruginosa* se clasifican en resistencia intrínseca, resistencia adquirida y resistencia adaptativa (Pang et al., 2019).

2.2.2.1 Resistencia intrínseca

La resistencia intrínseca se basa en la capacidad innata de disminuir la eficacia de un antibiótico específico mediante características estructurales o funcionales inherentes, como se observa en la Figura 1. *P. aeruginosa* a través de los sistemas de flujo de salida que bombean antibióticos fuera de la célula y la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos como betalactamasas que presentan un alto nivel de resistencia intrínseca, así como también una restringida permeabilidad de la membrana externa (Pang et al., 2019).

Figura 1

Mecanismos de resistencia intrínseca a los antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*.



Nota. Tomado de Pang et al., 2019.

2.2.2.1.1 Alteraciones o pérdida de la porina

El rol principal de la membrana externa de *P. aeruginosa* en la resistencia a los antibióticos radica en las porinas. Estas son canales acuosos que actúan como filtros que limitan que pequeñas moléculas hidrofílicas penetren, excluyendo a grandes moléculas, como en el caso de los pequeños antibióticos hidrofílicos betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas y ciertas fluoroquinolonas que pueden acceder a la célula (Zowalaty, 2015; Riera, et al., 2011). Por lo que existe una limitación en cuanto al ingreso de los antimicrobianos a sus dianas intracelulares a causa de la pérdida como alteración de las porinas (Riera et al., 2011).

P. aeruginosa produce varias porinas que se encuentra en su membrana externa, como *OprC*, *OprD*, *OprE*, *OprF* y *OprG*. Sin embargo, la porina en mayor número es *OprF* ya que presenta una difusión lenta e inespecífica de solutos (Luján Roca, 2014). También se destaca la porina *OprD*, la cual se caracteriza por ser la vía principal de entrada de las carbapenemasas en la célula bacteriana; la pérdida o inactivación de esta porina ocasiona que la sensibilidad al meropenem disminuya y provoca resistencia a imipenem en *P. aeruginosa* (Ophelie & Molin Queste, 2016).

2.2.2.1.2 Sobreexpresión de bombas de expulsión activa

Las bombas de eflujo bacteriana se caracterizan por ser una estructura de proteína capaz de expulsar compuestos tóxicos como los antimicrobianos del citoplasma y periplasma bacteriano, este sistema ha permitido determinar ciertos fenotipos de resistencia que presenta *P. aeruginosa* a los betalactámicos y a otros antimicrobianos (Luján Roca, 2014).

Las bombas de eflujo se clasifican en: familia de división de nodulación de resistencia, superfamilia de casetes de unión a ATP, superfamilia de facilitadores principales, familia pequeña de resistencia a múltiples fármacos y familia de extrusión de compuestos tóxicos y de múltiples fármacos. Estas familias se ubican de acuerdo a la fuente de energía y especificidad del sustrato. *P. aeruginosa*, y a la secuenciación de aminoácidos presentes dentro de la familia RND, la cual se caracteriza por presentar cuatro bombas activas como es el sistema MexAB-oprM, responsable de la expulsión de betalactámicos como fluoroquinolonas, cloranfenicol, macrólidos, tetraciclina, novobiocina, trimetoprima y sulfonamidas, excepto imipenem (Paz Zarza et al., 2019).

2.2.2.1.3 Hiperproducción de la betalactamasa cromosómica *AmpC*

Las betalactamasas se caracterizan por ser enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico de los antimicrobianos, destruyendo así el sitio activo del antibiótico e impiden su actividad (Luján Roca, 2014). Se caracterizan por su capacidad para inhibir ciertos subgrupos de betalactámicos, y en algunas subclasificaciones se las denominan penicilinasas, cefalosporinasas o carbapenemasas dependiendo de la familia de betalactámicos a la que presenten altas tasas de susceptibilidad a ser atacadas por la enzima (Luján Roca, 2014).

Existen dos clases de betalactamasas de *P. aeruginosa*: *AmpC* y BLEE. La producción de betalactamasa *AmpC* inducidas de naturaleza por cromosomas hace que *Pseudomonas aeruginosa* presente una resistencia variable a la mayoría de las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y en forma variable a aztreonam. La betalactamasa *AmpC* está codificada por el gen *AmpC* y su expresión es parcialmente controlada por el factor regulador *AmpR*. Los genes *AmpC* producen niveles bajos de betalactamasa *AmpC*, pero pueden producir altos niveles en presencia de ciertos betalactámicos como ceftioxitina e imipenem al ser inducido. La presencia de niveles adecuados de inductores promueve la sobreexpresión del gen *AmpC* y por tanto aumenta la producción de la betalactamasa cromosómica (Paz Zarza et al., 2019).

2.2.2.2 Resistencia adquirida

La resistencia adquirida en *P. aeruginosa* contribuye en gran medida al desarrollo de cepas resistentes a múltiples fármacos y, esto sucede por cambios mutaciones o mediante la transferencia horizontal de genes para obtener genes de resistencia (Pang et al., 2019).

2.2.2.2.1 Betalactamasas plasmídicas

La capacidad de transmisibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* ha ocasionado una alta frecuencia de betalactamasas plasmídicas generando de tal manera una inactivación enzimática del antibiótico. Entre las betalactamasas plasmídicas se encuentran betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas de clase A. Las BLEE presentan una codificación plasmídica favorable para la diseminación entre cepas de la misma especie por lo que puede inactivar penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, oximino-cefalosporinas y aztreonam (Pérez Gallego, 2019). Existen 5 tipos de enzimas de las carbapenemasas de clase A: NMC, SME, IMI, GES y KPC, pero solo GES y KPC se consideran plasmídicas y están presentes en *P. aeruginosa*.

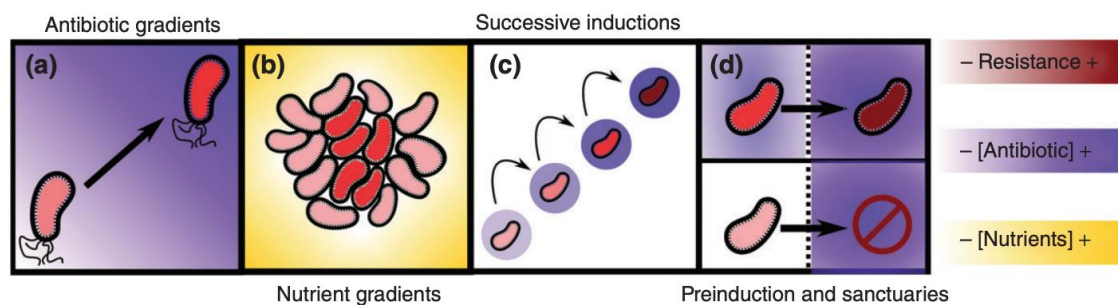
Las enzimas tipo KPC presentan dos variantes en *P. aeruginosa* que son KPC-2 y KPC-5, estas variantes se caracterizan por desarrollar una elevada transmisión y dispersión, aunque la eficiencia de hidrólisis de carbapenémicos y monobactams es 10 veces menor que la de las penicilinas y cefalosporinas. Así mismo, las enzimas tipo GES presentan dos variantes presentes en *P. aeruginosa* que son GES-1 y GES-5 pero estas se diferencian por demostrar una acción exclusiva sobre los monobactams (Pérez Gallego, 2019).

2.2.2.3 Resistencia adaptativa

La resistencia adaptativa en *P. aeruginosa* comprende la formación de biopelículas en los pulmones de pacientes infectados, las cuales sirven como barrera de difusión para limitar el acceso de antibióticos a las células bacterianas. Esto se debe a la alta capacidad de la bacteria por sobrevivir al ataque del antibiótico ante alteraciones transitorias en la expresión de genes o en las proteínas que dan respuesta a un estímulo y puede ser reversible al eliminarse el mismo Figura 2 (Pang et al., 2019).

Figura 2

Situaciones comunes para la manifestación de resistencias adaptativas.



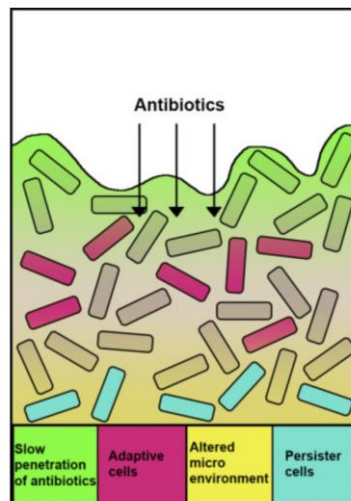
Nota. (a) Los gradientes de antibióticos promueven el rápido desarrollo de resistencia. (b) Los gradientes de nutrientes inducen distintas fases de crecimiento en las poblaciones bacterianas, que están relacionadas con diferentes niveles de resistencia. Escenarios como las biopelículas, presentan una baja permeabilidad y tienden a generar niveles heterogéneos de resistencia; así como, la baja permeabilidad y formación de gradientes también se aplica a los antibióticos. (c) Choques antibióticos sucesivos y crecientes ocasionan rápidamente poblaciones con altos niveles de resistencia. (d) El contacto con concentraciones subinhibidoras de antibióticos aumenta significativamente la resistencia de las poblaciones bacterianas cuando más tarde expuestas a concentraciones letales. Tomado de Sandoval-Motta & Aldana, 2016.

2.2.2.3.1 Resistencia mediada por biopelículas

La formación de biopelículas se da por agregados de microorganismos que tienden a adherirse entre sí en una superficie viva o no viva, de los cuales se encuentran dentro de una matriz autoproducida de sustancias poliméricas extracelulares, así como exopolisacáridos, proteínas, metabolitos y DNA extracelular Figura 3. Según Pang et al. (2019), el crecimiento de las células microbianas en las biopelículas provoca una disminución de la sensibilidad a los agentes antimicrobianos y a la respuesta inmune del hospedador que aquellas células que se desarrollan en suspensión acuosa libre, incluso las bacterias que presentan una resistencia intrínseca deficiente son menos susceptibles.

Figura 3

Mecanismos de resistencia a antibióticos mediada por biopelículas.



Nota. **(Verde)** Los antibióticos ingresan lentamente en la biopelícula. **(Rosa)** Algunas células de biopelícula expresan una respuesta adaptativa al estrés lo que les permite sobrevivir en condiciones difíciles. **(Amarillo)** El microambiente químico alterado dentro de la biopelícula induce un crecimiento lento de bacterias, lo que reduce la absorción de antibióticos. **(Celeste)** Formación de células persistentes tolerantes a múltiples fármacos. Tomado de Pang et al., 2019.

Los mecanismos de resistencia mediada por biopelículas que defienden a las bacterias del ataque de antibióticos incluyen la prevención de la penetración de antibióticos, microambiente alterado que provoca un crecimiento lento de células de biofilm, inducción de una respuesta adaptativa al estrés y diferenciación celular persistente (Pang et al., 2019).

2.2.2.3.2 Células persistentes bacterianas

Las células persistentes se caracterizan por ser variantes fenotípicas que pueden o no ser genéticamente resistentes a los antibióticos, pero si son flexibles frente a altas concentraciones de antibióticos, esto perjudica al momento de tratar infecciones causadas *P. aeruginosa* (Pang et al., 2019). Alrededor del 1 % de las células persistentes son de crecimiento lento, tolerantes a antibióticos y metabólicamente inactivas (Lewis, 2010).

2.2.3 Detección de carbapenemasas

El principal desafío en la detección de carbapenemasas en *P. aeruginosa* no se considera la falta de sensibilidad del cribado por CMI de carbapenemasas, sino por la baja especificidad que posee debido a que es más común desarrollar resistencia a carbapenemasas a través de mecanismos mutacionales. Respecto a ello, la desventaja entre *P. aeruginosa* y enterobacterias se da por los mecanismos mutacionales ya que son menores en relación a la resistencia de carbapenémicos (Nicolau & Oliver, 2010).

La temprana detección de carbapenemasas en cepas de *P. aeruginosa* es de suma importancia para la rápida adaptación de la terapia de antibióticos y para implementar procedimientos de control de infecciones, entre las cepas de mayor frecuencia se encuentran principalmente la clase B metalo-betalactamasas [MBL] de los tipos IMP, VIM, SPM, GIM, AIM, DIM y NDM, pero en menor porcentaje, la clase A de Ambler (GES y KPC) y clase D (OXA). Esto se debe a que la producción de carbapenemasas en *P. aeruginosa* produce un alto nivel de resistencia a los carbapenémicos por los mecanismos de resistencia mencionados anteriormente (Dortet, Poirel, & Nordmann, 2012).

En la actualidad, existen diversos ensayos bioquímicos, fenotípicos y genéticos para la detección de carbapenemasas en *P. aeruginosa* como pruebas colorimétricas rápidas prueba Carba NP y prueba Blue-Carba, métodos basados en inhibidores como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), mercaptoacetato de sodio y ácido dipicolínico (DPA), ensayos inmunocromatográficos, método de inactivación de carbapenémicos (CIM), método de inactivación de carbapenémicos modificados (mCIM) y el método CIMtris en el que mCIM utiliza Tris-HCl (Gutiérrez et al., 2019).

Según el estudio de Bouslah, 2019 la principal desventaja de los ensayos fenotípicos basados en el crecimiento de aislados, como la prueba Hodge modificada (MHT) son los defectos de funcionamiento y la dificultad en la interpretación de resultados, mientras

que el método de inactivación de carbapenémicos presenta un largo tiempo de respuesta. En el caso de las pruebas basadas en inhibidores se consideran que son sencillas en cuanto al procedimiento y fáciles de interpretar. Además, cuentan con disponibilidad comercial a nivel mundial como la prueba de sinergia disco combinada o prueba de sinergia de doble disco (Bouslah, 2019). La prueba Carba NP se consideró como el primer ensayo cromogénico disponible para identificar productores de carbapenemasas con alta especificidad, sensibilidad y rapidez, hasta ahora se han realizado varias modificaciones a la prueba para mejorar el rendimiento y reducir el tiempo de procesamiento (Bouslah, 2019).

Los métodos moleculares son el estándar de oro por presentar un alto porcentaje de sensibilidad y especificidad para la detección e identificación de genes de carbapenemasa. Entre los métodos moleculares se encuentran PCR, PCR multiplex, qPCR y microarray; aunque, en ciertos estudios se consideran como una alternativa de alto costo que requiere un mayor grado experiencia en operadores, así como equipos específicos que no se encuentran disponibles en laboratorios no especializados (Gutiérrez et al., 2019).

2.2.4 Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con determinación de la CMI

En un laboratorio de microbiología se recomiendan utilizar diferentes métodos para determinar patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados bacterianos, dada la variedad de especies bacterianas que deben analizarse y sus diferentes requisitos de crecimiento (Tenover, 2015). Por esta razón, existen las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (AST) para confirmar la susceptibilidad de los microorganismos a ciertos antimicrobianos y la detección de resistencia del antibiótico en alguna cepa bacteriana (Sandle, 2016).

Entre los métodos fenotípicos de las AST se encuentran el método de difusión en agar (Epsilon test y difusión en disco) y el método de dilución (macrodilución y microdilución), donde se utiliza como base CMI, la cual es la concentración más baja del antibiótico a la que los aislados bacterianos no crecen después del proceso de incubación (Zaragoza & Gimeno, 2008). Los puntos de corte de la CMI son susceptible, intermedio o resistente para clasificar al agente antimicrobiano (Zaragoza & Gimeno, 2008).

La categoría "susceptible" hace referencia a las bacterias que han sido inhibidas por las concentraciones generalmente alcanzables del agente antimicrobiano al utilizar una dosis dada para tratar infecciones bacterianas *in vivo*. La categoría "intermedia" indica que las bacterias, para las cuales las tasas de respuesta a los niveles de agente

antimicrobiano son menores en comparación con los aislados susceptibles. Mientras que la categoría "resistente" define a las bacterias que no son inhibidas por las concentraciones alcanzables del agente antimicrobiano (Barth, Weinsten, & Ferraro, 2009).

2.2.5 Método de difusión en agar

2.2.5.1 Difusión en disco

La prueba de difusión en disco o también conocida como Kirby-Bauer es uno de los métodos más simples, práctico y estandarizado que se utiliza en el área de microbiología con mayor frecuencia para probar patógenos de rápido crecimiento. Este método consiste en la preparación de una suspensión bacteriana de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL para un estándar de McFarland particular y se procede a distribuir uniformemente en un agar Mueller-Hinton. En la superficie de un medio de agar se puede colocar hasta 12 discos de antibióticos, los cuales son de papel filtro y, cuentan con un diámetro de 6 mm y una concentración fija del antibiótico requerido. Después de la incubación de 16-24 horas a 35 °C dependiendo de la bacteria sospechosa se mide la zona de inhibición del crecimiento alrededor de cada disco de antibiótico de acuerdo al milímetro más cercano (Sandle, 2016).

El diámetro de la zona se relaciona con la sensibilidad del agente bacteriano y con la velocidad de difusión del antibiótico en el medio. El diámetro de la zona de inhibición y el intervalo de tiempo de incubación específico para cada tipo de bacteria se interpretan de acuerdo con los actuales criterios publicados por organizaciones como la FDA o el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, *por sus siglas en inglés* Clinical & Laboratory Standards Institute). Los resultados obtenidos en esta prueba son "cualitativos", es decir, se mencionan en las categorías de susceptible, intermedio o resistente (Sandle, 2016).

El método de difusión en disco posee algunas ventajas respecto a los otros métodos estandarizados. Una de ellas es la facilidad de la prueba, es decir, que puede ser realizada en laboratorios de cualquier complejidad y no requiere equipo especial, los datos obtenidos son interpretados con facilidad por el personal de salud (Sandle, 2016). Sin embargo, una de las desventajas de esta prueba es la falta de mecanización o automatización lo que provoca que los resultados obtenidos sean imprecisos (Sandle, 2016).

2.2.5.2 Epsilon test (E-test)

La prueba Epsilon test o también conocida como prueba epsilométrica o E-test, es un método cuantitativo de gradiente comúnmente utilizado en laboratorios del área de microbiología para determinar CMI de los antimicrobianos en una cepa bacteriana. El proceso del E-test es similar al método de difusión en disco, ya que se utiliza una tira plástica con un largo de 6 cm y un ancho de 5 mm (Sandle, 2016). En la parte delantera de la tira se observa la escala de la concentración del antibiótico y en la parte posterior se encuentra impregnada con un gradiente continuo exponencial del antibiótico seco para producir la difusión del agente antimicrobiano en la superficie del medio de agar debidamente inoculado (Schumacher et al., 2018). Esto depende del crecimiento bacteriano y de la difusión del antibiótico después del proceso de incubación requerido permitiendo la manifestación de una elipse de inhibición, cuyo borde se cruza con la tira longitudinalmente en la posición donde el antimicrobiano en una concentración específica inhibe el crecimiento de patógenos (Sandle, 2016).

2.2.6 Método de dilución

2.2.6.1 Macrodilución en caldo

Se trata de uno de los métodos AST más antiguos donde se emplea una cantidad considerable de tubos de ensayo con un volumen mínimo de 1mL del medio de crecimiento líquido, en los cuales se coloca diluciones seriadas del antimicrobiano y se adiciona a cada solución una cantidad de bacterias suspendidas (Schumacher et al., 2018). Después de 20-24 horas de incubación se determina el valor de la CMI cuantitativamente mediante la turbidez dentro de los tubos (Schumacher et al., 2018). La ventaja en este método es el inóculo, ya que se puede multiplicar para analizar la tasa de muerte bacteriana para diferentes concentraciones, mientras que la desventaja es la preparación manual de cada solución antibiótica y la cantidad considerable de reactivos que se necesita para cada una de las diluciones (Schumacher et al., 2018).

2.2.6.2 Microdilución en caldo

La microdilución en caldo es uno de los métodos más usados en el laboratorio de microbiología para determinar las CMI cuantitativamente. Para la realización de este método se utilizan bandejas que contienen 96 pocillos con fondo en "U", cada uno con un volumen mínimo de 0,1 mL y concentraciones predeterminadas de antimicrobianos, lo que permite experimentar hasta 12 antibióticos en un rango de 8 diluciones dobles en una sola microplaca (Sandle, 2016). El medio recomendado en estas pruebas de susceptibilidad antimicrobiana es el caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes

(CAMHB), o el caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes con 2-5 % de sangre lisada de caballo es para microorganismos exigentes (Tenover, 2015).

Los paneles de microdilución se preparan utilizando instrumentos de dispensación que poseen volúmenes precisos de la dilución en caldo del antibiótico a usar (Schumacher et al., 2018). Después de la incubación por 24 horas, se produce un cambio de turbidez y color por el crecimiento bacteriano por lo que se utiliza un dispositivo de visualización manual o automático que permiten la inspección de cada uno de los pocillos del panel para determinar la CMI (Schumacher et al., 2018).

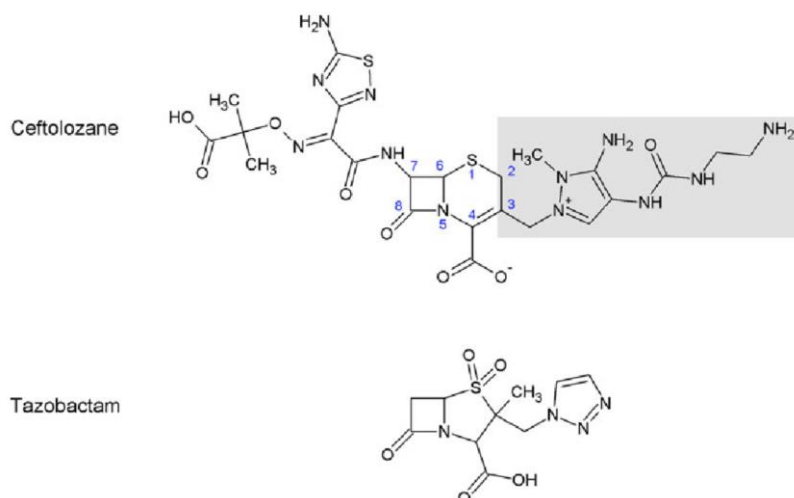
Las ventajas del procedimiento de microdilución incluyen la generación de la CMI, la disponibilidad de tener paneles preparados, así como la economía de reactivos, espacio y tiempo que se produce debido a la miniaturización de la prueba (Schumacher et al., 2018). La principal desventaja del método de microdilución es la inflexibilidad de las selecciones de medicamentos disponibles en los paneles comerciales estándar (Schumacher et al., 2018).

2.2.7 Ceftolozane/tazobactam

Antibiótico con actividad *in vitro* contra *P. aeruginosa*, incluidas cepas MDR y XDR, así como otras bacterias Gram negativas, *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE (Olarte et al., 2018). Ceftolozane/tazobactam es una nueva combinación de una cefalosporina anti-*Pseudomonas* y un inhibidor de betalactamasa (Haidar & Philips, 2017).

Figura 4

Estructuras químicas de ceftolozane y tazobactam.



Nota. Tomado de Zhanel et al., 2014.

La farmacodinámica describe a ceftolozane como un antibiótico semisintético de amplio espectro, su estructura es similar a cefalosporinas de tercera o cuarta generación, pero presenta un sustituyente pirazol en la posición 3 que puede inhibir la hidrólisis mediada por betalactamasas *AmpC* y mejora su efecto sobre *P. aeruginosa*, lo que permite que actúe en 7 sitios de unión de las proteínas de unión a la penicilina (PBP) como se puede observar en la Figura 4. Estas proteínas se encuentran ubicadas en la membrana de la pared celular bacteriana provocando la inhibición de la biosíntesis de esta y producen la lisis celular bacteriana (Cada et al., 2015).

El inhibidor betalactámico tazobactam se encuentra estructuralmente asociado con las penicilinas que inhibe de manera irreversible algunas betalactamasas de clase molecular A, como las BLEE: CTX-M, SHV y TEM, y algunas betalactamasas clase C en base a la clasificación de Ambler. La unión de tazobactam a las betalactamasas bacterianas mediadas por cromosomas y plásmidos brinda la protección a ceftolozane de la destrucción (Cada et al., 2015).

Ceftolozane/tazobactam fue aprobado por la FDA para tratar infecciones complicadas intraabdominales e infecciones del tracto urinario (Zhanel et al., 2014). Ceftolozane es una oximiino-cefalosporina que se asemeja estructuralmente a la ceftazidima, pero tiene alta actividad contra *P. aeruginosa* y baja sensibilidad a la hidrólisis de *AmpC* (Olarde et al., 2018).

En la actualidad, ceftolozane es una de las cefalosporinas con mayor actividad frente a *P. aeruginosa*, ya que es estable en presencia de *AmpC*, y no se está sujeta a la pérdida de porinas de membrana externa (*OprD*) ni a la presencia de bombas de expulsión activa (Sorbera et al., 2014). Esta combinación de cefalosporina intravenosa e inhibidor betalactamasa en una proporción fija de 2:1 ejerce efectos sinérgicos sobre cepas bacterianas susceptibles con actividad bactericida (Sorbera et al., 2014).

Por tanto, el rango de acción de ceftolozane/tazobactam puede extenderse más allá de las infecciones intraabdominales porque han aislado 2968 patógenos durante el año 2012, en 59 centros médicos de los Estados Unidos (Olarde et al., 2018). *P. aeruginosa* fue de los microorganismos más frecuente (34.30 %, 1019 cepas) así como ceftolozane/tazobactam (CMI_{50/90}, 0.5/4 mg/L; 94.1 % inhibidas a ≤8 mg/L). *Pseudomonas aeruginosa* presentó susceptibilidad a meropenem (CMI_{50/90}, 0.5/>8 mg/L; 73.7 % susceptible), ceftazidima (CMI_{50/90}, 2/>32 mg/mL; 73.6 % susceptible), cefepime (CMI_{50/90}, 4/>16 mg/L; 76.5 % susceptible) y a piperacilina/tazobactam

(CMI_{50/90}, 8/>64 mg/L; 69.5 % susceptible) (Olarte et al., 2018). Adicionalmente, ceftolozane/tazobactam ha demostrado actividad en varios estudios contra muchos microorganismos MDR que no son susceptibles a meropenem, ceftazidima, ni piperacilina/tazobactam (Olarte et al., 2018).

2.3 MARCO CONCEPTUAL

- *Cefalosporinas*: agentes antibacterianos que pertenecen al grupo de los betalactámicos y son utilizados para tratar enfermedades infecciosas debido a que poseen un amplio espectro de acción, mejores propiedades farmacocinéticas y toxicidad baja. La fusión química define a este tipo de antibiótico por un anillo de dihidrotiazina con un anillo betalactámico, constituyendo el núcleo-*cefem*- del que derivan todas las cefalosporinas.
- *Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)*: concentración mínima de un antimicrobiano que previene el crecimiento visible de un microorganismo después de 18-24 horas de incubación a 37°C. Además, CMI se considera como “gold standard”, ya que se encarga de la confirmación de resistencias inusuales, y da respuestas concisas cuando los resultados obtenidos por otros métodos son inciertos (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).
- *Microdilución en caldo*: método estandarizado de dilución en caldo que permite la cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos. Este método consiste en paneles en los que se encuentran pocillos pequeños, los cuales contienen las distintas concentraciones del antimicrobiano a utilizar y los resultados se interpretan de acuerdo a los puntos de corte establecidos por el CLSI (Hervé, 2015).
- *IAAS*: infecciones asociadas a la atención de la salud que han adquirido bajo a cualquier circunstancia en distintas áreas como: hospitales, centros para hospitalizaciones prolongadas, instalaciones ambulatorias o instalaciones de atención en el hogar o centros comunitarios (International Federation of Infection Control, 2011). Por su alta frecuencia de morbilidad y mortalidad que ocasionan, se consideran un problema de salud pública.
- *Resistencia antimicrobiana*: fenómeno por el cual un microorganismo (bacterias, hongos, virus y parásitos) se somete a ciertos cambios en los que deja de ser

afectado por un antimicrobiano (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos) al que anteriormente era sensible (Organización Mundial de la Salud, 2018). En consecuencia, la resistencia tiende a surgir por la mutación del microorganismo o por la adquisición del gen de resistencia. (Organización Mundial de la Salud, 2018).

- *Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (AST):* pruebas antibacterianas *in vitro*, que a través de la sensibilidad o resistencia a diferentes compuestos antimicrobianos de bacterias patógenas aeróbicas y anaerobias facultativas brindan una guía para el tratamiento y manejo de enfermedades infecciosas (Hervé, 2015).

CAPÍTULO III

3.1 MARCO METODOLÓGICO

3.1.1 MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se realizó una recolección y análisis de los datos, por lo que se utilizó elementos específicos en los que se detallan el enfoque del estudio como tipo de estudio, muestra y, criterios de inclusión y exclusión.

3.1.1.1 Tipo de estudio

Se trató de un estudio de tipo *in vitro*, observacional, descriptivo y retrospectivo. A través de la técnica de microdilución en caldo se estudió el comportamiento de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* conservados en el CRN-RAM provenientes del año 2019 frente a ceftolozane/tazobactam. No existió ninguna clase de intervención previo a la obtención de resultados.

3.1.1.2 Muestra

El muestreo de tipo no probabilístico por conveniencia se basó en una selección directa de la población conformada por una muestra de 86 cepas identificadas fenotípicamente como *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de aislados conservados y almacenados CNR-RAM en el año 2019. Las cepas de *P. aeruginosa* fueron seleccionadas mediante el ingreso de los criterios de inclusión y exclusión en la base de datos del sistema WHONET de CNR-RAM, cabe mencionar que se trabajó directamente con aislados y no con muestras clínicas.

3.1.1.3 Criterios de inclusión

Para la aceptación de las cepas se tomó en cuenta el cumplimiento de los siguientes criterios:

- Cepas que cuenten con los siguientes datos epidemiológicos en el registro o base de datos del laboratorio del INSPI: edad, género, tipo de muestra, área hospitalaria de donde fue enviada la muestra e identificación del microorganismo.
- Cepas identificadas fenotípicamente como *Pseudomonas aeruginosa*.
- Cepas receptadas durante el año 2019.
- Cepas con resultados de resistencia a carbapenémicos sin la presencia de carbapenemasa.

3.1.1.4 Criterios de exclusión

- Cepas contaminadas o deterioradas.
- Cepas no viables para el estudio.

- Cepas con datos incompletos o incorrectamente ingresados al sistema.

3.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Objetivo	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Categoría	Tipo de variable	Escala de medición	Indicador	Técnica	Instrumento
Implementar la técnica de microdilución en caldo para ceftolozane/tazobactam en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> procedentes de aislados conservados en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública durante el año 2019.	Microdilución en caldo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Técnica estandarizada para ensayar <i>in vitro</i> la sensibilidad de bacterias que crecen aeróbicamente. Involucra pequeños volúmenes de caldo y así observar el crecimiento de los microorganismos para definir la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).	Técnica basada en la cuantificación <i>in vitro</i> del crecimiento bacteriano expuesto a diluciones crecientes del antibiótico para conocer sobre su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).	Tipo de antibiótico	Sensible Intermedio Resistente	Cualitativa	Ordinal	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Pruebas de laboratorio	Microdilución en caldo según Guía M07-ED 11 del CLSI 2018.
Establecer el perfil de sensibilidad de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> obtenidos a partir de aislados conservados en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública durante el año 2019 frente a ceftolozane/tazobactam por el método de microdilución en caldo.	Sensibilidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a ceftolozane/tazobactam	Medicamentos que destruyen a los microorganismos o impiden su multiplicación o desarrollo.	Concentración mínima inhibitoria a la cual se inhibe el crecimiento de los microorganismos.	Antibiótico: Ceftolozane Inhibidor: Tazobactam Pruebas de susceptibilidad	Sensible Intermedio Resistente	Cualitativa	Ordinal	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Pruebas de laboratorio	Microdilución en caldo según Guía M07-ED 11 del CLSI 2018.

Objetivo	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Categoría	Tipo de variable	Escala de medición	Indicador	Técnica	Instrumento
Determinar la sensibilidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con el tipo de muestra y área hospitalaria de acuerdo con la información de los aislados proporcionada por el INSPI.	Tipo de muestra	Parte o porción extraída de un conjunto por métodos que permiten considerarla representativa.	Tipo de muestra que consta en el registro de datos que maneja el INSPI en la recepción de los aislados.	Muestra biológica	Catéter Gastrointestinal Líquidos Orina Respiratorio Sangre Secreciones Abscesos Heridas	Cualitativa	Nominal	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Observación	Registro de datos
	Servicio hospitalario	Servicio de un hospital orientado a proporcionar cuidados básicos y especializados al ingreso de una persona enferma o herida.	El servicio hospitalario que consta en el registro de datos que maneja el INSPI en la recepción de los aislados.	Servicio hospitalario	Cirugía Consulta externa Emergencias Hospitalización Geriatría Pediatria Unidad de Cuidados Intensivos (UCI)	Cualitativa	Nominal	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Observación	Registro de datos

3.3 FASES DEL ESTUDIO

La investigación se realizó en seis fases, las mismas que se detallan a continuación:

3.3.1 Fase I: Solicitudes, permisos y autorizaciones

Previo a dar inicio al estudio se tramitaron los permisos y aprobaciones respectivas para el uso de las cepas conservadas en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI-Quito y la aprobación del estudio por el Comité de Ética de la Universidad San Francisco de Quito.

3.3.1.1 Solicitud al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI)

Para comenzar con la investigación se requirió llenar una ficha metodológica proporcionada por el INSPI-Quito, en la que se especificaba los datos requeridos del estudio para la aprobación del desarrollo de este en el Centro de Referencia Nacional de Resistencia Antimicrobiana (CNR-RAM). Después que se obtuvo la aprobación de la ficha, se procedió a enviar los documentos pertinentes para un acuerdo de entendimiento entre los investigadores y el INSPI-Quito para la utilización de las cepas aisladas y almacenadas de *Pseudomonas aeruginosa*.

3.3.1.2 Solicitud al Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito

Al Comité de Ética de la Universidad San Francisco de Quito se envió los documentos y formularios respectivos, para así asegurar el cumplimiento de las normas bioéticas de la investigación. Concluido él envió de los documentos respectivos, se obtuvo las respectivas autorizaciones.

Anexo 1. Carta de Autorización al INSPI

Anexo 2. Carta de aprobación del estudio del Comité de ética de la Universidad San Francisco de Quito.

Anexo 8. Autorización del INSPI.

3.3.2 Fase II: Recolección de información

Las cepas fueron seleccionadas mediante la base de datos del sistema WHONET que maneja el CNR-RAM del INSPI-Quito de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión mencionados anteriormente. A partir de ello, se elaboró una base de datos en Microsoft Excel utilizada únicamente para registrar, seleccionar y analizar las variables

epidemiológicas como son: microorganismo, código del INSPI, edad, sexo, tipo de muestra y área de servicio hospitalario proveniente.

Los datos del perfil de susceptibilidad por el método de difusión en disco de las cepas de *P. aeruginosa* se obtuvieron a través de la base de datos del sistema Whonet, los mismos que fueron ingresados en la plantilla de recolección de datos de Excel.

Al tener la base de datos, se procedió a buscar los viales de las cepas a utilizar en el cepario de CRN-RAM. Estas cepas seleccionadas de *P. aeruginosa* se sembraron en Agar selectivo MacConkey Lactosa Oxoid® y en Agar Nutritivo Oxoid®, tomando en cuenta las condiciones de crecimiento a 37°C por 24 horas en aerobiosis y posteriormente se realizó el método de microdilución en caldo.

3.3.3 Fase III: Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

3.3.3.1 Método de microdilución en caldo de ceftolozane

Para establecer el valor de la CMI de ceftolozane/tazobactam en las cepas aisladas de *Pseudomonas aeruginosa*, se aplicó el método de microdilución en caldo basándose en la Guía MO7-11^{ED} del CLSI 2018 “Métodos para la dilución Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para bacterias que crecen aeróbicamente” (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018).

Como primer paso se preparó la solución madre del antibiótico liofilizado ceftolozane a una concentración de 1962.5 µg/mL (Anexo 3) y la solución madre del antibiótico liofilizado tazobactam a una concentración de 318.64 µg/mL (Anexo 5). Para reconstituir ambos antibióticos se utilizó como solvente y diluyente agua molecular.

A partir de la solución madre del antibiótico liofilizado ceftolozane se realizó la solución de trabajo con una concentración de dilución de 256 µg/mL. De esta solución de trabajo se preparó once diluciones para el ensayo cuyas concentraciones corresponden a 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL y 0.5 µg/mL (Anexo 4).

Luego se realizó una suspensión bacteriana a una escala 0.5 McFarland de las colonias aisladas de *P. aeruginosa* en solución salina al 0.9 %, sin dejar transcurrir más de 15 minutos para su uso, y después se preparó una dilución 1:100. Cuando ambas preparaciones se encontraron listas tanto del antibiótico ceftolozane (dilución A) como de la solución bacteriana *P. aeruginosa* (dilución B) se procedió a dispensar un volumen

de 50 µL de la dilución A en cada pocillo establecido de las microplacas identificadas según el esquema del estudio (Tabla 1). Del mismo modo, se llevó a cabo el anterior paso con la dilución B, para obtener un volumen final de 100 µL en cada pocillo y se incubó en condiciones aeróbicas a 35°C ± 2°C durante 16-20 horas. Este procedimiento se realizó por duplicado.

Para la lectura e interpretación de las microplacas se utilizó un espejo invertido, que permitió observar la presencia de turbidez de cada pocillo, y se empleó la guía M100 del CLSI 2020 para la interpretación de los puntos de corte correspondientes al antibiótico en cada cepa aislada de *P. aeruginosa*; estos resultados fueron registrados en una plantilla elaborada por las investigadoras, en la que se encuentra la fecha de realización y numeración de la muestra con su dilución correspondiente (Tabla 1).

3.3.3.2 Método de microdilución en caldo para ceftolozane/tazobactam

Al concluir y obtener los resultados de la microdilución en caldo de ceftolozane en todas las cepas del estudio, se dio inicio a la segunda microdilución correspondiente a ceftolozane/tazobactam.

En la preparación de las diluciones de ceftolozane/tazobactam se utilizaron ocho tubos en los cuales se dispuso las diluciones de ceftolozane 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL y 0.5 µg/mL, junto con la dilución de tazobactam 16 µg/mL. Las cantidades que se dispensaron de cada dilución dependieron de la cantidad calculada en el protocolo (Tabla 2), es decir, que las concentraciones de las diluciones de ceftolozane/tazobactam que existieron en cada pocillo eran de 32/4 µg/mL, 16/4 µg/mL, 8/4 µg/mL, 4/4 µg/mL, 2/4 µg/mL, 1/4 µg/mL, 0.5/4 µg/mL y 0.25/4 µg/mL.

Se continuó el procedimiento de la preparación de la suspensión bacteriana y de la distribución de las diluciones mencionada anteriormente con la diferencia de que se realizó con ceftolozane/tazobactam. Los resultados fueron registrados en una plantilla elaborada por las investigadoras (Tabla 3).

3.3.4 Fase IV: Control de calidad de los procedimientos de laboratorio

3.3.4.1 Medios de cultivo

Esterilidad de los medios de cultivo:

- *Agar MacConkey*: el medio de cultivo se realizó bajo los criterios establecidos por la Guía M100 del CLSI 2020. Una vez preparado el agar MacConkey, se inoculó

una muestra representativa de la cepa a ser estudiada, tomando en cuenta las condiciones de crecimiento de incubación a 37°C en aerobiosis durante 24 horas. Posterior a ello se observó el crecimiento bacteriano puro, pigmentación y tamaño de las colonias como comprobación del control de calidad.

- *Agar Nutritivo*: el control de calidad del agar se llevó a cabo según los criterios establecidos por la Guía M100 del CLSI 2020; este agar se utilizó para sembrar las cepas de *P. aeruginosa*. Una vez que existió un crecimiento bacteriano puro, estas cepas se emplearon para la preparación de la solución bacteriana en el método de microdilución en caldo.
- *Caldo Mueller Hinton ajustado con cationes (CAMHB)*: el control de calidad de CAMHB se realizó cumpliendo los criterios establecidos por la Guía M07 ED 11 del CLSI 2018. El CAMHB se utilizó para el método de microdilución en caldo de ceftolozane y ceftolozane/tazobactam.

3.3.4.2 Control de calidad del método de microdilución en caldo

Según lo establecido por el CLSI, se utilizaron las cepas ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* con un rango de 0.25/4 µg/mL a 1/4 µg/mL y ATCC 2146 *Klebsiella pneumoniae* con un rango de $\geq 32/4$ µg/mL para que el método de microdilución en caldo pueda ser validado.

- *Control de calidad del inóculo bacteriano*: el control de calidad del inóculo bacteriano se efectuó como parte de la microdilución para obtener resultados fiables. De tal forma que se procedió a realizar una solución 0.5 McFarland de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, y de esta solución se realizó una dilución 1:1000, de la cual se inoculó 100 µL en Agar Base Sangre y se incubó a 37°C durante 16-24 horas. El conteo de colonias debió ser ≤ 50 colonias para comprobar que el inóculo fue el adecuado.
- *Cepas ATCC utilizadas para el control de calidad*: en el control de calidad del método de microdilución en caldo tanto de ceftolozane como de ceftolozane/tazobactam se utilizaron las cepas ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* como control negativo y ATCC 2146 *Klebsiella pneumoniae* control positivo, las cuales fueron corridas en cada placa conjuntamente con las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

3.3.5 Fase V: Desecho de material biológico

Para la eliminación de los desechos biopeligrosos se procedió a autoclavar el material de acuerdo a los procesos pre-establecidos por el Departamento de Desechos del INSPI según el Reglamento para el Manejo de Desechos en Establecimientos de Salud, dado por el Ministerio de Salud Pública (Anexo 7).

3.3.6 Fase VI: Análisis estadísticos de datos

Los datos obtenidos de los ensayos microbiológicos y los recolectados desde los registros del INSPI se ingresaron en una matriz trabajada en una hoja electrónica Microsoft Excel (Tabla 4). En este mismo programa se obtuvo los datos de las frecuencias absolutas y relativas, y también se trabajó las tablas para cruce de variables y las gráficas para su posterior análisis.

De igual manera, con los resultados obtenidos se utilizó estadística descriptiva para un análisis del perfil de susceptibilidad de los datos de antibióticos del método difusión en disco, los parámetros de reproducibilidad de las cepas ATCC y, el cálculo del categorical agreement y essential agreement entre el método de microdilución en caldo y sistema automatizado *Vitek 2 Compact*.

3.4 ASPECTOS ÉTICOS

La investigación fue presentada al Comité de Ética de la Universidad San Francisco de Quito, el mismo que fue aprobado por esta institución.

Se trabajó únicamente con el código de cepa y en ningún momento se conoció identificadores (nombres y apellidos de pacientes) pues se trabajó con microorganismos. Toda la información generada del estudio se almacenó en formato electrónico en la computadora de una de las estudiantes, con clave de acceso; archivo al tienen acceso las investigadoras (estudiantes) y el director. Esta información será almacenada y resguardada por un periodo de siete años, luego de los cuales se eliminará del disco de la computadora o dispositivo externo, asegurándose que no quede en la papelera de reciclaje y en archivos ocultos.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

4.1. Descripción general de la población en el estudio

En el presente estudio se utilizaron 86 cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de CRN-RAM del INSPI-Quito del año 2019, las mismas que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión mencionados anteriormente. Todas las cepas incluidas en esta investigación fueron aisladas en distintas instituciones de salud para su respectiva caracterización mediante pruebas macroscópicas, microscópicas y microbiológicas. Los aislados clínicos de *P. aeruginosa* fueron conservados a una temperatura de -80°C.

De acuerdo con las variables clínico - epidemiológicas obtenidas de la base de datos WHONET, se observó que, la procedencia de los aislados correspondía en 61.63 % (n=53/86) al género masculino y 38.37 % (n=33/86) al género femenino con un rango de edad de 0 a 83 años, siendo el grupo de 51-75 años el más predominante (Tabla 5). A pesar de los datos obtenidos, se puede mencionar que *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista puede afectar a cualquier individuo todo depende del estado de salud de este.

Respecto al servicio hospitalario, la mayoría de aislados procedían de consulta externa con un 50 % (n=43/86), seguido de los servicios hospitalarios de UCI, cirugía y hospitalización con un 16.28 % (n=14/86), 13.95 % (n=12/86) y 12.79 % (n=11/86) respectivamente (Tabla 5). Estos datos fueron relevantes debido a que, el porcentaje de UCI fue menor, pese a que este servicio hospitalario es el más vulnerable por las altas tasas de colonización de *P. aeruginosa* en individuos inmunodeprimidos especialmente en aquellos pacientes que atraviesan largos periodos de hospitalización.

Los tipos de muestras clínicas de las que provienen las cepas de *P. aeruginosa* utilizadas en el estudio, fueron en su mayoría secreciones, abscesos y heridas, representadas por el 38.37 % (n=33/86), seguido de muestras respiratorias con un 25.58 % (n=22/86), y hemocultivos con un 11.63 % (n=10/86) (Tabla 5). Adicionalmente, se obtuvieron aislados de *P. aeruginosa* en menor frecuencia a partir de catéter, orina y líquidos, dato que genera interés sobre este patógeno debido a su excepcional capacidad de adaptación.

Tabla 5

Tabla de contingencia de variables clínico-epidemiológicas.

	Variable	n	%
Género	Femenino	33	38.37 %
	Masculino	53	61.63 %
	Total	86	100 %
Rangos de edad	0-25 años	14	16.28 %
	26-50 años	26	30.23 %
	51-75 años	40	46.51 %
	> 76 años	6	6.98 %
	Total	86	100 %
Servicio hospitalario	Consulta Externa	43	50.00 %
	Unidad de cuidados intensivos (UCI)	14	16.28 %
	Cirugía	12	13.95 %
	Hospitalización	11	12.79 %
	Emergencia	3	3.49 %
	Pediatría	2	2.33 %
	Geriatría	1	1.16 %
	Total	86	100 %
Tipo de Muestra	Secreciones, abscesos y heridas	33	38.37 %
	Respiratorio	22	25.58 %
	Sangre	10	11.63 %
	Orina	6	6.98 %
	Gastrointestinal	5	5.81 %
	Otros (Pie diabético y prótesis)	5	5.81 %
	Catéter	4	4.65 %
	Líquidos	1	1.16 %
		Total	86

4.2 Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana

Los perfiles de resistencia antibiótica completos se obtuvieron de la base de datos WHONET, estos datos fueron obtenidos por parte de los analistas del CRN-RAM a través de la metodología de difusión en disco. Se observa una resistencia marcada del 100 % a los dos antibióticos carbapenémicos, imipenem y meropenem, lo que nos podría indicar una posible presencia de mecanismos de resistencia como: cambios en

proteínas de la membrana externa, bombas de eflujo inespecíficas, modificaciones del sitio blanco y producción de enzimas tipo betalactamasa. La cefalosporina de tercera generación, ceftazidima, y de cuarta generación, cefepime, muestran resistencia de 18.60 % y 33.72 % respectivamente. Por su parte, aztreonam, un monobactam que usualmente no se ve afectado por la presencia de metalobetalactamasas, pero si frente a la expresión de enzimas tipo BLEE, muestra una resistencia de 40.70 %. Los antibióticos que forman parte de los aminoglucósidos como amikacina y gentamicina muestran una resistencia del 25.59 % y 45.35 % respectivamente y, por último, piperacilina/tazobactam revela una resistencia del 26.74 % y ciprofloxacina una resistencia del 50 % (Tabla 6).

Tabla 6

Perfiles de susceptibilidad de las 86 cepas de *P. aeruginosa*.

Antibiótico	Puntos de Corte (mm) CLSI 2020			S(%)	I(%)	R(%)
	S	I	R			
CAZ	≥18	15-17	≤14	72.10 %	9.30 %	18.60 %
FEP	≥18	15-17	≤14	54.65 %	11.63 %	33.72 %
ATM	≥22	16-21	≤15	19.77 %	39.53 %	40.70 %
MEM	≥19	16-18	≤15	0 %	0 %	100 %
IMP	≥19	16-18	≤14	0 %	0 %	100 %
TZP	≥21	15-20	≤14	54.66 %	18.60 %	26.74 %
CN	≥15	13-14	≤12	53.49 %	1.16 %	45.35 %
AK	≥17	15-16	≤14	73.27 %	1.16 %	25.59 %
CIP	≥25	19-24	≤18	41.86 %	8.14 %	50.00 %

Nota. Ceftazidima (CAZ), Cefepime (FEP), Aztreonam (ATM), Meropenem (MEM), Imipenem (IMP), Piperacilina/Tazobactam (TPZ), Gentamicina (CN), Amikacina (AK), Ciprofloxacina (CIP); Puntos de corte correspondientes a *P. aeruginosa* tomados de CLSI 2020.

4.3 Implementación de microdilución en caldo ceftolozane/tazobactam

Para evaluar la precisión del método bajo condiciones de reproducibilidad, fue necesario realizar los cálculos con los datos obtenidos de las 10 mediciones de las cepas ATCC *Klebsiella pneumoniae* 2146 y ATCC *Pseudomonas aeruginosa* 27853 utilizadas en esta investigación. Para ello se utilizó los datos de las mediciones de las cepas ATCC obtenidas por las dos investigadoras que fueron realizadas en diferentes días, diferentes operadores y bajo las mismas condiciones de ensayo.

El coeficiente de variación calculado para las determinaciones realizadas por las dos operadoras para ATCC 2146 y ATCC 27853 es de 0 % y 0.07 % respectivamente, por tanto, como estos valores se encuentran dentro del rango menor a 1 % se puede decir que los datos son aceptables. De igual manera, se obtuvo un porcentaje del 0 % de error

relativo y absoluto para la cepa ATCC 2146 y, 4 % de error relativo y 0.01 % de error absoluto para la ATCC 27853 (Tabla 7).

Tabla 7

Resultados de reproducibilidad en cepas ATCC para ceftolozane/tazobactam.

Medición	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 2146		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
	Rango CLSI: 32 µg/mL		Rango CLSI: 0.25/4 – 1/4 µg/mL	
	Operador 1	Operador 2	Operador 1	Operador 2
1	32 µg/mL	32 µg/mL	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL
2	32 µg/mL	32 µg/mL	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL
3	32 µg/mL	32 µg/mL	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL
4	32 µg/mL	32 µg/mL	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL
5	32 µg/mL	32 µg/mL	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL
6	32 µg/mL	32 µg/mL	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL
7	32 µg/mL	32 µg/mL	0.50 µg/mL	0.25 µg/mL
8	32 µg/mL	32 µg/mL	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL
9	32 µg/mL	32 µg/mL	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL
10	32 µg/mL	32 µg/mL	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL
Concordancia de mediciones	10/10		9/10	
SD	0		0.02	
CV %	0		0.07	
ER %	0		4	
EA %	0		0.01	

Nota. Desviación standard (SD), Coeficiente de variación (CV), Error relativo (ER), Error absoluto (EA).

4.4 Determinación de CMI para ceftolozane/tazobactam en aislados de *P. aeruginosa*

La CMI de ceftolozane/tazobactam se obtuvo a través del método de microdilución en caldo, el cual fue realizado por duplicado para las 86 cepas de *P. aeruginosa* del periodo 2019. Los resultados obtenidos de CMI se interpretaron según los puntos de corte de ceftolozane/tazobactam establecidos en la guía M100 del CLSI 2020 como sensible $\leq 4/4$ µg/mL, intermedio $8/4$ µg/mL y resistente $\geq 16/4$ µg/mL.

En la Tabla 8 se detalla los valores obtenidos de la CMI de ceftolozane y ceftolozane/tazobactam. Para ceftolozane se determinó un porcentaje de susceptibilidad del 69.76 %, y al unir este antimicrobiano con el inhibidor tazobactam se

observó que 61 aislados de *P. aeruginosa* presentaron valores de CMI con patrón sensible entre <0.25 µg/mL a 4 µg/mL. Mientras que, 5 aislados mostraron un patrón de sensibilidad intermedia con un valor de 8 µg/mL y 20 aislados se determinaron como resistentes con valores de MIC >16 µg/mL.

En relación con las 20 cepas que presentaron resistencia a ceftolozane/tazobactam, 8 de estos aislados fueron positivos para el gen tipo GES (9.30 %), este dato fue confirmado por los analistas del área de Biología Molecular del CRN-RAM a través de amplificación del gen *bla_{GES}* por PCR de punto final. Se atribuye que la resistencia a ceftolozane/tazobactam puede ocurrir a través de la adquisición de una BLEE específica, en este caso por la presencia del gen GES en *P. aeruginosa*.

Tabla 8

Resultados de la CMI de ceftolozane y ceftolozane/tazobactam de las cepas de *P. aeruginosa*, realizado por las investigadoras.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>											
Antibiótico	Número de aislamientos con relación a la CMI (µg/mL)										
Ceftolozane	Sensible							Intermedio	Resistente		Total
	<0.25	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	> 32	
nº	14	1	11	10	5	8	11	2	6	18	86
%	69.76 %							2.33 %	16.28 %		100%
CEF/TAZ	Sensible							Intermedio	Resistente		Total
	<0.25/4	0.25/4	0.5/4	1/4	2/4	4/4	8/4	16/4	32/4	>32/4	
nº	3	0	19	6	22	11	5	1	4	15	86
%	70.93 %							5.81 %	23.26 %		100%

De igual manera se realizó una comparación de la variable de servicio hospitalario frente a los aislados sensibles y resistentes a ceftolozane/tazobactam. Como se evidencia en la Tabla 9, del número total de aislados que presentan resistencia, el mayor número se encuentra en el servicio de consulta externa con 10 aislados, seguido del servicio de cirugía con 5 aislados y UCI con 3 aislados, siendo estos últimos servicios considerados como de alto riesgo.

Tabla 9

Relación del servicio hospitalario frente aislados sensibles y resistentes de *P. aeruginosa* a ceftolozane/tazobactam.

Servicio hospitalario	Nº	Ceftolozane/tazobactam		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Consulta Externa	43	31	2	10
Unidad de cuidados intensivos (UCI)	14	10	1	3
Cirugía	12	7	0	5
Hospitalización	11	9	0	2
Emergencia	3	2	1	0
Pediatría	2	2	0	0
Geriatría	1	1	0	0

Adicionalmente en esta investigación, se seleccionaron al azar 10 cepas para realizar una comparación entre los métodos de microdilución en caldo y Vitek 2 Compact, con la finalidad de confirmar los perfiles de susceptibilidad a esta combinación antimicrobiana. Los resultados de las 10 cepas de *P. aeruginosa* que se analizaron por Vitek 2 Compact demuestran que, al igual que los resultados obtenidos por microdilución, 3 aislados fueron sensibles y 6 resistentes a ceftolozane/tazobactam (Tabla 10). También se obtiene un categorical agreement y essential agreement del 100 %, lo que demuestran una buena correlación entre la metodología de microdilución en caldo considerada por “gold standard” y la metodología automatizada de Vitek 2 Compact.

Tabla 10

Comparación de los métodos de microdilución en caldo y sistema automatizado Vitek 2 Compact de 10 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a ceftolozane/tazobactam.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>													
CEF/TAZ	Número de aislamientos con relación a la CMI ($\mu\text{g/mL}$)										Categorical agreement (CA)	Essential agreement (EA)	
	S		I				R						
	<0.25 /4	0.25/4	0.5/4	1/4	2/4	4/4	8/4	16/4	32/4	>32/4	No. Total		
Microdilución en caldo	0	0	0	0	1	2	1	0	0	6	10	100 %	100 %
Vitek 2 Compact	0	0	0	1	2	1	0	0	0	6	10		

Nota. Sensible(S), Intermedio (I) y Resistente (R).

5. DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana principalmente en patógenos Gram negativos sigue en aumento, limitando en gran medida las opciones de tratamiento para infecciones causadas por ciertos patógenos MDR (Hirsch et al., 2020). Durante la última década, *Pseudomonas aeruginosa* ha sido un problema cada vez mayor en el sistema de salud debido a la proliferación de resistencias a múltiples fármacos acompañado de la creciente prevalencia de IAAS, lo que compromete gravemente la selección de antimicrobianos adecuados (Schmidt-Malan et al., 2018). Ceftolozane/tazobactam ha demostrado una buena actividad contra estos organismos incluidos enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*, siendo este último el que mayor actividad presenta (Hirsch et al., 2020).

En este contexto, los resultados que se obtuvieron en este estudio nos permiten comprender el comportamiento del antibiótico ceftolozane/tazobactam usando la metodología de microdilución en caldo, considerada como “gold standard” en 86 cepas de *P. aeruginosa* aisladas en el periodo 2019. Respecto al análisis de las variables epidemiológicas que fueron obtenidas de la base de datos WHONET del periodo 2019 se identificó que el género predominante de las cepas aisladas de *P. aeruginosa* fue el masculino con una frecuencia de 61.63 % y en el rango de edad se evidenció un mayor porcentaje en la categoría de 51-75 años con un 46.51 %. En el estudio de Calderón y Fontalvo (2019) se reportaron que, los aislamientos de *P. aeruginosa* se presentaron con mayor frecuencia en el género masculino (61.90 %) y, que la mediana de edad de los pacientes fue de 58 años en un rango de edad mínimo de 4 meses y edad máximo de 90 años, datos que se asemejan a lo obtenido en el presente estudio. Frente a estos resultados se puede mencionar que, la edad y el género no son determinantes a la hora de padecer una infección por *P. aeruginosa*, sin embargo, el estado inmunológico y otros factores de riesgo que puede presentar el paciente, representan una amenaza (Bravo-Burguillos Ros, 2018).

En cuanto al servicio hospitalario, los aislamientos de *P. aeruginosa* analizados, en su mayor parte fueron del área de consulta externa con un 50 %, a diferencia de lo publicado en otros estudios donde obtuvieron un 33.33 % de aislados procedentes del servicio de hospitalización general y 34.21 % de UCI (Muñoz et al., 2020 y Calderón Majé y Fontalvo Torres, 2019). Con relación al tipo de muestra de los aislados clínicos, gran parte procedieron de secreciones, abscesos y heridas (38.37 %), seguido con un 25.58 % de muestras respiratorias y 11.63 % de hemocultivos. Sin embargo, en el

estudio de Muñoz y colaboradores (2020) obtuvieron un 50 % de muestras del tracto respiratorio y un 19.23 % de secreciones de heridas, asimismo otros autores refieren el 27.63 % a muestras de orina y de secreciones con un 23.68 % (Calderón Majé & Fontalvo Torres, 2019). Esta discrepancia del servicio hospitalario y del tipo de muestra da a conocer que el comportamiento de este patógeno oportunista es versátil por su capacidad de adaptación, patogenicidad, transmisibilidad y resistencia a los antimicrobianos, lo que le brinda una ventaja competitiva para lograr colonizar diferentes sitios anatómicos ocasionando un amplio rango de infecciones (Cabot et al., 2016).

En relación con los perfiles de susceptibilidad de los 86 aislados de *P. aeruginosa* se identificó que, estos antibióticos demostraron un mayor porcentaje de resistencia como ciprofloxacina con un 50 %, seguido por gentamicina con un 45.35 % y aztreonam con un 40.70 %. Sin embargo, en el estudio de Calderón y Fontalvo (2019) se encontraron resultados diferentes a los obtenidos ya que ciprofloxacina, gentamicina y aztreonam presentaron porcentajes de 38 %, 27 % y 58 % respectivamente. Esta discrepancia que podría deberse a la localización geográfica, procedencia del aislamiento, uso de antimicrobianos, el método llevado a cabo para obtener el perfil de susceptibilidad antimicrobiana, así como también al control de calidad realizado. En el caso de Ecuador, los perfiles de susceptibilidad obtenidos por la red de vigilancia demostraron altos porcentajes de resistencia en aislados provenientes de distintos servicios hospitalarios, tomando en cuenta que el tratamiento empírico está basado principalmente en betalactámicos como ceftazidima, piperacilina/tazobactam o cefepime para las infecciones bacterianas que tienen como agente causal a *P. aeruginosa* (Ministerio de Salud Pública, 2019); por lo que se determina la existencia de una alta frecuencia de resistencias a más de una familia de antimicrobianos provocado por este patógeno.

Asimismo, se identificó una resistencia del 100 % a los carbapenémicos imipenem y meropenem. Estos datos son similares a los hallados en un estudio en Corea del Sur, donde obtienen un 100 % de resistencia a imipenem y un 76.20 % a meropenem; en ausencia de carbapenemasas estas resistencias pueden ser impulsadas por la porina *OprD* (imipenem) y la bomba de salida *OprM* (meropenem) provocando fenómenos como cierre de porinas que conlleva a impermeabilidad o eflujo de estos antimicrobianos respectivamente (Wi et al., 2017).

Se evaluó la precisión del método en base a las medidas de dispersión como CV, error relativo y error absoluto, bajo condiciones de reproducibilidad para microdilución en caldo de ceftolozane/tazobactam, y se determinó que es un método preciso ya que los

resultados del coeficiente de variación son inferiores a 1 % para las dos cepas ATCC. Sin embargo, en la cepa ATCC 27853 existe un error absoluto de 0.01 % y una ligera variación del 0.07 % en el coeficiente de variación debido a que una medición no concuerda entre las dos analistas, pero esta variación no es relevante ya que el CV % se encuentra dentro los límites establecidos. Por lo cual, no se encuentra una mayor diferencia entre los valores medidos obtenidos por cada analista y tampoco al comparar estos datos entre analistas. Esto nos indica que el método evaluado es reproducible, y que los resultados no serán distintos si el método es realizado por distintos operadores en diferentes días (Rodríguez, 2019).

El porcentaje de susceptibilidad y de resistencia de ceftolozane fue de 69.76 % y 16.28 % respectivamente, al comparar el método de microdilución en caldo de ceftolozane y ceftolozane/tazobactam se identificó que 17 cepas sensibles de *P. aeruginosa* con CMI de ceftolozane entre 1 µg/mL a 8 µg/mL redujeron de 2 a 3 diluciones a una CMI de ceftolozane/tazobactam entre ≤0.25 µg/mL a 4 µg/mL, seguido con 1 cepa intermedia de *P. aeruginosa* con CMI de ceftolozane 16µg/mL que disminuyó 3 diluciones a una CMI de ceftolozane/tazobactam 2 µg/mL, y por último 6 cepas resistentes de *P. aeruginosa* con CMI de ceftolozane entre 32µg/mL y ≥32 µg/mL disminuyeron de 2 a 5 diluciones a una CMI de ceftolozane/tazobactam entre 1 µg/mL a 8 µg/mL; estos datos demuestran que al adicionar el inhibidor betalactamasa tazobactam se amplía el espectro de acción del ceftolozane con CMI más bajas (µg/mL) y presenta una susceptibilidad elevada en los aislamientos de *P. aeruginosa* (Zhanel et al., 2014).

En la determinación de la CMI de ceftolozane/tazobactam, el porcentaje de susceptibilidad que se obtuvo fue de 70.93 % con una mayor concentración de CMI en 0.5 µg/mL, 2 µg/mL y 4 µg/mL. Estos datos de sensibilidad demostraron una buena actividad antimicrobiana *in vitro* contra *P. aeruginosa*, los cuales se correlacionan con el estudio de Mojica y colaboradores (2019) que determinó en países de América Latina una susceptibilidad del 80.55 %, 70 %, 68.30 %, 66.10 % y 64.40 % correspondientes a Chile, Argentina, Brasil, Colombia y México. Así mismo, el estudio Tuon et al. (2020) que fue realizado en múltiples centros médicos de Brasil demostró que esta nueva combinación antimicrobiana contra aislados de *P. aeruginosa* proporcionó una cobertura del 84.90 % en. Los datos de estos estudios, en conjunto con los obtenidos en esta investigación, indican que ceftolozane/tazobactam presenta una buena actividad frente a *P. aeruginosa*, en comparación a los demás antibióticos anti-*Pseudomonas*, siendo así una opción aprobada por la FDA desde 2014 para infecciones urinarias complicadas incluyendo pielonefritis, infecciones intraabdominales complicadas, y desde el 2019

ampliaron la aprobación para neumonía adquirida en el hospital (HABP) y neumonía asociada al ventilador (VABP) (WHONET, 2020).

Se evidencia un 23.26 % de resistencia a ceftolozane/tazobactam, que corresponde a 20 de las 86 cepas trabajadas. El mismo patrón ocurre en el estudio de Mojica y colaboradores (2019) donde las cepas de *P. aeruginosa* de países como Chile, Brasil y México presentaron altas tasas de resistencia a ceftolozane/tazobactam de 19.45 %, 31.70 % y 35.60 % respectivamente, siendo la misma situación en Argentina y Colombia con un 30 % y 33.90 %. De igual manera, en el estudio de Calderón y Fontalvo (2019) realizado en Colombia obtuvieron un porcentaje de resistencia del 25 % en aislamientos de *P. aeruginosa* donde existió una mayor frecuencia de CMI ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$.

Acerca de las 20 cepas que presentaron resistencia a ceftolozane/tazobactam en este estudio (23.26 %), 8 aislados fueron positivos para el gen tipo GES debido a que pertenecen a las carbapenemasas tipo A (Prado-Montoro et al., 2019). Entre las variantes GES descritas en el estudio de Poirel et al. (2019) identificaron a GES-1 como un carbapenémico ahorrador de betalactamasa de espectro extendido y, a las variantes GES-2 y GES-5 con una esencial actividad carbapenemasa. Sin embargo, en el estudio determinaron que la resistencia a ceftolozane/tazobactam pudo deberse sobre todo a la adquisición de una BLEE específica en *P. aeruginosa* como la variante GES-6, la cual fue responsable del incremento de la actividad hidrolítica hacia carbapenémicos y ceftolozane, con resistencia a ciertos inhibidores de betalactamasas como tazobactam (Poirel et al., 2019).

Respecto a las 12 cepas restantes con resistencia, según la bibliografía actual posiblemente, este fenotipo se vincula con la sobreexpresión de la cefalosporinasa *AmpC* que presentar mutaciones puntuales en el gen *bla_{PDC}* que fue identificado en el estudio de Tuon et al. (2020) mediante ensayos de secuenciación de genoma completo. De igual manera, dicha sobreexpresión de *AmpC* la asociaron con las sustituciones G27D, V205L, G391A, T105A, E114A, G283E y M288R (Tuon et al., 2020; Arca-Suárez, et al., 2020). Otro posible factor relacionado con la resistencia a ceftolozane/tazobactam es la modificación de la diana PBP, ya que según el estudio de Del Barrio-Tofiño et al. (2017) las mutaciones de resistencia menos esperadas, como la proteína fijadora de penicilina 3 (PBP3), presentan una fuerte presión mutacional lo que contribuye al desarrollo de resistencia a los betalactámicos (incluido ceftolozane/tazobactam). Frente a lo anterior mencionado se puede indicar que los aislados de *P. aeruginosa* que son resistentes a carbapenémicos demuestran una considerable tasa de resistencia

ocasionado por la sobreproducción y modificación estructural de *AmpC*, represión o inactivación de la porina *OprD* y modificación de la diana PBP.

También es importante mencionar que en las áreas de cirugía y UCI se presentaron un número de 5 y 3 aislados con resistencia a ceftolozane/tazobactam respectivamente. Sin embargo, este número de cepas no representan el total de los aislados trabajos por lo que ceftolozane/tazobactam parece ser un fármaco adecuado para el tratamiento de infecciones graves causadas por *P. aeruginosa* en pacientes de UCI (Lesney, 2021). Según el estudio de Bosaeed et al. (2020) indican que en el área de consulta externa existe una mayor frecuencia de aislamientos resistentes, lo cual es preocupante ya que puede ser un indicativo de que el tratamiento con este antimicrobiano este ocasionado resistencias en la comunidad y no solo en pacientes hospitalizados; estos datos son similares al del estudio ya que el mayor número de aislados resistentes se encontraron en este servicio hospitalario. Por lo que sugieren implementar un programa de optimización del tratamiento antibiótico a las personas que acuden a consulta externa y así mejorar la prescripción antibiótica evitando nuevas resistencias (Bosaeed et al., 2020).

Adicionalmente, al realizar la comparación del método de microdilución en caldo con el sistema automatizado Vitek 2 Compact de las 10 cepas elegidas al azar de *P. aeruginosa*, se observó resultados similares en ambos métodos, a pesar de que no existen estudios científicos que indiquen este tipo de relación entre estos dos métodos manual y automatizado con este antimicrobiano. De igual manera, se determinó un essential agreement y categorical agreement del 100 % sin la presencia de errores; estos datos son casi similares al estudio de Shields et al. (2017) en el que obtiene tasas de EA y CA para microdilución en caldo de ceftolozane/tazobactam correspondiente al 96 % y 94 %, e identifican únicamente errores menores que se pueden deber a cualquier otra discrepancia que no esté relacionada con los perfiles de susceptibilidad. Las mediciones en Vitek 2 Compact como por el método gold standard nos indican una excelente actividad para evaluar CEF/TAZ contra aislados de *P. aeruginosa* (Humphries et al., 2018).

6. CONCLUSIONES

Al ser el primer estudio realizado en Ecuador, se determinó que el porcentaje de susceptibilidad de ceftolozane/tazobactam fue del 70.93 % siendo un dato similar en comparación con las tasas de susceptibilidad de países de América Latina del 80.55 %, 70 %, 68.30 %, 66.10 % y 64.40 % en Chile, Argentina, Brasil, Colombia y México respectivamente, lo cual demuestra una adecuada actividad *in vitro* contra aislados de *P. aeruginosa* procedentes del país.

La aparición de resistencia en ceftolozane/tazobactam en cepas de *P. aeruginosa*, en nuestro estudio con un porcentaje de 23.26 % nos confirma la capacidad extraordinaria de este patógeno para desarrollar resistencia a varios antimicrobianos, incluyendo esta combinación que no ha sido utilizada en el Ecuador como tratamiento. Los posibles determinantes de resistencia se pueden generar por la acumulación de mutaciones que conducen a la sobreproducción y modificación estructural de *AmpC*, represión o inactivación de la porina *OprD* y modificación de la diana PBP.

Los resultados de este trabajo construyen una base de evidencia científica para la posible consideración de esta combinación de antibióticos como opción terapéutica en casos de infecciones urinarias complicadas incluyendo pielonefritis, infecciones intraabdominales complicadas, neumonía adquirida en el hospital y neumonía asociada a ventilación mecánica por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, sin producción de carbapenemasa.

La actividad del sistema automatizado Vitek 2 Compact frente a ceftolozane/tazobactam, demuestra mantener una buena relación en essential agreement y categorical agreement con un 100 % frente a los 10 aislamientos de *P. aeruginosa* que fueron comparados con el método de microdilución en caldo, indicándonos que los métodos presentan una excelente actividad para la evaluación de CEF/TAZ.

Ceftolozane/tazobactam es considerado como un fármaco adecuado para tratar infecciones graves por *P. aeruginosa* en los pacientes que acuden a los distintos servicios hospitalarios, siendo esta combinación una opción para tratar estos aislados; sin embargo, en el estudio demostró que la mayoría de cepas resistentes provienen del servicio hospitalario de consulta externa, seguido de cirugía y UCI.

7. RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar otros estudios para comprender los mecanismos de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*, así como una comparación entre los métodos de laboratorio ya existentes en el mercado epsilon test, métodos automatizados y el método de microdilución en caldo para contribuir al sistema de salud pública con el objetivo de impulsar nuevas investigaciones que aporten con datos científicos al país.

Los datos obtenidos en este estudio demuestran la necesidad de llevar a cabo una vigilancia en el sistema salud respecto a la vigilancia de RAM para prevenir una mayor propagación de la resistencia a los antibióticos de primera línea en bacterias Gram negativas.

Se recomienda continuar con estudios *in vitro* de este método con un número mayor de tamaño muestral donde se abarque enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* para así obtener un panorama más amplio del espectro de resistencias existentes en el Ecuador.

Se sugiere realizar una validación estadística bajo condiciones de repetibilidad con un mayor tamaño muestral del método de microdilución en caldo para ceftolozane/tazobactam para monitorear y garantizar el cumplimiento de los estándares establecidos por el CLSI respecto a las pruebas de susceptibilidad.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Arca-Suárez, J., Vázquez-Ucha, J. C., Fraile-Ribot, P. A., Lence, E., Cabot, G., Martínez-Gutián, M., & ... & Galán-Sánchez, F. (2020). Molecular and biochemical insights into the in vivo evolution of AmpC-mediated resistance to ceftolozane/tazobactam during treatment of an MDR *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(11), 3209-3217. doi:10.1093 / jac / dkaa291
- Auta, A. H.-A. (2019). Global access to antibiotics without prescription in community pharmacies: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*, 78(1), 8-18.
- Barnes, M. D., Taracila, M. A., Rutter, J. D., Bethel, C. R., Galdadas, I., Hujer, A. M., . . . Bonomo, R. A. (2018). Deciphering the evolution of cephalosporin resistance to ceftolozane-tazobactam in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 9(6), e02085-18. doi:10.1128 / mBio.02085-18
- Barth, L., Weinsten, M., & Ferraro, M. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*, 1749-1755. doi:10.1086/647952
- Bosaeed, M., A, A., A, A., Alswidan, L., & Alsaedy, A. (2020). Experience With Ceftolozane-Tazobactam for the Treatment of Serious *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Saudi Tertiary Care Center. *Infectious Diseases: Research and Treatment*. doi:https://doi.org/10.1177/1178633720905977
- Bouslah, Z. (2019). Carba NP test for the detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 50(6), 466-479. doi:10.1016 / j.medmal.2019.12.002
- Bravo-Burguillos Ros, L. (2018). *Resistencia antibiótica en pseudomonas aeruginosa: situación epidemiológica en España y alternativas de tratamiento*. Recuperado el 08 de Marzo de 2021, de Universidad Complutense Madrid: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/62479/>
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2011). *Microbiología médica* (25 ed.). México: McGraw-Hill.
- Cabot, G., Bruchmann, S., Mulet, X., & Zamorano, L. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* Ceftolozane-Tazobactam Resistance Development Requires Multiple Mutations Leading to Overexpression and Structural Modification of AmpC. 58-64. doi:10.1128 / AAC.02462-13
- Cabot, G., López-Causapé, C., Ocampo-Sosa, A., Sommer, L., Domínguez, M., Zamorano, L., . . . Oliver, A. (2016). Deciphering the resistome of the widespread

- Pseudomonas aeruginosa* sequence type 175 international high-risk clone through whole-genome sequencing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(12), 7415-7423.
- Cada, D., Wageman, J., Baker, D., & Levien, T. L. (2015). Ceftolozane/Tazobactam. *Hospital pharmacy*, 50(6), 526-533. doi:10.1310/hpj5006-526
- Calderón Majé, L. A., & Fontalvo Torres, L. C. (2019). Perfil de susceptibilidad In Vitro de *Pseudomonas aeruginosa* frente a Ceftolozane/Tazobactam. *Pontificia Universidad Javeriana Colombia*.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Method of determination of antimicrobial sensitivity by dilution. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 29(2), 1-4. Obtenido de <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (January de 2018). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. *CLSI standard M07*.
- Cluck, D., Lewis, P., Stayer, B., Spivey, J., & Moorman, J. (2015). Ceftolozane-tazobactam: A new-generation cephalosporin. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 72(24), 2135-2146. doi:10.2146/ajhp150049
- Del Barrio-Tofiño, E., López-Causapé, C., Cabot, G., Rivera, A., Benito, N., Segura, C., & ... & Tormo, N. (2017). Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(11), e01589-17. doi:10.1128 / AAC.01589-17
- Dortet, L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2012). Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(11), 3773-3776. doi:10.1128 / JCM.01597-12
- García Fernández, S., García Castillo, M., Bou, G., Calvo, J., Cercenado, E., Delgado, M., & Díaz Regañón, J. (2019). Activity of ceftolozane/tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacterales isolates recovered from intensive care unit patients in Spain: The SUPERIOR multicentre study. *International journal of antimicrobial agents*, 53(5), 682-688.
- Giani, T., Arena, F., & Pollini, S. (2018). Italian nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* from invasive infections: activity of ceftolozane/tazobactam and comparators, and molecular epidemiology of carbapenemase producers. *J Antimicrob Chemother.*, 664-671. doi:10.1093/jac/dkx453.
- Goodlet, K., & Nicolau, D. (2017). In Vitro Comparison of Ceftolozane-Tazobactam to Traditional Beta-Lactams and Ceftolozane-Tazobactam as an Alternative to

- Combination Antimicrobial Therapy for *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 61-72. doi:10.1128/AAC.01350-17
- Gutiérrez, S., Correa, A., Hernández-Gómez, C., De La Cadena, E., Pallares, C., & Villegas, M. V. (2019). Detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM). *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 37(10), 648-651. doi:10.1016/j.eimc.2019.02.004
- Haidar, G., & Philips, N. (2017). Ceftolozane-Tazobactam for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections: Clinical Effectiveness and Evolution of Resistance. *Clin Infect Dis*, 110-120. doi:10.1093/cid/cix182
- Helio, S., Jones, D., & Castanheira, M. (2014). Antimicrobial activity of ceftolozane/tazobactam tested against *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae with various resistance patterns isolated in European hospitals (2011–12). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2713-2722. doi:https://doi.org/10.1093/jac/dku184
- Hervé, B. (2015). Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico: automatización y algunas aplicaciones en identificación microbiana y estudio de susceptibilidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(6), 753-763. doi:10.1016/j.rmclc.2015.11.004
- Hirsch, E., Brigman, H., Zucchi, P., Chen, A., Anderson, J., Eliopoulos, G., . . . Bias, T. (2020). Actividad de ceftolozano/tazobactam y ceftazidima/avibactam contra *Pseudomonas aeruginosa* resistente a β -lactámicos y enterobacteriales productores de β -lactamasa de espectro extendido de centros médicos de EE. UU. *J Glob Antimicrob Resist.*, 689-694. doi:10.1016/j.jgar.2020.04.017
- Horcajada, J. P.-Z. (2019). Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clinical microbiology reviews*, 32(4), e00031-19.
- Hospital de Especialidades Eugenio Espejo. (2011). *SISTEMA DE VIGILANCIA Y CONTROL DE LAS INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS, SIVICEIN 2007, 2008, 2009, 2010, 2011*. Recuperado el 11 de Abril de 2019, de Ministerio de Salud Pública: <https://es.slideshare.net/manuelita1018/sivicein-analisis-total20072011>
- Huerta-Gutiérrez, R., Braga, L., Camacho-Ortiz, A., Díaz-Ponce, H., García-Mollinedo, L., Guzmán-Blanco M, V.-B. S.-N.-E.-O.-Z., . . . D, W. (2019). One-day point prevalence of healthcare-associated infections and antimicrobial use in four countries in Latin America. *Int J Infect Dis.*, 157-166. doi:10.1016/j.ijid.2019.06.016. Epub 2019 Jun 21. PMID: 31229613.

- Humphries, R., Hindler, J., Magnano, P., Wong-Beringer, A., Tibbetts, R., & Miller, S. (2018). Performance of Ceftolozane-Tazobactam Etest, MIC Test Strips, and Disk Diffusion Compared to Reference Broth Microdilution for β -Lactam-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Journal of clinical microbiology*, 56-59. doi:<https://doi.org/10.1128/JCM.01633-17>
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (05 de Marzo de 2016). *Pseudomonas aeruginosa*. Recuperado el 20 de Abril de 2019, de Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo: <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Pseudomonas+aeruginosa+2017.pdf/7e1ed73b-eca5-4578-a4f7-1c8847e6a799>
- International Federation of Infection Control. (2011). *Conceptos básicos de control de infecciones de IFIC*. Ireland: 2da. Obtenido de http://theific.org/wp-content/uploads/2014/08/Spanish_front_PRESS.pdf
- Lesney, M. (Enero de 2021). Ceftolozane-tazobactam found effective in critically ill patients with *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Chest Physician*. Obtenido de <https://www.mdedge.com/authors/mark-s-lesney-phd>
- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annual review of microbiology*, 64, 357-372. doi:10.1146 / annurev.micro.112408.134306
- López-Calleja, A. I., Morilla Morales, E., Nuñez Medina, R., Fernández Esgueva, M., Sahagún Pareja, J., García-Lechuz Moya, J. M., . . . Rezusta López, A. (2019). Antimicrobial activity of ceftolozane-tazobactam against multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a Spanish hospital. *Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 68-72. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6372965/#cit0015>
- Luján Roca, D. A. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 48(4), 465-474. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/535/53535594009.pdf>
- MacVane, S., Pandey, R., Steed, L., Kreiswirth, B., & Chen, L. (2017). Emergence of Ceftolozane-Tazobactam-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* during Treatment Is Mediated by a Single AmpC Structural Mutation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(12), e01183-17. doi:10.1128/AAC.01183-17
- Ministerio de Salud Pública. (01 de Agosto de 2019). *Resistencia antimicrobiana*. Recuperado el 31 de Julio de 2020, de Ministerio de Salud Pública del Ecuador: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf
- Mojica, M., Rios, R., De La Cadena, E., Correa, A., Diaz, L., Millan, L., . . . Villegas, M. (2019). Molecular Mechanisms Leading to Ceftolozane-Tazobactam Resistance

- in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Five Latin American Countries. *In Open Forum Infectious Diseases*, 6(Supplement 2), S285-S286. doi:10.1093 / ofid / ofz360.681
- Montero, M. M. (2013). *Pseudomonas aeruginosa multiresistente aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos*. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona. Obtenido de <https://www.tesisenred.net/handle/10803/107902#page=5>
- Muñoz, L., Grosolli, V., Mella, S., Riedel, G., Opazo, M., & Vega-Yáñez, F. (2020). Perfil de susceptibilidad y detección de carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos del Hospital Regional Dr. Guillermo Grant Benavente de Concepción, durante 2017-2019. *Revista Chilena de Infectología*, 87(Supl 1), 89-93.
- Nicolau, C. J., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(Supl 1), 19-28. doi:10.1016/S0213-005X(10)70004-5
- Olarte, T., Cáceres, D., & Cortés, J. (2018). Nuevas cefalosporinas. *Revista chilena de infectología*, 35(5), 465-475. doi:10.4067/s0716-10182018000500465
- Ophelie, C., & Molin Queste, M. (2016). Phenotypic detection of Carbapenemases in *P. aeruginosa* in patients attending the Hospital de Clinicas in San Lorenzo, from February to July 2013. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 25-31. doi:<https://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528>
- Organización Mundial de la Salud. (27 de Febrero de 2017). *Lista OMS de patógenos prioritarios para la investigación, el descubrimiento y el desarrollo de nuevos antibióticos*. Recuperado el 01 de Marzo de 2021, de Organización Mundial de la Salud (OMS): <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Organización Mundial de la Salud. (08 de Febrero de 2018). *Desechos de las actividades de atención sanitaria*. Recuperado el 11 de Noviembre de 2019, de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/health-care-waste>
- Organización Mundial de la Salud. (15 de Febrero de 2018). *Resistencia a los antimicrobianos*. Recuperado el 02 de Abril de 2019, de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
- Ortiz de la Rosa, J. M., Nordmann, P., & Poirel, L. (2019). ESBLs and resistance to ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam combinations in *Escherichia*

- coli and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Chemother*, 74-77. doi:10.1093/jac/dkz149
- Ossa-Giraldo, A. C., Echeverri-Toro, L. M., Santos, Z. M., García, M. G., Agudelo, Y., Ramírez, F., & Ospina, S. (2014). Factores de riesgo para infección por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente en un hospital de alta complejidad. *Revista chilena de infectología*, 31(4), 393-399. doi:10.4067/S0716-10182014000400003
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B., Lin, T., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*, 37(1), 177-192. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
- Paz Zarza, V. M., Mangwani Mordani, S., Martínez Maldonado, A., Álvarez Hernández, D., Solano Gálvez, S. G., & Vázquez López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología*. *Revista chilena de infectología*, 36(2), 180-189. doi:10.4067/S0716-10182019000200180
- Pearson, M. A., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Valderrama, C. D., Marcano, N. S., & Melano, R. G. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 43(e65). doi:10.26633/RPSP.2019.65
- Pérez Gallego, M. (2019). *Conexión entre metabolismo del peptidoglicano, resistencia a beta-lactámicos y virulencia en Pseudomonas aeruginosa*. Recuperado el 27 de Marzo de 2019, de Tesis Doctorals en Xarxa: <https://www.tesisenred.net/handle/10803/666600#page=1>
- Ponce de Leon, A., Merchant, S., Raman, G., Avendano, E., Chan, J., Hernandez, G., & Sarpong, E. (2020). *Pseudomonas* infections among hospitalized adults in Latin America: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.*, 20-21. doi:<https://dx.doi.org/10.1186%2Fs12879-020-04973-0>
- Prado-Montoro, C. D., Ruiz-Aragón, J., Martínez Rubio, C., García-Martín, S., Freyre-Carrillo, C., & Rodríguez-Iglesias, M. A. (2019). Evaluación de la sensibilidad de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistentes frente a ceftolozano/tazobactam. *Revista chilena de infectología*, 36(5), 551-555. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000500551>
- Riera, E., Cabot, G., Mulet, X., García-Castillo, M., Del Campo, R., Juan, C., . . . Oliver, A. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(9), 2022-2027. doi:10.1093/jac/dkr232

- Rodríguez, D. (2019). *Validación de una metodología para la cuantificación de un microorganismo probiótico*. Recuperado el 09 de Marzo del 2021, de Repositorio de la Universidad de Antioquia: http://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/11259/1/RodriguezDiana_2019_ValidacionCuantificacionProbiotico.pdf
- Ruiz-Garbajosa, P., & Cantón, R. (2016). Epidemiología de los bacilos gramnegativos multirresistentes. *Revista Española Quimioterapia*, 29(1), 21-25. Obtenido de https://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/seq_0214-3429_29_sup1_5ruiz.pdf
- Ruiz-Garbajosa, P., & Cantón, R. (2017). Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy. *Revista Española de Quimioterapia*, 30((Supl. 1)), 8-12. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28882007/>
- Sandle, T. (2016). Antibiotics and preservatives. *Pharmaceutical Microbiology Essentials for Quality Assurance and Quality Control*, 171-183. doi:10.1016/B978-0-08-100022-9.00014-1
- Sandoval-Motta, S., & Aldana, M. (2016). Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 8(3), 253-267. doi:10.1002 / wsbm.1335
- Schmidt-Malan, S. M., Mishra, A. J., Mushtaq, A., Brinkman, C. L., & Patel, R. (2018). In vitro activity of imipenem-relebactam and ceftolozane-tazobactam against resistant Gram-negative bacilli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(8), e00533-18. doi:10.1128 / AAC.00533-18
- Schumacher, A., Vranken, T., Malhotra, A., Arts, J. J., & Habibovic, P. (2018). In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(2), 187-208. doi:10.1007 / s10096-017-3089-2
- Shields, R. K., Clancy, C. J., Pasculle, A. W., Press, E. G., Haidar, G., Hao, B., . . . Nguyen, M. H. (2018). Verification of Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam Susceptibility Testing Methods against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical microbiology*, 56-58. doi:<https://dx.doi.org/10.1128%2FJCM.01093-17>
- Sorbera, M., Chung, E., Ho, C., & Marzella, N. (2014). Ceftolozane/Tazobactam: a new option in the treatment of complicated gram-negative infections. *Pharmacy and Therapeutic*, 39(12), 825, 828-832. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4264669/>

- Tenover, F. C. (2015). Antimicrobial Susceptibility Testing. *Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition)*, 166-175.
- Tuon, F., Cieslinski, J., Rodrigues, S., Serra, F., & Negra de Paula, M. (2020). Evaluation of in vitro activity of ceftolozane-tazobactam against recent clinical bacterial isolates from Brazil - the EM200 study. *Braz J Infect Dis*, 96-103. doi:10.1016/j.bjid.2020.04.004.
- Villa, L., Cortés, J., Leal, A., Meneses, A., & Meléndez, M. (2013). Pseudomonas aeruginosa resistente a antimicrobianos en hospitales colombianos. *Revista chilena de infectología*, 605-610. doi:10.4067/S0716-10182013000600005
- WHONET. (08 de Julio de 2020). *Protocolo de trabajo RED WHONET 2020 Argentina*. Recuperado el 08 de Marzo de 2021, de RED WHONET - Argentina: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2020/07/Protocolo-WHONET-aprobado-2020-final-2.pdf>
- Wi, Y., Greenwood-Quaintance, K., Schuetz, A., Ko, K., Peck, K., Song, J., & Patel, R. (2017). Activity of Ceftolozane-Tazobactam against Carbapenem-Resistant, Non-Carbapenemase-Producing Pseudomonas aeruginosa and Associated Resistance Mechanisms. *American Society for Microbiology*, 1970-1974. doi:10.1128/AAC.01970-17
- Wood, T. K., Knabel, S. J., & Kwan, B. W. (2013). Bacterial persister cell formation and dormancy. *Applied and environmental microbiology*, 79(23), 7116-7121.
- Yin, D., Wu, S., Yang, Y., Shi, Q., Dong, D., Zhu, D., . . . (CHINET), G. d. (2019). Results from the China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET) in 2017 of the In Vitro Activities of Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam against Clinical Isolates of Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother*, 63-67. doi:https://doi.org/10.1128/AAC.02431-18
- Yi-Wei, T., Sussman, M., Dongyou, L., & Schwartzman, J. (2015). *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier Ltd. All rights reserved.
- Zaragoza, R., & Gimeno, C. (2008). *Microbiología Aplicada al Paciente Crítico*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Zhanel, G., Chung, P., Adam, H., Zelenitsky, S., Denisuik, A., Schweizer, F., . . . Karlowsky, J. (2014). Ceftolozane/tazobactam: a novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Drugs*, 74(1), 31-51. doi:10.1007 / s40265-013-0168-2
- Zowalaty, M. T. (2015). Pseudomonas aeruginosa: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiology*, 10(10), 1683–1706.

Anexo 1

Carta de autorización al INSPI.



Quito, 18 de junio de 2020
Oficio N° BQC-0136-20

Doctor Patricio Ponce
Coordinador Zonal 9 del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública
"Dr. Leopoldo Izquieta Pérez" INSPI-LIP.
Ciudad

De mi consideración:

Por medio de la presente pongo en su conocimiento que las señoritas Andrea Regina Ajila Acuña, con CC 171931405-4 y Daniela Belén Oña Iza con CC 172192565-7, estudiantes de la Carrera de Bioquímica Clínica – Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, presentaron el plan del Trabajo de Titulación intitulado "Determinación de la actividad de Ceftolozane/Tazobactam mediante el método de microdilución en caldo en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes del INSPI, año 2019", para desarrollarlo previo a la obtención del grado académico de tercer nivel bajo la dirección del Mtr. José Eduardo Villacís. El plan fue evaluado por el Comité de la Unidad de Titulación de la carrera y aprobado por la autoridad correspondiente.

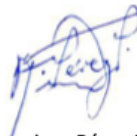
Con este antecedente, solicito a usted muy comedidamente su autorización para que las estudiantes realicen el trabajo de titulación en la institución en colaboración con el Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos, el que requiere el uso de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de aislados clínicos que son remitidos al INSPI, además de los registros médicos de la población de interés, cuyos datos serán anonimizados de tal forma se mantenga la confidencialidad de la información que pudiera identificar al paciente. Debo aclarar que la relación entre el INSPI y las estudiantes mencionadas no implica un vínculo laboral y es exclusivamente de formación académica sin ninguna remuneración.

En el proceso para la aprobación y autorización de este tipo de investigaciones, se requiere el oficio de la autoridad del establecimiento de salud donde se llevará a efecto la investigación, en el que se manifieste el conocimiento del plan, el interés en su ejecución y la respectiva autorización.

Se adjunta un resumen del plan de titulación de las mencionadas estudiantes que permita analizarlo y verificar la relevancia del tema en cuestión. Luego de lo cual esperamos contar con su apoyo a través de este oficio que forma parte de los requisitos para la aprobación de los planes de investigación en salud.

Seguro de contar con su colaboración a esta actividad académica de beneficio para la comunidad y de relevancia científica para las dos instituciones anticipo mi agradecimiento.

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "F. Pazmiño".

Dr. Francisco Pérez Pazmiño
Decano de la Facultad de Medicina



Anexo 2

Carta de aprobación del estudio del Comité de ética de la Universidad San Francisco de Quito.



UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ



Certificado de exención

Oficio N°. CE-P2020.067E
Quito, 06 de octubre de 2020

Señoritas
Andrea Regina Ajila Acuña
Daniela Belén Oña Iza
Investigadoras Principales del estudio
Pontificia Universidad Católica del Ecuador, PUCE
Presente

Referencia: Protocolo 2020-067E

De nuestra consideración:

El Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito (CEISH-USFQ), notifica a usted que analizó la investigación que se describe a continuación:

A. DATOS DE LA INVESTIGACIÓN			
Códigos	CEISH-USFQ: 2020-067E		
Código informe de evaluación	IE.E150-2020-CEISH-USFQ	Fecha	06 octubre 2020
Título de la Investigación	Determinación de la actividad de Ceftriaxone/Tazobactam mediante el método de microdilución en caldo en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> provenientes del INSPI, año 2019		
Investigadores + afiliación institucional	Nombre Investigador	Institución	Rol en la investigación
	Andrea Regina Ajila Acuña	Pontificia Universidad Católica del Ecuador,	Investigadora principal 1
	Daniela Belén Oña Iza	PUCE	Investigadora principal 2
	José Eduardo Villacis Acuña		Investigador-docente DT
	Fernando Xavier Villavicencio Zambrano	Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, INSPI	Coinvestigador
Centro de investigación	Custodio de muestras: Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, INSPI		
Duración de la Investigación	Duración: 5 meses		
Financiamiento-monto	n/a		

Este estudio se cataloga como "exento", de acuerdo con las regulaciones internacionales que rigen las investigaciones en seres humanos.

El CEISH-USFQ otorga este certificado, toda vez que la investigación cumple con uno o más criterios elegibles para una exención:

- Investigación con recopilación y/o análisis de datos anonimizados obtenidos de registros existentes.
- Investigación con recopilación y/o análisis de datos y muestras en custodia en institución pública de salud.
- Investigación con recolección de datos de manera anonimizada y de población adulta.
- Investigación que evalúe anónimamente programas públicos o prácticas educativas.
- Investigación que evalúe anónimamente el sabor y/o calidad de alimentos, o estudios de aceptación del consumidor.



Documentos revisados que sustentan esta certificación de exerto		Versión	Fecha	# págs	
1	Solicitud de evaluación ética del protocolo de investigación.	E1.0	14 jul 2020	02	
2	Protocolo de investigación	E1.0	14 jul 2020	08	
3	Justificación de NO aplicación del consentimiento por escrito.	E1.0	14 jul 2020	02	
4	Instrumentos a ser utilizados para el desarrollo de la investigación:	E1.0	14 jul 2020		
	4.1. Matriz para recolección de datos de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> del año 2019 provenientes del INSPI (anexo 1)				01
	4.2. Esquema para el protocolo de preparación de microdiluciones (anexo 3)				01
	4.3. Matriz de distribución de los micropocillos para la microdilución en caldo de Cefalo zana (anexo 4)				01
	4.4. Matriz de distribución de los micropocillos para la microdilución en caldo de Ceflozaxam/Tazobactam (anexo 5)				01
4.5. Protocolo de desecho de material biológico (anexo 6)	01				
5	Hoja de vida del equipo de investigación: 5.1. Andrea Regina Ajla Acuña 5.2. Daniela Belén Cña Iza	-	14 jul 2020	02 02	
6	Certificados de capacitación o experiencia probada de las investigadoras principal en biótica de la investigación en protección al sujeto humano en la investigación.	-	06 oct 2020	02	
7	Carta compromiso de los investigadores principales	-	14 jul 2020	02	

Este certificado tiene una vigencia de siete meses, desde el 06 de octubre de 2020 hasta el 05 de mayo de 2021, tomando en cuenta el período de duración del estudio especificado en el Protocolo de investigación presentado (versión E1.0), y otorgando dos meses adicionales para cualquier eventualidad.

Esta certificación aplica solo para las actividades descritas en los documentos revisados según el informe de evaluación No. IE-E150-2020-CEISH-USFQ. Cualquier modificación a los documentos antes aprobados debe ser notificada a este Comité, para un nuevo análisis y determinación del nivel de riesgo.

El CEISH-USFQ deslinda cualquier responsabilidad en cuanto a la veracidad de la información presentada.

Iván Sisa, MD, MPH, MS
Presidente CEISH-USFQ
Correo electrónico: comitebioetica@usfq.edu.ec



cc: Archivo digital del estudio
D/Amvvt

Anexo 3

Protocolo de preparación de la solución madre de ceftolozane.

Merck & Co., Inc. realizó la donación del polvo antimicrobiano ceftolozane para este estudio.

PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE CEFTOLOZANE

DATOS DEL ANTIBIÓTICO	
Lote: 440637 0020 9	Casa comercial: Merck & Co., Inc.
Potencia: 785 µg/mg	Almacenamiento: - < 20°C
Solvente: H ₂ O	Pureza: 98.8 % (HPLC)
Fracción activa: 87.31 %	Porcentaje de agua (% H ₂ O): 9.0 %

CÁLCULO POTENCIA

$$Potencia = Pureza \times Fracción\ activa (1 - \% H_2O)$$

$$Potencia = 988 \times 0.8731 (1 - 0.09)$$

$$Potencia = 785 \mu g/mg$$

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE (SM)

Volumen final: 8 mL

Concentración final: 1962.5 µg/mL

$$Peso\ Ceftolozane = \frac{Volumen\ (mL) \times Concentración\ \left(\frac{\mu g}{mL}\right)}{Potencia\ \left(\frac{\mu g}{mg}\right)}$$

$$Peso\ Ceftolozane = \frac{8\ (mL) \times 1962.5\ \left(\frac{\mu g}{mL}\right)}{785\ \left(\frac{\mu g}{mg}\right)}$$

$$Peso\ Ceftolozane = 20\ mg$$

20 mg Ceftolozane en Polvo + 4000 µL de Agua Molecular + 4000 µL de Agua Molecular

Alicuotar y Almacenar a -80°C

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO (ST)

Volumen final: 5250 µL

Concentración final: 256 µg/mL

A partir de una alícuota de la SM se debe preparar:

684.84 µL de SM Ceftolozane + 4565.2 µL de CAMHB

Almacenar -20°C

Anexo 4

Preparación de solución de trabajo para ceftolozane.

Diluciones

Solución de Trabajo 1 (ST1): 256 µg/mL

Preparación de diluciones (1 placa): VF: 5250

	SM	SOLVENTE
Sol. Madre	1962.5	-
Sol. Trabajo	273.94	3926.06

ANTIBIÓTICO	Ceftolozane		
# MUESTRAS	55	Vol/Muestra	2950
Concentración dilución (µg/mL)	Concentración en el tubo (µg/mL)	Volumen ST (µL)	Volumen Solvente (µL)
128	64	2950.00	-
64	32	1475.00	1475.00
32	16	737.50	2212.50
16	8	368.75	2581.25
8	4	184.38	2765.63
4	2	92.19	2857.81
2	1	46.09	2903.91
1	0.5	23.05	2926.95
	Total	5876.95	17723.05
	Aprox.	6176.95	18023.05

Procedimiento

1. Preparación de la suspensión bacteriana

- 1.1 Sembrar las cepas en agar nutritivo e incubar 24 horas incluidas las cepas control.
- 1.2 Preparar una solución McFarland 0.5 ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL) en solución salina al 0.9 % (SS).
- 1.3 Realizar una dilución 1:100 de las cepas con 10 µL de solución 0.5 McFarland + 990 µL de SS (1×10^6 UFC/mL).

Control de Calidad

- 1.4 Para el control de calidad pipetear 10 µL del pocillo de control de crecimiento de la cepa ATCC 27853, hacer una dilución 1:1000 (10 µL + 990 SS (1:100); 100 µL + 900 µL SS (1:10)), sembrar en agar nutritivo para su respectivo contaje (50 colonias).

2. Preparación de los pocillos

2.1 Rotular los micropocillos para la distribución de las diluciones de los antibióticos.

2.2 Añadir 50 μ L de cada dilución en cada pocillo según la distribución de las diluciones en la microplaca.

2.3 Añadir 50 μ L de la suspensión bacteriana.

2.4 Incubar 24 horas a 37°C dentro de los 15 minutos posteriores a la adición del inóculo.

Tabla 1

Distribución de los micropocillos para la microdilución de ceftolozane.

N° Columnas Microplaca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Muestras		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Cepa ATCC 2146	Cepa ATCC 27853	Control del medio (CAMHB)
Diluciones (µg/ml)	A= 32												
	B= 16												
	C= 8												
	D= 4												
	E= 2												
	F= 1												
	G= 0.5												
	H= 0.25												

Observaciones:

- Se utilizaron 9 cepas diferentes de *P. aeruginosa* que se trabajaron en cada microplaca de manera vertical.
- Se utilizaron 8 diluciones del antibiótico, desde la concentración de pocillo 32 ug/ml hasta 0.25 ug/mL.
- En cada microplaca se utilizaron 2 cepas ATCC para control de calidad.
 - Control positivo (Cepa ATCC 2146)
 - Control negativo (Cepa ATCC 27853)
- La columna 12 fue utilizada como control del medio (CAMHB).

Anexo 5

Protocolo de preparación de la solución madre de tazobactam.

PROTOCOLO DE PREPARACIÓN SOLUCIÓN MADRE DE TAZOBACTAM

DATOS DEL ANTIBIÓTICO	
Lote: 68300	Casa comercial: Sigma-Aldrich
Potencia: 706.78 µg/mg	Almacenamiento: 2-8°C
Solvente: H ₂ O	Pureza: 99 % (Assay)
Fracción activa: 99.74 %	Porcentaje de agua (% H ₂ O): 2.8 %

CÁLCULO POTENCIA

$$Potencia = Pureza \times Fracción\ activa (1 - \% H_2O)$$

$$Potencia = 990 \times 0.9974 (1 - 0.028)$$

$$Potencia = 959.78 \mu g/mg$$

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE (SM)

Volumen final: 5 mL

Concentración final: 318.64 µg/mL

$$Peso\ Tazobactam = \frac{Volumen\ (mL) \times Concentración\ \left(\frac{\mu g}{mL}\right)}{Potencia\ \left(\frac{\mu g}{mg}\right)}$$
$$Peso\ Tazobactam = \frac{5\ (mL) \times 318.64\ \left(\frac{\mu g}{mL}\right)}{959.78\ \left(\frac{\mu g}{mg}\right)}$$

$$Peso\ Tazobactam = 1.66\ mg$$

1.66 mg Tazobactam en Polvo + 2500 µL de Agua Molecular + 2500 µL de Agua Molecular

Alicuotar y Almacenar a -80°C

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO (ST)

Volumen final: 8000 µL

Concentración final: 16 µg/mL

A partir de una alícuota de la SM se debe preparar:

401.71 µL de SM Tazobactam + 7598.29 µL de CAMHB

Almacenar -20°C

Tabla 2

Solución de trabajo de ceftolozane/tazobactam.

CEFTOLOZANE		
	SM	SOLVENTE
Sol. Madre	1962.5	-
Sol. Trabajo	402.88	5774.07

TAZOBACTAM		
	SM	SOLVENTE
Sol. Madre	318.64	-
Sol. Trabajo	552.35	10747.65

CEFTOLOZANE			
# MUESTRAS	55	Vol/muestra	2950
Concentración dilución	Concentración en el tubo	Volumen ST	Volumen Solvente
128	64	2950.00	-
64	32	1475.00	1475.00
32	16	737.50	2212.50
16	8	368.75	2581.25
8	4	184.38	2765.63
4	2	92.19	2857.81
2	1	46.09	2903.91
1	0.50	23.05	2926.95
	Total	5876.95	17723.05
	Aprox.	6176.95	18023.05

CEFTOLOZANE/TAZOBACTAM					
Conct. Cefzolozane	Conct. Tazobactam	Conct. en el tubo CEF/TAZ	Conct. en el pocillo CEF/TAZ	Volumen Cefzolozane	Volumen Tazobactam
64	16	64/8	32/4	1375	1375
32	16	32/8	16/4	1375	1375
16	16	16/8	8/4	1375	1375
8	16	8/8	4/4	1375	1375
4	16	4/8	2/4	1375	1375
2	16	2/8	1/4	1375	1375
1	16	1/8	0.5/4	1375	1375
0.5	16	0.5/8	0.25/4	1375	1375
				Total	11000
				Aprox.	11300

*Conct: Concentración

Tabla 3

Distribución de los micropocillos para la microdilución en caldo de ceftolozane/tazobactam.

Nº Columnas Microplaca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nº Muestras		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Cepa ATCC 2146	Cepa ATCC 27853	Control del medio (CAMHB)
Diluciones (µg/mL)	A= 32/4												
	B= 16/4												
	C= 8/4												
	D= 4/4												
	E= 2/4												
	F= 1/4												
	G= 0.5/4												
	H= 0.25/4												

Observaciones:

- Se utilizaron 9 cepas diferentes de *P. aeruginosa* que se trabajaron en cada microplaca de manera vertical.
- Se utilizaron 8 diluciones del antibiótico, desde la concentración de pocillo 32 µg/ml hasta 0.25 µg/mL.
- En cada microplaca se utilizaron 2 cepas ATCC para control de calidad.
 - Control positivo (Cepa ATCC 2146)
 - Control negativo (Cepa ATCC 27853)
- La columna 12 fue utilizada como control del medio (CAMHB).

Tabla 4

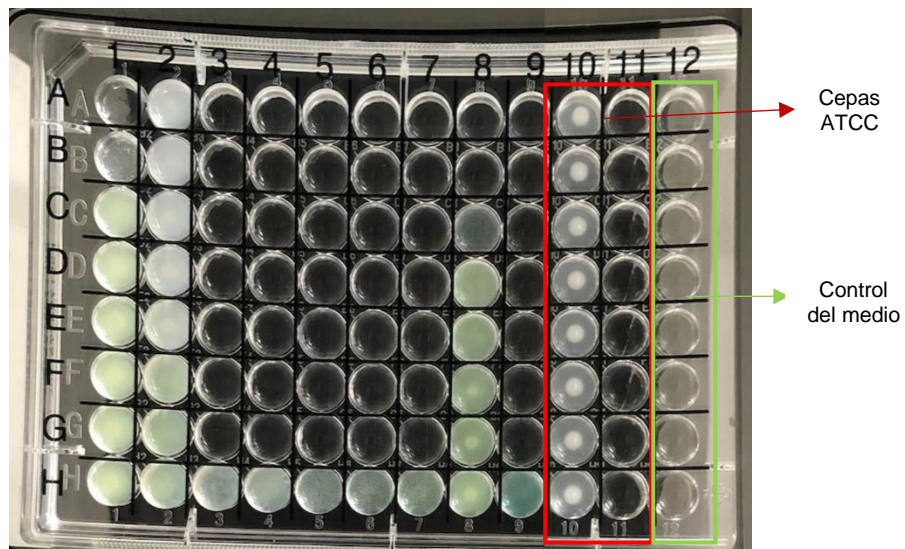
Plantilla de recolección de datos.

MATRIZ DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA PROVENIENTES DEL INSPI-2019																					
Autores: Andre Ajlla y Daniela Oña																					
Núm	Código	Fecha de recepci	Ed	Sex	Tipo de muestr	Servicio Hospital	Microrganismo aislado	Carbapene	CA	CIF	GEI	MEI	IPN	TZF	FEF	AM	ATI	MIC CT DANI	MIC C ANDR	MIC CTZI DANI	MIC CTZ ANDR
1	HEE0414-0319RAM	19/3/2019	32	f	tejido	Hospitalización	Pseudomonas aeruginosa	-	7	17	6	14	12	19	15	19	22	>32	>32	16	16
2	HFA0097-0119RAM	29/1/2019	66	m	abseco	Hospitalización	Pseudomonas aeruginosa	-	20	6	6	6	6	7	7	13	6	16	16	2	2
3	ING1088-0619RAM	26/6/2019	78	f	traqueal	UCI	Pseudomonas aeruginosa	-	26	31	20	11	9	28	26	24	24	2	2	1	0,25
4	ING1084-0619RAM	26/6/2019	67	m	herida	UCI	Pseudomonas aeruginosa	-	23	30	20	11	11	23	22	22	19	0,25	1	<0,25	<0,25
5	ING1384-0718RAM	31/7/2019	46	f	aspirado traqueal	Hospitalización	Pseudomonas aeruginosa	-	24	29	19	11	11	24	23	24	15	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
6	HTM0844-0519RAM	14/5/2019	79	m	traqueal	UCI	Pseudomonas aeruginosa	-	22	32	18	13	12	22	21	20	18	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
7	HTM0843-0519RAM	14/5/2019	59	m	traqueal	Hospitalización	Pseudomonas aeruginosa	-	20	6	6	11	6	23	22	14	18	<0,25	<0,25	1	1
8	ING1090-0619RAM	26/6/2019	36	m	cateter	UCI	Pseudomonas aeruginosa	-	24	30	16	9	14	25	22	22	16	1	1	1	1
9	HTM1484-0819RAM	20/8/2019	40	f	traqueal	Hospitalización	Pseudomonas aeruginosa	-	25	6	6	7	11	24	18	19	15	<0,25	1	8	8
10	ING1582-0919RAM	6/9/2019	61	m	orina	Cons. Externa	Pseudomonas aeruginosa	-	23	6	6	10	10	12	6	10	6	8	8	<0,25	<0,25
11	ING1668-0919RAM	18/9/2019	53	m	sangre	UCI	Pseudomonas aeruginosa	-	25	24	21	13	12	25	24	24	18	1	<0,25	<0,25	<0,25
12	ING1669-0919RAM	18/9/2019	21	m	sangre	Hemodialisis	Pseudomonas aeruginosa	-	24	35	19	15	14	25	25	22	24	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25

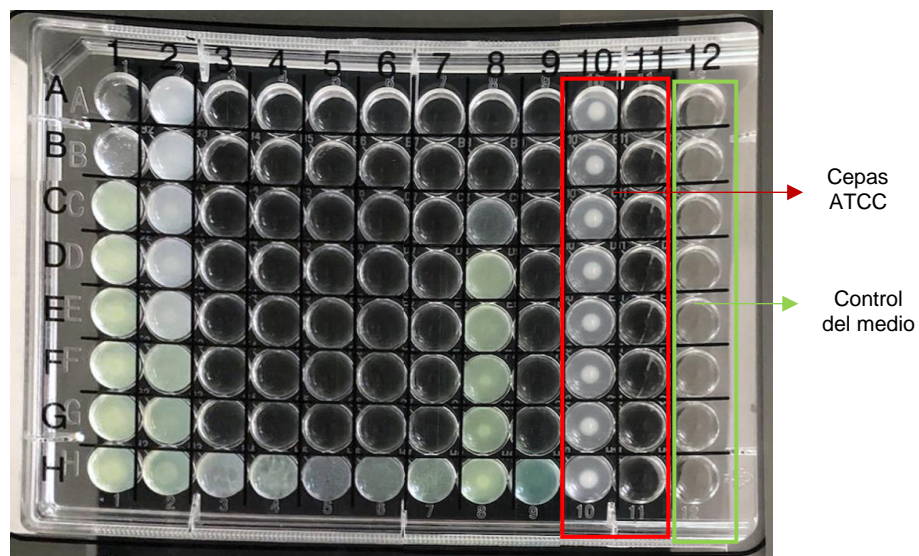
Anexo 6

Fotografías de las microplacas del método de microdilución en caldo ceftolozane/tazobactam (CEF/TAZ).

En las siguientes fotografías, se observa las microplacas del método de dilución en caldo de CEF/TAZ realizadas por la investigadoras Andrea Ajila (Imagen 1) y Daniela Oña (Imagen 2). Cada microplaca distribuyó de la siguiente manera: las filas de la H a la A corresponden a las diluciones realizadas en forma ascendente de 0.25 $\mu\text{g/mL}$ a 32 $\mu\text{g/mL}$, mientras que las columnas del 1 al 9 se encuentran a las cepas de *P. aeruginosa* trabajadas, las columnas 10 y 11 corresponden a la cepas control positivo (cepa ATCC 2146) y cepa control negativo (cepa ATCC 27853) respectivamente, y la columna 12 fue el control del medio (CAMHB).



Autores: Andrea Ajila y Daniela Oña.



Autores: Andrea Ajila y Daniela Oña.

Anexo 7

Protocolo de desecho de material biológico.

- Como medida de eliminación de microorganismos, los medios de cultivo a ser eliminados deberán ser recolectados y transportados en contenedores para el respectivo proceso de auto clavado, mientras que el material de plástico será colocado en bolsas autoclavables.
- Para la esterilización de los materiales contaminados deberá utilizarse material rígido para prevenir posibles derrames o rupturas al recolectar y transportar.
- La efectividad de la esterilización se verificará mediante los indicadores físicos y químicos con el uso de cinta adhesiva.
- La esterilización se realiza en autoclave a 121°C durante 1 hora.
- Los objetos cortopunzantes deberán ser depositados en recipientes de plástico rígido o metal, con una tapa con abertura a manera de alcancía para impedir accidentes, los recipientes poseen una línea que marca cuándo deben considerarse llenos, lo que significa que es momento de desecharlo.
- El INSPI-CZ9 toma en consideración el Reglamento para el Manejo de Desechos en Establecimientos de Salud, a fin a las disposiciones del Ministerio de Salud Pública para el tratamiento de los desechos infecciosos y especiales.
- La empresa ecuatoriana GADERE S. A se encarga de la gestión ambiental de residuos (recolección y tratamiento de los desechos) generados por el INSPI-CZ9. GADERE S.A cuenta con la Licencia Ambiental a nivel nacional otorgada por el Ministerio del Medio Ambiente Resolución No. 118 con R.O. No. 491.

Fuente: (Organización Mundial de la Salud, 2018) e información sobre manejo de desechos proporcionada por el INSPI-Quito.

Anexo 8

Autorización del INSPI

	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	10-06-2019

Intervienen en la celebración, por una parte, el **INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION EN SALUD PÚBLICA, INSPI – “DR. LEOPOLDO IZQUIETA PÉREZ”**, en lo sucesivo denominado “INSPI”, representado por el/la **BQ. CLIN. CAROLINA ELIZABETH SATAN SALAZAR**, en su carácter de **ASESORA** y, por la otra parte, **DANIELA BELÉN OÑA IZA** y **ANDREA REGINA AJILA ACUÑA** estudiantes de la **PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**, en lo sucesivo denominadas “**TESISTA**”, declarando que es su voluntad, suscribir el presente documento al tenor de las siguientes cláusulas:

PRIMERA. ANTECEDENTES

El Reglamento General al Código Orgánico de la Economía Social de los conocimientos, creatividad e innovación, en el Artículo 13: “Los institutos públicos de investigación deberán trabajar en proyectos de investigación con los diferentes actores, gestores y generadores del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, entidades internacionales y en particular con las instituciones de educación superior con el propósito de circular los conocimientos y tecnologías así como desarrollarlos de manera colaborativa y responsable”.


Los y las investigadores de los institutos públicos de investigación podrán ser tutores de trabajos de titulación de los estudiantes de las instituciones de educación superior.

Las instituciones de educación superior podrán desarrollar investigación y desarrollo tecnológico en los institutos públicos de investigación.

Los resultados de las investigaciones de los institutos públicos de investigación podrán articularse con las oficinas de transferencia tecnológica de las instituciones de educación superior, a través de sus propias unidades de gestión de la innovación”.

Según el Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, Artículo 24.- Institutos públicos de investigación.- Los institutos públicos de investigación son entidades con autonomía administrativa y financiera los cuales tienen por objeto planificar, promover, coordinar, ejecutar e impulsar procesos de investigación científica, la generación, innovación, validación, difusión y transferencia de tecnologías.

Se garantiza el funcionamiento permanente de los institutos públicos de investigación relacionados a: salud pública, biodiversidad, investigación agropecuaria, pesca, geología, minería y metalurgia.

 MINISTERIO DE SALUD INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	10-06-2019

eficiencia energética y energía renovable, oceanografía, estudio del espacio, estudio polar antártico, cartográfico y geografía, meteorología e hidrología, estadísticas y censos, patrimonio cultural y los demás que el Presidente de la República considere necesarios.

Todos los institutos públicos de investigación deberán contar con una estructura y regulación que permita su adecuado funcionamiento relacionado a la investigación, desarrollo tecnológico y transferencia de tecnología.

Los Institutos públicos de investigación, tendrán las siguientes atribuciones:

- 1.- Planificar, programar y ejecutar proyectos de investigación en el ámbito de su competencia;
2. Establecer relaciones con universidades y centros de investigación públicos y privados nacionales y extranjeros para el desarrollo de programas y proyectos de investigación de la materia correspondiente;
3. Contribuir al incremento sostenido de la producción y productividad del sector al que pertenecen;
4. Generar procesos de innovación, desarrollo y transferencia de tecnología;
5. Proveer servicios de laboratorio y especializados de investigación en función de las prioridades establecidas por la entidad rectora del sector. Estos servicios podrán ser onerosos; y,
6. Las demás que se establezcan en este Código, en el reglamento general que se expida para el efecto y en la normativa vigente.

SEGUNDA. OBJETIVOS.

El Presente acuerdo tiene los siguientes objetivos:

- Formalizar el vínculo entre la TESISTA e INSPI, por el cual se manifiesta que la **BQ. CLIN. CAROLINA ELIZABETH SATAN SALAZAR** se compromete a asesorar el trabajo de tesis de **DANIELA BELÉN OÑA IZA Y ANDREA REGINA AJILA ACUÑA** para la obtención del título de **BIOQUÍMICA CLÍNICA** que se realizará bajo la responsabilidad conjunta.

TERCERA. COMPROMISO DE LAS PARTES.

	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	10-06-2019

DEL INSPI


La BQ. C. CAROLINA ELIZABETH SATAN SALAZAR, ANALISTA TÉCNICO DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS tendrá las siguientes obligaciones:

- ✓ Dar un trato respetuoso y cordial al TESISTA;
- ✓ Informar al estudiante sobre los Reglamentos y Lineamientos para vinculación académica, así como de las políticas internas y demás información necesaria que tenga que conocer para desarrollar debida y plenamente las actividades que le sean asignadas;
- ✓ Especificar al tesista los reglamentos y cláusulas de laboratorio y bioseguridad para un correcto manejo.
- ✓ Aceptar la designación como Asesor, con el fin de que el Tesista pueda cumplir a cabalidad sus actividades;
- ✓ Brindar las facilidades para el correcto desempeño de la investigación del TESISTA, conforme la planificación de actividades;
- ✓ Elaborar y entregar, al finalizar la investigación:
 - Artículo científico en digital, con los lineamientos de la revista INSPIIP, en formato PDF.
 - Informe de culminación de actividades de Tesis
- ✓ Revisar y avalar el registro de las actividades del TESISTA.

DEL TESISTA

Son compromisos del TESISTA:

- ✓ Entregar el Acuerdo de Entendimiento, firmado por el asesor del INSPI, el TESISTA y el TUTOR DE LA IES.
- ✓ Enviar propuesta de investigación bajo el formato establecido en el INSPI.
- ✓ Entregar informes periódicos de avances de la investigación y un informe final;
- ✓ Comunicar de toda situación o evento que afecte el desarrollo de sus actividades a ambas instituciones.
- ✓ Entregar Artículo Científico con lineamiento de revista INSPIIP, en formato PDF.
- ✓ Una vez finalizadas las actividades, se entregará una publicación científica en digital, en la cual figurarán como autores EL TESISTA, EL TUTOR DE TESIS DE LA IES, EL ASESOR DE TESIS DEL INSPI Y EL ANALISTA DE I+D+i que la redacte.

	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	10-06-2019

✓ **Firmar Carta de Confidencialidad.**

Las partes se comprometen a establecer mecanismos para garantizar la ejecución, control, seguimiento y evaluación de los objetos descritos en este Acuerdo de Entendimiento.

CUARTA. RELACIÓN LABORAL.

El objeto de los Convenios con IES, es "establecer un marco general referencial a fin de que las partes puedan promover la colaboración en intercambio científico, la transferencia de tecnología y del conocimiento para el desarrollo de habilidades y destrezas en el campo de salud humana; la realización de investigaciones conjuntas; el intercambio de información científico-técnica y de personal especializado, procurando la complementación de acciones conjuntas en áreas de competencia de ambas partes."

Por la naturaleza de esta vinculación, no se generan derechos ni obligaciones laborales o administrativas, no se crea ningún tipo de estabilidad laboral, y se manifiesta que el "TESISTA" no es sujeto de indemnización alguna y no ingresa a la carrera de servicio público.

Los Tesistas deberán contar con un seguro de salud privado o de la Universidad, para el ejercicio de actividades a desarrollar durante el período de estancia en la Institución.

Sin embargo, aun cuando el TESISTA no mantiene ningún vínculo laboral con la institución, tiene la obligación de cumplir cabalmente con lo establecido en el Reglamento Interno Vigente del INSPI, el Código de Ética Institucional, las Políticas Internas así como debe sujetarse a las normas y políticas, incluyendo a las políticas de bioseguridad del laboratorio que lo acoge.

QUINTA. DURACIÓN.

El presente instrumento entrará en vigor a partir de la fecha de su firma y tendrá una duración de 18 meses, prorrogable cuando cuente con el justificativo, aprobado por la Máxima Autoridad, según evaluación y aprobación de ambas partes, previa evaluación de los resultados obtenidos y mediante acuerdo por escrito.

SEXTA. PROPIEDAD INTELECTUAL Y CONFIDENCIALIDAD.

Todos los datos ya sean oral, impresa, contenida en medios electrónicos o electromagnéticos, propiedad de las partes o de sus unidades, se deberán mantener en sigilo, protección y reserva, sin divulgación a terceros, y sólo serán accesibles cuando la tesis sea publicada.

	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	10-06-2019

Las partes convienen que las publicaciones, así como la difusión de los resultados derivados se realizarán de común acuerdo a los lineamientos de vinculación académica del "INSPI"

Las partes convienen de manera expresa que los trabajos que se deriven de la ejecución del presente Acuerdo de Entendimiento que sean susceptibles de protección intelectual, corresponderán a la parte cuyo personal haya realizado el trabajo objeto de protección, dándole el debido reconocimiento a quienes hayan intervenido en la realización del mismo.

En caso de trabajos generados y de los cuales no sea posible determinar el grado de participación del INSPI y el TESISTA, para titularidad de los derechos, las partes se acogerán a lo descrito en el Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, en este aspecto.

Queda expresamente entendido, que el TESISTA podrá utilizar en sus tareas académicas, los resultados obtenidos de las actividades amparadas por el presente instrumento.

SEPTIMA. AUTORÍAS:

Al preparar una publicación de cualquier índole usando los datos de estos proyectos, los investigadores involucrados se comprometen a regirse a las líneas guía del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE). Las líneas guía del ICMJE indican que la autoría se defina siguiendo las siguientes 4 condiciones (ICMJE, 2015):

1. Contribución substancial a la concepción o diseño del estudio; o la adquisición, análisis o interpretación de los datos del estudio,
2. Elaboración del borrador del manuscrito o revisión crítica del contenido intelectual del mismo,
3. Aprobación final de la versión que será publicada,
4. Estar de acuerdo con ser responsable (poder rendir cuentas) del contenido y todos los aspectos del estudio y del artículo, asegurando que cualquier pregunta o duda sobre la precisión del estudio sean investigadas y resueltas de forma apropiada.

Los autores deberán cumplir con las 4 condiciones, donde en representación del INSPI la **BQ. C. CAROLINA ELIZABETH SATAN SALAZAR** en su calidad de **ANALISTA TÉCNICA DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS** y el **ING. FERNANDO XAVIER VILLAVICENCIO ZAMBRANO, RESPONSABLE DEL CENTRO DE**

	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	10-06-2019

REFERENCIA NACIONAL DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS serán coautores de la publicación.

Otras personas que contribuyen al trabajo, como por ejemplo proveedores de reactivos esenciales o recopilación de datos, también se los podrá incluir en la autoría siempre cuando cumplan con *las 4 condiciones, previamente descritas. Personas que no cumplan con los 4 criterios deberán figurar solamente en los agradecimientos.*

OCTAVA. TERMINACIÓN.

Se dará por terminado el presente acuerdo por las siguientes causales:

- Por el cumplimiento del plazo y objeto del presente documento;
- Por mutuo acuerdo de las partes;
- Por decisión unilateral del INSPI, a razón de que el TESISTA incurra en: faltas de Conducta/ incumplimiento e inobservancia de lo establecido en los Lineamientos y Reglamentos del INSPI; realización de actividades indebidas como: hacer mal uso de los bienes de la institución, realizar actividades no acordadas, realizar actos de proselitismo político dentro de la institución, ausencia injustificada o incumplimiento del tesista;
- Por abandono de estudios, sin comunicar de forma escrita su voluntad, mientras el mencionado se encuentre realizando sus actividades.
- Por petición del Tesista

NOVENA. RESPONSABLES.

Son responsables de promover y cumplir las condiciones del presente acuerdo:

➤ **Por el INSPI :**

Nombre de la asesora: BQ. C. CAROLINA ELIZABETH SATAN SALAZAR

Cargo: ANALISTA TÉCNICO DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Dirección: Iquique N14-285 y Yaguachi, Barrio "El Dorado"

Teléfono: 02 2509625 ext. 116

E-mail: csotan@inspi.gob.ec

➤ **Por el TESISTA:**

Nombre Del Tesista: DANIELA BELÉN OÑA IZA y ANDREA REGINA AJILA ACUÑA

 INSTITUCIÓN EDUCATIVA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	10-06-2019

Facultad / Carrera: FACULTAD DE MEDICINA DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR, BIOQUÍMICA CLÍNICA.

Dirección: AV. 12 DE OCTUBRE 1076 Y ROCA

Teléfono: 0983849987

E-mail: dany_b2107@hotmail.com

DÉCIMA. COMUNICACIONES.

Para efecto de las comunicaciones que se necesiten entre las partes, se establecen las siguientes direcciones:

INSPI: Gestión Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación, Iquique N14-285 y Yaguachi, Barrio "El Dorado"

TESISTA: Ingresar solicitud por Secretaría General, dirigida al Área técnica aprobada para desarrollo de la tesis


DÉCIMA PRIMERA. CONTROVERSIAS


Por ser este un Acuerdo, las eventuales controversias o reclamaciones que pudieran surgir de la interpretación y aplicación del mismo, sus posteriores enmiendas, o cualquier cuestión no acordada relacionada con su contenido, será resuelta en forma directa y amigable por las partes, en el plazo de quince (15) días, contados a partir de la notificación de la contraparte.

De no mediar acuerdo alguno y persistir las divergencias, las partes convienen someter las controversias al procedimiento de Mediación en el Centro de Mediación de la Procuraduría General del Estado.

DÉCIMA SEGUNDA. ACEPTACIÓN

Las Partes declaran estar de acuerdo con el contenido de todas y cada una de las cláusulas materia del presente instrumento, por así convenir a sus respectivos intereses, indicando que en su celebración no existe mala fe, o cualquier otro motivo que vicie su consentimiento, por lo que las aceptan y se ratifican en cada una de ellas, y para constancia de lo estipulado firman en unidad de acto en DOS (2) ejemplares del mismo contenido, y tenor, en la Ciudad de Quito a los 07 días del mes de mayo de 2021.


 PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	10-06-2019




BQ. C. CAROLINA ELIZABETH SATAN SALAZAR, ANALISTA TÉCNICO DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS



ANDREA REGINA AJILA ACUÑA, PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR



DANIELA BELÉN OÑA IZA, PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR



MSc. JOSÉ EDUARDO VILLACIS ACUÑA, PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR