

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

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**  
**BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**TÍTULO**

“Determinación de la eficacia de Ceftazidime/Avibactam por el método de microdilución en caldo en cepas de enterobacterias y de *Pseudomonas aeruginosa* recibidas en el INSPI, año 2017”

**AUTORA**

PAMELA MONSERRATE MONCAYO CABASCANGO

**DIRECTOR**

Dr. Luis Santiago Escalante

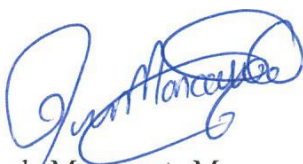
**Quito, 2018**

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **Pamela Monserrate Moncayo Cabascango**, C.I.1718688110, autora del trabajo de graduación titulado “**Determinación de la eficacia de Ceftazidime/Avibactam por el método de microdilución en caldo en cepas de enterobacterias y de *Pseudomonas aeruginosa* recibidas en el INSPI, año 2017**”, previo a la obtención del grado académico de **BIOQUÍMICA CLÍNICA** en la **FACULTAD DE MEDICINA**.

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


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



Pamela Monserrate Moncayo Cabascango  
C.I. 1718688110

## CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Bioquímica Clínica de la Srta. Pamela Monserrate Moncayo Cabascango sobre el tema **“Determinación de la eficacia de Ceftazidime/Avibactam por el método de microdilución en caldo en cepas de enterobacterias y de *Pseudomonas aeruginosa* recibidas en el INSPI, año 2017”** ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Luis Santiago Escalante Vanoni, Dr  
**Director**  
**Quito, 2018**

## DEDICATORIA

A mi familia, en especial a mis padres Diego y Alexandra

A mi hermano Dennis,

Y a mis amigos más cercanos.

Gracias por brindarme el cariño

más sincero y ser cómplices de

alcanzar mi sueño.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todas sus bendiciones derramadas en mí. A mis padres Diego y Alexandra por ser un gran ejemplo de seres humanos, llenos de valores y virtudes que me inspiran a ser mejor cada día. Muchas gracias por depositar su confianza en mí y acompañarme en cada etapa de mi vida.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, carrera de Bioquímica Clínica que me abrió sus puertas para transmitirme todos los conocimientos que con dedicación y amor me impartieron mis estimados docentes. Más que conocimientos fue formación personal, con espíritu guerrero para alcanzar lo imposible.

Al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, especialmente al área de RAM y a todo el fabuloso equipo de trabajo que lo conforma. Muchas gracias por siempre ser amables, prestos a las cosas que se necesite y sobre todo por la paciencia al transmitir sus conocimientos a los demás.

Mi eterno agradecimiento a mi director de tesis Dr. Santiago Escalante por haber estado presente en cada ciclo universitario, más que nada por la confianza y por todos los consejos, directrices y conocimientos impartidos durante este largo proceso. Gracias por el apoyo infinito.

Agradezco también de manera especial a Mtr. José Eduardo Villacís por darme la oportunidad de formar parte del equipo de trabajo del INSPI durante el desarrollo de mi tesis, fue un honor haber representado a RAM. Gracias por la confianza en mí y en mi trabajo. También a mi lector Mtr. Andrés Zabala por el interés en mi trabajo, por la paciencia y sus consejos para ser una excelente profesional.

Mi querida Vivi, muchas gracias por el tiempo que dedicaste a este proceso, fue una grata y hermosa experiencia haberla compartido contigo. Gracias por la confianza y el ánimo que siempre me dabas día a día. Somos un buen equipo. Carito y Kathita gracias por haber formado parte de esta linda etapa.

A todos mis familiares y amigos más cercanos, Dani, Andre, Saily, Chris, Gaby gracias por su amistad incondicional y por el cariño sincero desde siempre.

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** Las enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* son patógenos comúnmente relacionados con infecciones asociadas a la atención en salud, y de mayor relevancia clínica debido a la resistencia que presentan a los antibióticos. A nivel mundial, la resistencia antimicrobiana es considerada como un problema de salud pública, y como consecuencia de esta, surge Ceftazidime/avibactam (CAZ/AVI), una combinación de cefalosporina de amplio espectro más un inhibidor de betalactamasas. Este antimicrobiano inhibe betalactamasas de clases A, C, y muy pocas D. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar la actividad *in vitro* de ceftazidime/avibactam a través de la metodología de microdilución en caldo en cepas de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* recibidas en el INSPI, año 2017. **MATERIALES Y MÉTODOS:** La muestra estuvo conformada por 68 cepas de enterobacterias y 24 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* pertenecientes al Centro de Referencia Nacional de Resistencia Antimicrobiana. La metodología empleada fue la microdilución en caldo, método *Gold Standard*. La microdilución de ceftazidime/avibactam se realizó en combinación con diluciones seriadas dobladas de ceftazidime (4 a 32 µg/ml). Los métodos mCIM y eCIM detectaron y diferenciaron carbapenemasas. El perfil de susceptibilidad se obtuvo por el sistema automatizado *Vitek 2 Compact* y la caracterización molecular de genes por PCR, datos que fueron proporcionados por CRN-RAM. **RESULTADOS:** CAZ/AVI actuó de manera efectiva en 83/92 cepas, pero en las 9/92 cepas se mantuvieron resistentes debido a sus fenotipos de resistencia NDM, VIM e IMP. Con el método de mCIM se obtuvo un 53% de cepas sin carbapenemasas y un 47% con carbapenemasas, de las cuales por medio de eCIM se logró diferenciar serin carbapenemasas con 37% y metalobetalactamasas con el 10%. **CONCLUSIONES:** CAZ/AVI demostró una potente actividad *in vitro* en aislamientos clínicos de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* y devolvió la sensibilidad a CAZ en un 90,21%.

**Palabras clave:** enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, avibactam-ceftazidime, microdilución en caldo, resistencia antimicrobiana.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* are pathogens commonly related with healthcare associated infections and of clinical relevance due to the high resistance they can present to antibiotics. Globally, antimicrobial resistance is considered a public health problem and as a consequence of this, ceftazidime/avibactam (CAZ / AVI) arises as a new combination of a broad-spectrum cephalosporin plus a beta-lactamase inhibitor. This antimicrobial agent inhibits beta-lactamases of classes A, C, and very few D. Therefore, this study aimed to analyze the *in vitro* activity of ceftazidime/avibactam through the broth microdilution methodology in strains of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* received in the INSPI, year 2017.

**MATERIALS AND METHODS:** The sample consisted of sixty eight strains of *Enterobacteriaceae* and Twenty four strains of *Pseudomonas aeruginosa* belonging to the National Reference Center of Antimicrobial Resistance. The methodology used was broth microdilution which is the Gold Standard method. The microdilution of ceftazidime/avibactam was performed in combination with bent serial dilutions of ceftazidime (4 to 32 µg / ml). The mCIM and eCIM methods detected and differentiated carbapenemases. The susceptibility profile was obtained by the automated Vitek 2 Compact system. The molecular characterization of genes was made by Polymerase chain reaction and this data was provided by CRN-RAM.

**RESULTS:** The results showed that CAZ / AVI acted effectively in 83/92 strains, the other 9 strains remained resistant due to their NDM, VIM and IMP resistance phenotypes. With the mCIM method, 47% of carbapenemase-producing strains were obtained, from which, with the eCIM method, serin carbapenemase (37%) and metallobeta-lactamases (10%) were differentiated.

**CONCLUSIONS:** In conclusion, CAZ / AVI demonstrated a potent *in vitro* activity in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* and restored the CAZ sensitivity by 90.21%.

**Keywords:** *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, avibactam-ceftazidime, broth microdilution, antimicrobial resistance.

## TABLA DE CONTENIDOS

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN .....                                       | i                                    |
| CERTIFICACIÓN.....   | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |
| DEDICATORIA.....   | iii                                  |
| AGRADECIMIENTOS.....   | iv                                   |
| RESUMEN.....   | v                                    |
| ABSTRACT .....   | vi                                   |
| LISTA DE FIGURAS .....   | x                                    |
| LISTA DE TABLAS .....  | xi                                   |
| LISTA DE ANEXOS .....  | xii                                  |
| LISTA DE SIGLAS .....  | xiii                                 |
| CAPITULO I.....  | 1                                    |
| 1.1 INTRODUCCIÓN.....  | 1                                    |
| 1.1 JUSTIFICACIÓN .....  | 3                                    |
| 1.2 OBJETIVOS .....  | 4                                    |
| 1.2.1 Objetivo General.....  | 4                                    |
| 1.2.2 Objetivos Específicos .....                                      | 4                                    |
| 1.2.3 Limitaciones de Estudio .....                                    | 5                                    |
| CAPÍTULO II.....   | 6                                    |
| 2.1 ANTECEDENTES .....   | 6                                    |
| 2.2 MARCO TEÓRICO .....  | 8                                    |
| 2.2.1 Enterobacterias .....  | 8                                    |
| 2.2.2 Mecanismos de resistencia a betalactámicos.....                  | 10                                   |
| 2.2.3 Enterobacterias resistentes a Betalactámicos .....               | 11                                   |
| 2.2.4 Mecanismos de resistencia no enzimáticos .....                   | 12                                   |
| 2.2.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                              | 14                                   |
| 2.2.6 Mecanismos de resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..... | 15                                   |

|                    |  |    |
|--------------------|--|----|
| 2.2.7              | Detección de carbapenemasas en enterobacterias .....   | 16 |
| 2.2.8              | Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con determinación de la CMI                      | 18 |
| 2.2.9              | Moléculas antibióticas nuevas .....  | 20 |
| 2.3                | MARCO CONCEPTUAL .....   | 24 |
| CAPÍTULO III ..... |  | 27 |
| 3.1                | Marco Metodológico.....  | 27 |
| 3.1.1              | Tipo de estudio .....  | 27 |
| 3.1.2              | Muestra .....  | 27 |
| 3.1.3              | Criterios de inclusión.....  | 27 |
| 3.1.4              | Criterios de exclusión .....   | 27 |
| 3.2                | Operacionalización de variables .....  | 28 |
| 3.3                | Materiales, equipos y reactivos.....   | 30 |
| 3.4                | Procedimiento .....  | 31 |
| 3.4.1              | Fase I: Solicitudes, Permisos y Autorizaciones.....  | 31 |
| 3.4.2              | Fase II: Recolección de datos .....  | 31 |
| 3.4.3              | Fase III: Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana .....                                      | 32 |
| 3.4.4              | Control de Calidad.....  | 34 |
| 3.4.5              | Fase IV: Análisis de datos y resultados .....  | 35 |
| CAPITULO IV .....  |  | 36 |
| 4.1                | RESULTADOS .....   | 36 |
| 4.1.1              | Descripción general de las cepas utilizadas en el estudio .....                                | 36 |
| 4.1.2              | Susceptibilidad antibiótica.....   | 39 |
| 4.1.3              | Algoritmo de evaluación y reporte para ceftazidime/ avibactam en los aislados estudiados. .... | 43 |
| CAPITULO V .....   |  | 45 |
| 5.1                | DISCUSIÓN .....  | 45 |
| CONCLUSIONES.....  |  | 50 |

|                       |    |
|-----------------------|----|
| RECOMENDACIONES ..... | 52 |
| BIBLIOGRAFÍA .....    | 53 |
| ANEXOS .....          | 64 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Clasificación de las bombas de eflujo.....   | 13 |
| <b>Figura 2</b> Algoritmo de evaluación y reporte para ceftazidime/avibactam en los aislados estudiados ..... | 44 |

## LISTA DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1</b> Estructura antigénica .....  | 9  |
| <b>Tabla 2</b> Factores de virulencia.....  | 10 |
| <b>Tabla 3.</b> Clasificación de betalactamasas .....   | 11 |
| <b>Tabla 4.</b> Mecanismos de resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....  | 15 |
| <b>Tabla 5</b> .Operacionalización de las variables .....   | 28 |
| <b>Tabla 6.</b> Materiales, reactivos y equipo .....  | 30 |
| <b>Tabla 7.</b> Tabla de contingencia de rangos de edad vs género.....  | 36 |
| <b>Tabla 8.</b> Tipo de servicio hospitalario del que provienen las cepas de enterobacterias y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                          | 37 |
| <b>Tabla 9.</b> Tipos de muestras clínicas de las que provienen las cepas de enterobacterias y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                          | 37 |
| <b>Tabla 10.</b> Tipos de microorganismos aislados frecuentemente .....   | 38 |
| <b>Tabla 11.</b> Frecuencia de mecanismos de resistencia presentes en los microorganismos .....   | 38 |
| <b>Tabla 12</b> Clasificación de los aislados clínicos con respecto a su fenotipo y porcentaje de cada microorganismo.....                                  | 39 |
| <b>Tabla 13.</b> Relación de los mecanismos de resistencia de enterobacterias frente a la acción de ceftazidime y ceftazidime/avibactam.....                | 40 |
| <b>Tabla 14.</b> Relación de los mecanismos de resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a la acción de ceftazidime y ceftazidime/avibactam ..... | 40 |
| <b>Tabla 15.</b> Resultados de la CMI de ceftazidime y ceftazidime/avibactam de las cepas   | 41 |
| <b>Tabla 16</b> Relación de resultados de ceftazidime obtenidos por microdilución en caldo frente a Vitek. ....   | 42 |
| <b>Tabla 17.</b> Perfil de susceptibilidad de enterobacterias por Vitek .....   | 42 |
| <b>Tabla 18</b> Perfil de susceptibilidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por Vitek. ....  | 43 |
| <b>Tabla 19.</b> Frecuencia obtenida de los métodos mCIM y eCIM.....  | 43 |

## LISTA DE ANEXOS

|   |    |
|---|----|
| <b>Anexo 1.</b> Carta de aprobación del estudio- CEISH-USFQ. ....   | 65 |
| <b>Anexo 2.</b> Protocolo de preparación solución madre de Ceftazidime .....  | 67 |
| <b>Anexo 3.</b> Solución de Trabajo de Ceftazidime .....  | 68 |
| <b>Anexo 4.</b> Distribución de los micropocillos para la microdilución de Ceftazidime. ....                                | 69 |
| <b>Anexo 5.</b> Protocolo de preparación solución madre de Avibactam. ....  | 70 |
| <b>Anexo 6.</b> Solución de trabajo de CAZ/AVI .....  | 71 |
| <b>Anexo 7.</b> Distribución de los micropocillos para la microdilución de Ceftazidime-Avibactam.....                       | 72 |
| <b>Anexo 8.</b> Resultados del Control de Calidad de Agar Mueller Hinton, Nutritivo y MacConkey por parte del INSPI-G. .... | 73 |
| <b>Anexo 9.</b> Fotos de placas de microdilución de CAZ/AVI. ....   | 76 |
| <b>Anexo 10.</b> Técnica mCIM y eCIM.....   | 77 |
| <b>Anexo 11.</b> Protocolo de eliminación de desechos biológicos .....  | 78 |

## LISTA DE SIGLAS

- ATCC:** American Type Culture Collection.
- BHI:** Brain Heart Infusion.
- BLEE:** Beta Lactamasa de Espectro Extendido.
- CAZ/AVI:** Ceftazidime/Avibactam.
- CLSI:** Clinical & Laboratory Standards Institute.
- CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria.
- eCIM:** EDTA-Modified Carbapenem Inactivation Method.
- EDTA:** ácido Etilendiaminotetraacético.
- EPC:** Enterobacterias Productoras de Carbapenemasas.
- EUCAST:** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
- FDA:** Food and Drug Administration.
- GES:** Guiana Extended Spectrum.
- IAAS:** Infecciones Asociadas a la Atención en Salud.
- IMI:** Imipenem hydrolyzing beta-lactamase enzymes.
- IMP:** Imipenemase.
- ITU:** Infección al Tracto Urinario.
- KPC:** *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas.
- MALDI-TOF:** Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight.
- MBL:** Metallobetalactamasas.
- mCIM:** Modified Carbapenem Inactivation Methods
- MCR-1:** Mobile Colistin Resistance-1.
- MDR:** Multidrug Resistance.
- MH:** Mueller Hinton.
- NCCLS:** National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- NDM:** New Delhi metallo-beta-lactamase.
- NGS:** Next Generation Secuencing.
- NMC-A:** Non Metallo Carbapenemase-A.
- OMP:** Outer Membranes Proteins.
- OXA:** Oxacilines.
- PBP:** Penicilling Binding Proteins.
- PCR:** Polimerase Chain Reaction.
- PDR:** Pandrug Resistant.

**ReLAVRA:** Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos.

**RND:** Resistance Nodulation Division.

**Q-PCR:** Quantitative Polymerase Chain Reaction.

**SARM:** *Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina*.

**SASM:** *Staphylococcus aureus Sensible a Meticilina*.

**SME:** *Serratia marcescens* enzyme.

**TSB:** Tryptic Soy Broth.

**UCI:** Unidad de Cuidados Intensivos.

**VIM:** Verona integrom-encoded metallo-beta-lactamase.

**XDR:** Extremely Drug Resistant.

## CAPITULO I

### 1.1 INTRODUCCIÓN

Ceftazidime/Avibactam (CAZ/AVI) es una nueva combinación antibiótica que surge como respuesta a la urgente necesidad de combatir infecciones bacterianas que a paso rápido se están tornando resistentes a la mayor parte de antibióticos. Ceftazidime es una cefalosporina de tercera generación con actividad bactericida, que inhibe la síntesis de peptidoglicano; por otro lado, Avibactam es un inhibidor no betalactámico de betalactamasas, que actúa formando un enlace covalente con la enzima que es estable a hidrólisis. Esta combinación de antibióticos, inhibe betalactamasas de clase A, C y muy pocas D según la clasificación de Ambler, a excepción de las clase B (Livermore et al., 2018), es decir, que avibactam es el nuevo inhibidor que restaura la actividad *in vitro* de ceftazidime frente a bacterias Gram negativas especialmente a enterobacterias y bacterias no fermentadoras productoras de carbapenemasas.

CAZ/AVI es efectivo contra enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* pero no presenta actividad frente a *Acinetobacter baumannii*. Varios estudios *in vitro* realizados en los últimos años determinan que Avibactam fue creado con la finalidad de ser un inhibidor superior a los ya existentes como son: el ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam, que solo actúan frente a betalactamasas de clase A. Es por eso que se debe considerar su uso prudente y reservado, solo para pacientes que de verdad necesiten y de esta manera evitar una posible resistencia (Falcone & Paterson, 2016).

La causa de la incorporación de avibactam y ceftazidime como nueva opción terapéutica y alternativa a los carbapenems, es debido al incremento en la prevalencia de Gram negativos multidrogo resistentes, que incluyen las enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* productoras de betalactamasa y carbapenemasa, considerando que estos sean útiles en el manejo terapéutico mostrando mayor actividad frente a estos microorganismos (Stone, Newell, & Bradford, 2018). CAZ/AVI fue aprobado en Estados Unidos y en Europa como opción terapéutica en personas que presenten infecciones complejas tanto intra-abdominales como infecciones del tracto urinario (ITU) incluido pielonefritis, y que prácticamente agotaron sus terapias antibióticas. Se conoce que solo

en Europa fue aprobado el uso de CAZ/AVI en pacientes con neumonía asociada a los ventiladores mecánicos (Stone et al., 2018).

Este estudio se enfocó en enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* debido a que estos microorganismos son los más representativos a nivel hospitalario, además que son los indicados para demostrar la efectividad de CAZ/AVI, porque cuentan con diversos mecanismos de acción para combatir a los antimicrobianos.

Debido a la importancia clínica y farmacológica ceftazidime/avibactam en cepas de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*, el presente trabajo investigativo pretende responder a la siguiente pregunta: ¿Cuál es la eficacia de ceftazidime/avibactam por el método de microdilución en caldo en cepas de enterobacterias y de *Pseudomonas aeruginosa* recibidas en el INSPI, año 2017?

Se realizó esta pregunta ya que en el Ecuador no existen estudios sobre la nueva antibioticoterapia que está causando revuelo en gran parte del mundo; ya que se encuentran utilizando en especial en el continente europeo y asiático, pero que a su vez causa conmoción por el costo que tiene este tratamiento.

El nombre comercial del antibiótico es “Zavicefta”, que surge de la combinación de 2g de ceftazidime más 0,5g de avibactam. Se administra mediante perfusión intravenosa. La dosis recomendada para pacientes con Clearance de creatinina (ClCr)  $\geq 51$  mL/min, es de 2g/0,5g cada 8 horas con 2 horas de perfusión. La duración del tratamiento puede variar de 5 a 14 días, dependiendo de la afección que presente el paciente, como por ejemplo una infección complicada a las vías urinarias, el tratamiento va de 5-10 días; o si presenta una neumonía nosocomial o asociada a ventilación mecánica el tratamiento es de 7-14 días (AEMPS, 2018).

Según el estudio de Goodlet, Nailor, & Nicolau, 2016 un tratamiento para una infección intra-abdominal complicada con CAZ/AVI tiene un costo de \$1077 por día, tomando en cuenta que son mínimo 5 días de tratamiento hasta un máximo de 14 días, tendría un costo alrededor de \$15082; y eso que va a depender de la zona geográfica que se encuentre, debido a que estos valores corresponden a un tratamiento en Estados Unidos, además que se debería tomar en cuenta el servicio y estancia hospitalaria.

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

La principal manifestación fenotípica de la producción de enzimas tipo KPC es la resistencia a todos los betalactámicos y con mayor frecuencia a los aminoglucósidos y quinolonas, es decir, que cada vez se agotan las opciones terapéuticas y aumenta la importancia de frenar la diseminación de este microorganismo, evitando que este sea el agente patológico oportunista presente en las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (Paciel et al., 2011).

En enterobacterias, el mecanismo enzimático por la producción de betalactamasas, es considerado como el principal mecanismo de resistencia al presentar un perfil hidrolítico que causa un incremento en la prevalencia a nivel clínico, ya que estas generan resistencia a las cefalosporinas de tercera generación; pero durante estos años, existe una dispersión de bacterias que poseen una resistencia a todos los antibióticos betalactámicos, en especial a los carbapenémicos, este fenómeno se debe a 2 vías de dispersión: la adquisición horizontal de genes que son los encargados de la codificación de carbapenemasas y la diseminación de clones “exitosos” productores de estas enzimas (Oteo et al., 2014).

Por lo antes mencionado, la actividad carbapenemasa es considerada la más importante y versátil, siendo capaz de hidrolizar a los carbapenémicos y a otros betalactámicos. Estas enzimas se caracterizan por ser resistentes a los inhibidores de betalactamasas que se encuentren disponibles; esta actividad puede ser identificada en las enterobacterias de forma creciente sobre todo en *Klebsiella pneumoniae* con los mecanismos más poderosos e infalibles, al conferir a las bacterias una amplia resistencia que incluye a los carbapenems (Moreno, 2013).

En los últimos años, la frecuencia de infecciones causadas por bacterias multidrogo resistentes ha ido en aumento, constituyendo así una gran amenaza para la salud pública por su incremento en las tasas de morbilidad y mortalidad tras no contar con un tratamiento efectivo contra dichos microorganismos (Falcone & Paterson, 2016).

La multiresistencia es catalogada como un problema de salud en este tipo de patógenos a nivel hospitalario, lo cual incide directamente en varios factores como la morbilidad,

frecuencia, mortalidad, carga tanto económica como social que involucra al paciente, al personal y en sí al sistema de salud.

La OPS (2012) informa que en la Unión Europea existe un promedio de 1 de cada 20 pacientes hospitalizados que se encuentren infectados por bacterias que albergan a este tipo de resistencias, y se estima que 37000 fallecen por causa de IAAS asociadas a *Klebsiella pneumoniae* KPC y a otros microorganismos con un costo de atención de 4,1 millones de euros al año; por otro lado, en Canadá, se registran 8000 muertes anuales relacionadas a la misma causa y en Estados Unidos, los costos anuales de atención oscilan entre \$28,4 mil \$33,8 mil millones. En América latina, se desconoce la carga de enfermedad producida por estas infecciones, ya que solo existen datos nacionales y otros no realizan vigilancia de las IAAS.

Este estudio es de gran de importancia y trascendencia porque hasta la actualidad no se han realizado investigaciones similares con estos nuevos antibióticos en el Ecuador, ya que la mayoría de estudios son realizados en Europa, Asia y Estados Unidos. Los resultados de la determinación de la eficacia de ceftazidime/avibactam fueron parte del sustento científico necesario para disponer de información sobre los datos bacteriológicos locales en cuanto a la resistencia y potenciales esquemas terapéuticos para ser considerados.

Por otra parte, los datos obtenidos en este estudio aportaron con información para la generación de guías médicas que brinden opciones de tratamiento eficaces para este tipo de bacterias resistentes, con la esperanza que este nuevo antibiótico ayude a subsanar este gran problema de resistencia antimicrobiana.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo General**

Analizar la actividad *in vitro* de ceftazidime/avibactam a través de la metodología de microdilución en caldo en cepas de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* recibidas en el INSPI, año 2017

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Detectar carbapenemasas en cepas de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* mediante la técnica de mCIM y eCIM.

- Establecer protocolos de trabajo para microdilución en caldo de ceftazidime/avibactam en enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Establecer algoritmos de evaluación y reporte para ceftazidime/avibactam en los aislados estudiados.

### **1.2.3 Limitaciones de Estudio**

- No se pueden generalizar las conclusiones debido a que la muestra es limitada a las cepas remitidas al INSPI.
- No se tendrá una idea general de la situación de los hospitales del país debido a que aquellos que envían las muestras al INSPI son escasos.

## CAPÍTULO II

### 2.1 ANTECEDENTES

La era de oro de la antibioticoterapia inicio en el año 1940 con la introducción de la penicilina como el arsenal terapéutico contra las enfermedades infecciosas bacterianas, compuesta de un anillo betalactámico y de un anillo de tiazolidina, que iba a ser frente a los microorganismos causantes de enfermedades con un gran porcentaje de mortalidad en esa época y en la actualidad (Zasowski, Rybak, & Rybak, 2015).

Las cefalosporinas presentan cierta similitud con la estructura de las penicilinas; cuentan con un núcleo cefem que es la unión de un anillo betalactámico y de un anillo dihidrotiacínico, y sobre todo con las múltiples modificaciones en las cadenas laterales que le permite la formación de nuevos tipos de cefalosporinas. En el año de 1960, la familia de las cefalosporinas con su primera generación de antibióticos, fueron incursionadas en el ámbito clínico. Conforme fueron avanzando los años, el aumento incesante de las resistencias y el avance tanto tecnológico como molecular de diagnóstico, han permitido que la industria farmacéutica vaya creciendo a tal punto de llegar a tener una quinta generación de las cefalosporinas con un espectro mucho más amplio y además siendo útil para enfrentar nuevos microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos (Gómez, García, & Hernández, 2015).

La línea de cefalosporinas de tercera generación tuvo su lanzamiento en los años 80. Ceftazidime se ha caracterizado por combatir a Gram negativos y sobre todo a *Pseudomonas aeruginosa*. A través de los años se ha ido potenciando su relevancia clínica por su farmacodinamia y farmacocinética, visto que se ha podido combinar con diversos antibióticos e inhibidores para tener mayor efecto de acción (Zasowski et al., 2015).

En América Latina, se considera que, desde el año de 1990, la resistencia de las enterobacterias al tratamiento con antibióticos sigue en aumento debido al apareamiento y diseminación de nuevos mecanismos de resistencia, entre los más notables está el de las Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) y las carbapenemasas. La Organización Panamericana de Salud a mediados de 1990 reconoció que la resistencia a los antimicrobianos representaba un gran riesgo para la salud pública, y en respuesta implementó un programa para fortalecer la identificación de bacterias y susceptibilidad de pruebas antimicrobianas en los laboratorios clínicos (OPS, 2011). Algunos de los

mecanismos se han identificado, en este continente, siendo responsables de tasas de resistencia hasta del 40 % en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* (L. González & Cortés, 2014).

Las infecciones causadas por enterobacterias, se asocian a una alta tasa de morbimortalidad en pacientes con estancia prolongada en UCI (unidad de cuidados intensivos) y los expuestos a dispositivos invasivos (Paciel et al., 2011)

Las bacterias Gram negativas utilizan varias estrategias para el desarrollo de resistencias a este tipo de medicamentos, podemos citar una producción de enzimas inactivadoras de los antibióticos denominadas betalactamasas y entre ellas especialmente las carbapenemasas o la combinación de mutaciones estructurales y producción de betalactamasas (Márquez, Rojas, & Camacho, 2017). Las BLEE y las cefalosporinas tipo AmpC, proporcionan resistencia a los carbapenémicos cuando estos se asocian a la pérdida o a algún tipo de alteración de las porinas (encargadas de la difusión de los antibióticos a través de la membrana). También existen otros tipos de mecanismos de resistencia que son: la modificación de la permeabilidad de la membrana externa, expresión de bombas de eflujo, y una combinación de la producción de betalactamasa con la producción de PBP's modificadas con baja afinidad por el antibiótico (Paciel et al., 2011).

Por las consideraciones anteriores; en el 2015 surge una nueva opción terapéutica que es ceftazidime/avibactam (CAZ/AVI), el cual es una combinación antimicrobiana que consta de un inhibidor de betalactamasa (avibactam), y una cefalosporina de amplio espectro "ceftazidime". En ese año, CAZ/AVI fue aprobado por parte de U.S FDA (United States Food and Drug Administration) y por parte de la Agencia de Medicina Europea en el 2016, para la utilización de esta combinación en tratamiento de infecciones intra-abdominales complicadas junto con la administración de metronidazol y de infecciones urinarias complicadas incluido pielonefritis. En Europa, se siguen realizando estudios en pacientes pediátricos pero a la vez fue aprobado en la utilización para pacientes que padezcan neumonía nosocomial (Sader et al., 2018), esta combinación no es utilizada aún en América Latina.

Actualmente, las cefalosporinas son agentes de primera línea en infecciones como meningitis, gonorrea, neumonía, urinarias e intra-abdominales. Hasta el momento no existe un óptimo tratamiento antimicrobiano, ya que también depende de la susceptibilidad del aislamiento, esto obliga a optimizar el uso de antibióticos disponibles y a su vez, realizar combinaciones sinérgicas entre ellos y verificar la eficacia de las diferentes combinaciones (Paciel et al., 2011).

Existen estrategias de vigilancia de estos microorganismos resistentes a través del mundo y en América Latina se denomina ReLAVRA (Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos), de la cual Ecuador es miembro. Y por medio de esta red, se encuentra potenciando la vigilancia centinela (OPS, 2011).

## **2.2 MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1 Enterobacterias**

#### ***2.2.1.1 Características de las enterobacterias***

Constituyen un grupo exorbitante y dispar de bacterias pertenecientes al grupo de las Gram negativas. Se denominan así, debido a su localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, a pesar de que sean ubicuos encontrándose en el suelo, agua y vegetales, además de delimitarse en la flora intestinal tanto de animales como de humanos (Puerta & Rodríguez, 2010). En humanos, un mayor porcentaje se encuentra en el aparato digestivo, con una concentración tanto en el estómago hasta el intestino, además en menor proporción están localizadas en piel, uretra anterior y en vías respiratorias superiores (Merino & Losch, 2013).

Las principales características de esta familia de bacterias es la de ser aerobios no formadores de esporas que también algunos pueden ser anaerobios facultativos, reducen nitratos en nitritos, el alginato no es licuado, son fermentadores de glucosa, son oxidasa-negativos, productores de catalasa, algunos son inmóviles pero la mayoría son móviles y poseen flagelos con distribución peritrica (Puerta & Rodríguez, 2010).

#### ***2.2.1.2 Epidemiología***

Existe abundante colonización de las enterobacterias, en individuos hospitalizados, inmunodeprimidos, sobre todo en pacientes diabéticos, alcohólicos y los que reciben tratamiento antibiótico. La mayoría de aislados provienen de IAAS, estos son resistentes

a varias clases de antimicrobianos, ya que el porcentaje de BLEEs han aumentado considerablemente. El gran uso de las técnicas diagnósticas y terapéuticas agresivas, estancia hospitalaria y el uso de inmunosupresores, son factores que contribuyen al incremento de infecciones por parte de esta gran familia de enterobacterias (Puerta & Rodriguez, 2010).

### 2.2.1.3 Características microbiológicas

Microorganismos bacilares, es decir, forma de bastón, de 1-3  $\mu\text{m}$  de largo y 0,5 $\mu\text{m}$  de diámetro. Se caracterizan por una estructura multilaminar, que hace referencia o que sigue e patrón de todas las Gram negativas. Su membrana interna consta de una bicapa fosfolipídica y su membrana externa es de peptidoglucano. Y la externa compleja está compuesta de bicapa fosfolipídica incluida lipopolisacáridos, lipoproteínas, proteínas porinas multiméricas y otro tipo de proteínas. También hacia el exterior se localizan los organelos de locomoción, los flagelos y también las fimbrias y pili sexuales que provienen desde la membrana interna. Poseen plásmidos conjugativos, los cuales son útiles para el intercambio conjugativo de ADN del plásmido (Puerta & Rodriguez, 2010).

### 2.2.1.4 Estructura antigénica

En la siguiente tabla se detalla la estructura antigénica de las enterobacterias:

**Tabla 1**

*Estructura antigénica*

| <b>Antígeno O o somático</b>  | <b>Antígeno K o capsular</b>   | <b>Antígeno VI</b>  | <b>Antígeno H o flagelar</b>                       | <b>Antígeno F o fimbrial</b> |
|---|--|---|--|------------------------------|
| Se encuentra en la pared celular. Cuenta con tres fracciones: el Antígeno O, polisacárido central constante para un género determinado y el lípido A que es la endotoxina | Sólo en algunas bacterias capsuladas como <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Escherichia coli</i> | Tipo de polisacárido que envuelve a la bacteria sin llegar a ser una cápsula, característico de algunas especies de <i>Salmonella</i> | Es proteico, presente sólo en las especies móviles | Presente en las fimbrias     |

**Fuente:** (Merino & Losch, 2013) **Elaborado por:** Pamela Moncayo

### 2.2.1.5 Factores de virulencia

A continuación, los factores de virulencia más representativos de las enterobacterias serán expuestos en la **Tabla 2**.

**Tabla 2**

*Factores de virulencia*

| <b>Cápsula</b>                                 | <b>Fimbrias</b>  | <b>Producción de exoenzimas</b>                                  | <b>Exotoxinas</b>  |
|--|--|--|--|
| Propiedades de adhesina y es anti fagocitaria. | Permiten la adherencia a la célula huésped e impiden el barrido por las barreras mecánicas de defensa del organismo. | Por ejemplo, de ureasa, gelatinasa, lipasa, desoxirribonucleasa. | Sólo son producidas por las patógenas obligadas y poseen efectos específicos |

**Fuente:** (Merino & Losch, 2013) **Elaborado por:** Pamela Moncayo

### 2.2.2 Mecanismos de resistencia a betalactámicos

En microorganismos Gram negativos, especialmente en enterobacterias la resistencia a betalactámicos esta mediada por betalactamasas, a pesar de que existen otros mecanismos que cooperan para un mayor nivel de resistencia. Existen varios tipos de enzimas pertenecientes a esta familia que son clínicamente relevantes pero los siguientes a mencionar son los principales: betalactamasas de espectro extendido (BLEE), las cromosómicas o AmpC mediadas por plásmidos (AmpCs) y las carbapenemasas (Martínez & González, 2014).

Las penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos son los componentes principales de la familia de betalactámicos. Su mecanismo de acción se centra en la síntesis de la pared bacteriana, al realizar interferencia con la síntesis de peptidoglicano mediante un bloqueo en la transpeptidación, pero a su vez activa la autolisina endógena de la bacteria para que el peptidoglicano sea destruido por la acción de esta. Se les considera bactericidas parciales, debido a que solo actúan en fase de crecimiento celular.

Conforme el descubrimiento e incorporación de nuevos antibióticos, la resistencia ante estos ha emergido como un gran problema de salud pública, lo que ha obligado a tener mayor control en cuanto al uso adecuado de estos.

A nivel salud, la resistencia a los antibióticos se convierte en un reto y una necesidad para la contención de este problema. Es por eso, que cada día surgen nuevas investigaciones microbiológicas y moleculares que aportan con nuevas bases científicas para entender sobre los mecanismos que están aplicando los microorganismos para su defensa.

### 2.2.3 Enterobacterias resistentes a Betalactámicos

El mecanismo más común empleado por las Gram negativas, es la hidrólisis de betalactámicos por medio de enzimas Betalactamasas. La detección de estas enzimas tendrá un impacto clínico al momento de seleccionar el tratamiento para el paciente, ya que los betalactámicos son la primera elección en múltiples infecciones.

**Tabla 3.**  
*Clasificación de betalactamasas*

| Ambler                    | Bush-Jacoby | Substrato   | Inhibido por |      | Enzimas importantes   | Epidemiología   |
|---------------------------|-------------|---|--------------|------|---|---|
|                           |             |   | AC           | EDTA |   |   |
| A<br>serin carbapenemasas | 2a          | Penicilinas   | SI           | NO   | PC1 de <i>S.aureus</i>                                      |   |
|                           | 2b          | Penicilinas, cefalosporinas de 1 <sup>ra</sup> generación                   | SI           | NO   | TEM-1, TEM-2, SHV-1   |   |
|                           | 2be         | Penicilinas, cefalosporinas de 1 <sup>ra</sup> y 2 <sup>da</sup> generación | SI           | NO   | SHV-2 a SHV-6, TEM-3 a TEM-26, CTX-Ms, BEL-1, VERB-1, PER-1 | Diseminación a nivel mundial: Estados Unidos, Italia, Grecia, China, Israel, etc.                           |
|                           | 2br         | Penicilinas   | NO           | NO   | TEM-30, SHV-72, SHV-19                                      | También se reportan casos de IAAS alrededor del mundo.  |
|                           | 2c          | Penicilinas, carbenicilina  | SI           | NO   | PSE-1   |   |
|                           | 2e          | Cefalosporinas de espectro extendido  | SI           | NO   | FEC-1, CepA   |   |
|                           | 2f          | Penicilinas, cefalosporinas y carbapenems                                   | Variable     | NO   | KPC-2, SME-1, NMC-A   | Frecuentes brotes de IAAS a nivel mundial, especialmente en Estados Unidos, Sudamérica, Italia, Grecia, etc |

|   |     |   |          |    |  |   |
|---|-----|---|----------|----|--|---|
| <b>B</b><br><b>Metalobetalactamasas</b> | 3   | Mayoría de betalactamasas incluido carbapenemasas | NO       | SI | IMP-1, VIM-1, NDM-1, CcrA and BcII, CphA, L1 | Diseminación mundial especialmente el medio Oriente, India, Italia, Grecia. |
| <b>C</b><br><b>Cefalosporinasas</b>     | 1   | Cefalosporinas                                    | NO       | NO | AmpC, CMY-2, ACT-1                           | Diseminación mundial causantes de IAAS.                                     |
| <b>D</b><br><b>Oxacilinasas</b>         | 2d  | Penicilinas, cloxacilina                          | Variable | NO | OXA-1, OXA-10                                | Diseminación mundial especialmente en el medio oriente,                     |
|   | 2de | Cefalosporinas de espectro extendido              | Variable | NO | OXA-11, OXA-15                               | países mediterráneos, continente africano.                                  |
|   | 2df | Carbapenems                                       | Variable | NO | OXA-23, OXA-48                               | IAAS.   |

**Fuente:** (Wilson & Török, 2018; Bassetti, Pecori & Peghin, 2016) **Elaborado por:**

*Pamela Moncayo*

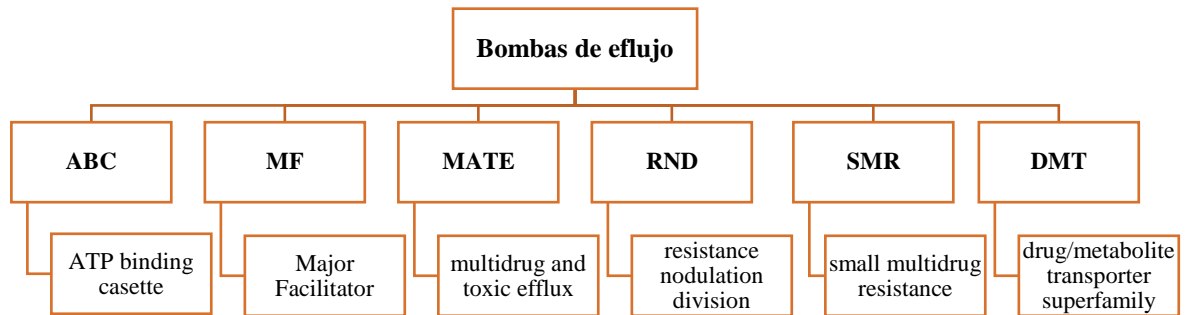
## 2.2.4 Mecanismos de resistencia no enzimáticos

### 2.2.4.1 Bombas de eflujo

También conocidas como bombas de expulsión, es una estructura presente en la membrana externa de la célula, que utiliza el mecanismo de cotransporte iónico como sustrato energético para cumplir con su función que se centra en la expulsión de metabolitos, detergentes, solventes orgánicos y antibióticos (Tafur, Villegas, & Torres, 2008).

Este sistema de eflujo bacteriano, es un mecanismo común de la resistencia intrínseca a los antimicrobianos, son fundamentales para la fisiología de algunas especies de Gram negativas, que utilizan para la formación de biopelículas (Weston, Sharma, Ricci, & Piddock, 2017).

Se clasifican en 6 familias:



**Figura 1.** Clasificación de las bombas de eflujo

**Fuente:** (Tafur et al., 2008)

**Elaborado por:** Pamela Moncayo

La familia RND es la que presenta mayor impacto clínico, debido a que reconocen a varios sustratos y se asocian a la resistencia de múltiples fármacos. El subtipo mejor caracterizado de esta familia es el AcrAB-TolC, presente en *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Klebsiella pneumoniae*. Otro subtipo homólogo a la anteriormente mencionada son MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexXY-OprM presentes en *Pseudomonas spp.*, se encarga de la expulsión de varios antibióticos pero en especial de los aminoglucósidos, no tiene acción contra las cefalosporinas de tercera generación (Alibert et al., 2016; Weston et al., 2017).

#### 2.2.4.2 Pérdida de porinas

Las porinas son estructuras proteínicas (OMPs) de la membrana externa de los gramnegativos, que forman canales para la penetración inespecífica de compuestos hidrófilos, es decir, que permiten el paso retardado de los antibióticos hidrofílicos al espacio periplasmático o también algunos serán transportados al citoplasma (Tafur et al., 2008).

La porina OmpF en *Escherichia coli*, está involucrada en la permeabilidad de tetraciclinas, betalactámicos y cloranfenicol, y la OmpD en *Pseudomonas aeruginosa* absorbe carbapenémicos (Schwarz, Loeffler, & Kadlec, 2017). La pérdida de porinas genera varios problemas como la manifestación de mecanismos de resistencia, la sobreexpresión de bombas de eflujo y aumento en la CIM del antibiótico (Tafur et al., 2008).

### **2.2.4.3 Alteración en el sitio de acción**

En la mayoría de casos existe una reducción de la afinidad del receptor por la molécula del antimicrobiano. El mecanismo de acción de las quinolonas es interferir en la síntesis de ADN, provocando muerte bacteriana por medio de la fragmentación cromosómica. Estas son capaces de penetrar la pared, inhibiendo la replicación bacteriana al tener contacto con la ADN girasa (codificada por el gen *gyrA* y *gyrB*) y la topoisomerasa IV (codificado por el gen *parC* y *parE*), estos son fundamentales en el enrollamiento del ADN (Álvarez, Garza, & Vázquez, 2015).

Se sabe que una única mutación en el gen *gyrA* provoca resistencia a ácido nalidíxico (Jiménez, Tijerino, & Vargas, 2011), tanto el gen *gyrA* como el *parC* son los más afectados. La función de los genes encontrados en plásmidos: *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*, es bloquear la acción de la Ciprofloxacina sobre las enzimas de enrollamiento del ADN (Tafur et al., 2008).

### **2.2.5 *Pseudomonas aeruginosa***

Bacilo Gram negativo perteneciente a la familia de la *Pseudomonaceae*, se caracteriza por tener forma de bastón muy fino, con una longitud de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de largo y aproximadamente 0,5- 1,0  $\mu\text{m}$ , presenta motilidad gracias a un flagelo polar (INSHT, 2017). Es un patógeno oportunista aerobio, pero existen ocasiones que puede desarrollarse en ambientes anaerobios debido al nitrato. Positivo para catalasa y oxidasa. Tienen la capacidad de producir pigmentos como la pioverdina, piocianina y piorrubina. Su temperatura óptima de crecimiento es a 37°C, pero puede resistir temperaturas entre 45-50 °C.

Microorganismo que muestra una alta prevalencia en IAAS, se le clasifica dentro de las bacterias multirresistentes ya que presenta varias resistencias intrínsecas debido a la baja permeabilidad de su membrana externa y a la facilidad de adquirirlas por mutación. Esta resistencia que presenta *Pseudomonas aeruginosa* a los betalactámicos es causada principalmente por producción de betalactamasa cromosómica, plasmídicas, alteraciones de la permeabilidad como la pérdida de la porina OrpD, y de bombas de expulsión como MexAB-OprM (Vila & Marco, 2010).

La mayoría presenta AmpC que corresponde a la clase C cromosómica de Ambler, pero además de esta, producen otro tipo de betalactamasas que repercuten en la actividad de los betalactámicos. Todo esto reduce de manera notable las opciones terapéuticas frente a las infecciones ocasionadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Vila & Marco, 2010).

## 2.2.6 Mecanismos de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* dentro de su género, es la más importante en patología humana debido a que es oportunista y principal causante de infecciones asociadas a la atención de la salud (Fariñas & Martínez, 2013). Este microorganismo sobrevive en ambientes y temperaturas de nivel clínico, presenta una alta morbimortalidad en pacientes hospitalizados, de unidad de cuidados intensivos y sobre todo en inmunosuprimidos, en especial los oncológicos y con fibrosis quística (Nicolau & Oliver, 2010).

Esta bacteria no fermentadora posee un alto nivel de resistencia intrínseca a los antibióticos como por ejemplo: cefalosporinas 1<sup>ra</sup>, 2<sup>da</sup> y 3<sup>ra</sup> generación, a casi todas las penicilinas, tetraciclinas, cotrimoxazol y rifampicina. Esta resistencia basal se debe a la permeabilidad de su membrana externa que comparado a las enterobacterias es menor, también a los mecanismos no enzimáticos como las bombas de eflujo, entre otros; y mecanismos enzimáticos. Tiene la capacidad de adquirir nuevas resistencias por transferencia horizontal, esto va a contribuir con la aparición y diseminación de cepas MDR (Nicolau & Oliver, 2010).

**Tabla 4.**

*Mecanismos de resistencia de Pseudomonas aeruginosa*

| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                 |   |   |
|---|---|---|
| Mecanismo de resistencia                                      | Mecanismo   | Fenotipo resistente   |
| <b>Disminución de la permeabilidad de la membrana externa</b> | Mutación porinas OprD, OprF, OprB                                       | Carbapenems, aminoglucósidos y quinolonas                                   |
| <b>Sistemas de expulsión activa</b>                           | MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM                          | Cefalosporinas, carbapenems, ureidopenicilinas, aminoglucósidos, quinolonas |
| <b>Modificación de la diana del antibiótico</b>               | Mutación DNA girasa y DNA topoisomerasa genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i> | Quinolonas  |
| <b>Modificación enzimática</b>                                | Clase A   | TEM, SHV, PER, GES y VEB<br>GES-2   |
|   | Clase B   | VIM, IMP, SPM y GIM   |
|   | Clase C   | AmpC basal, desrepresión parcial y total                                    |
|   | Clase D   | Oxacilinas OXA-1, OXA-31  |

|                              |  |   |
|------------------------------|--|---|
|                              |  | OXA-11, OXA-14, OXA-15, OXA-19, OXA-32 (espectro extendido) |
| <b>Modificación 30s rRNA</b> | Fosforiltransferasas, adeniltransferasas y nucleotidiltransferasas | Aminoglucósidos   |
| <b>Modificación 16s rRNA</b> | Metilasas RmtA y RmtD  | Aminoglucósidos   |

**Fuente:** (Pestaña & Pozo, 2018) **Elaborado por:** Pamela Moncayo

La hiperproducción de la betalactamasa AmpC cromosómica, es codificada por el gen ampC controlada por AmpR, estos genes tienen la capacidad de producir niveles bajos de AmpC pero ante la presencia de imipenem o ceftazidima, su nivel de producción incrementa (Luján, 2014).

### 2.2.7 Detección de carbapenemasas en enterobacterias

Para la detección de carbapenemasas en enterobacterias se debe tomar en cuenta: el perfil hidrolítico de sus clases y enzimas, el análisis minucioso del antibiograma realizado tomando en cuenta la sensibilidad a todos los betalactámicos, además de la implementación de métodos fenotípicos de cribado, inhibición de actividad enzimática, epidemiología local y pruebas moleculares para determinar qué tipo de carbapenemasa posee el microorganismo a analizar (Cercenado, 2015).

El meropenem es el carbapenémico que posee mayor estabilidad y concordancia entre sensibilidad y especificidad en la detección de EPC (Bou, Chaves, Palomo, & Oteo, 2015), por eso se recomienda su uso en lugar de imipenem y ertapenem que tiene alta sensibilidad pero baja especificidad sobre todo en *Enterobacter spp.* por la inestabilidad que tiene frente a betalactamasas de espectro extendido y AmpC (Cercenado, 2015).

En enterobacterias se utilizan los siguientes inhibidores para la diferenciación del tipo de carbapenemasa, como por ejemplo: la inhibición con ácido fenilborónico corresponde a la clase A; la sensibilidad al aztreonam confirmado con una sinergia ocurrida entre ceftazidima + EDTA o algún carbapenémico + EDTA (Navarro et al., 2011) y la inhibición al ácido dipicolínico o EDTA corresponden a la clase B, la inhibición al ácido fenilborónico y cloxacilina corresponde a AmpC, y si no ocurre inhibición con los mencionados anteriormente corresponde a la clase D (Cercenado, 2015).

Las KPC son resistentes a aztreonam, inhibidas por ácido borónico pero no por EDTA, la sinergia confirmatoria de KPC se puede demostrar entre el ácido borónico o de preferencia ácido fenilborónico con una cefalosporina de amplio espectro como cefepime y como sustrato a meropenem. Para las de tipo OXA se recomienda confirmar por métodos moleculares ya que aún no han sido creados inhibidores específicos para la clase D (Navarro et al., 2011).

El Carba NP es un test rápido, que detecta colorimétricamente la hidrólisis del Imipenem, existiendo un cambio de pH alterando los colores de rojo a amarillo confirmando la producción de carbapenemasa (Cercenado, 2015). Se utiliza también el método de aproximación de discos pero lo fundamental en esta técnica es colocar a la distancia correcta el carbapenémico con el inhibidor, en especial en las cepas con baja expresión de carbapenemasa. Para evitar este problema, se ha creado discos o tiras en caso de E-test que poseen el inhibidor y el carbapenémico en una sola (Navarro et al., 2011).

También existen los medios cromogénicos que tienen como ventaja la detección de EPC directamente de muestras clínicas pero su desventaja es que para BLEE solo detectan clase A y B pero no las OXA-48, además que pueden dar falsos positivos ya que en ellos crecen microorganismos productores de BLEE. El CHROMagar KPC es específico para carbapenemasas y posee una alta sensibilidad y especificidad para detectar enzimas VIM y KPC (Navarro et al., 2011).

La detección de carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* es diferente a las enterobacterias, por sus resistencias intrínsecas determinadas por la producción de AmpC, su bomba de eflujo MexAB-OprM, los problemas de permeabilidad de su membrana externa y por su resistencia a los carbapenems. La primera sospecha de carbapenemasas son los halos  $\leq 21$ mm en imipenem y meropenem. Si existe sinergia entre Imipenem y/o Meropenem con EDTA se considera MBL pero el hallazgo se debe confirmar con técnicas moleculares para saber a qué tipo de MBL corresponde. En otro caso, si se observa sinergia entre ceftazidime y meropenem se considera que es del tipo GES (SADEBAC, 2014)

Pero tanto para enterobacterias como para *Pseudomonas aeruginosa* existen métodos moleculares como las técnicas de PCR, PCR multiplex, Q-PCR y microarrays de ADN que presentan mayor porcentaje de sensibilidad y especificidad que los métodos

anteriormente mencionados. La PCR multiplex es una técnica muy práctica para la vigilancia activa de genes que codifican carbapenemasas en enterobacterias. Por otro lado, existe una técnica denominada Next Generation Sequencing (NGS) que sirve para el diagnóstico de infecciones y realiza una búsqueda exhaustiva de genes que sean resistentes a los antibióticos (Martínez & Aguirre, 2016). Por último como otra opción se tiene a la espectrometría de masas MALDI-TOF que es un método directo de identificación enfocado en el análisis espectrofotométrico de la degradación de una molécula carbapenémica (Pena, 2016).

## **2.2.8 Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con determinación de la CMI**

Existen varias pruebas de sensibilidad en el laboratorio que son utilizadas para la determinación *in vitro* de la susceptibilidad de los microorganismos frente a agentes antimicrobianos. Estos métodos se clasifican en: métodos de difusión, métodos de dilución (microdilución y macrodilución).

### **2.2.8.1 Método de difusión en agar**

#### **2.2.8.1.1 Difusión de Disco**

Conocido también como método Kirby-Bauer o antibiograma disco-placa, es el encargado de definir la actividad *in vitro* de un antibiótico ante un microorganismo detectado, evidenciando así la capacidad que tiene el antimicrobiano para inhibir el crecimiento del microorganismo. Este método está recomendado por National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para la determinación de sensibilidad microbiana (García et al., 2000).

Su fundamento consiste en la relación entre la concentración necesaria de la sustancia para poder inhibir una determinada cepa bacteriana y su halo de inhibición de crecimiento en la superficie del medio de cultivo adecuado, en este caso Mueller Hinton (MH), que debe cumplir con las especificaciones normadas por el CLSI como por ejemplo condiciones físicas (temperatura), químicas (pH, iones y cationes) y sobre todo la esterilización de las cajas petri en las que serán envasadas.

Se debe sembrar de manera homogénea, inoculando el microorganismo en la placa de agar y sobre esta colocar un disco de papel filtro con un diámetro de 6mm, que se encuentra previamente impregnada una concentración conocida del antibiótico requerido

(Cavalieri et al., 2005). Posterior a esto, se debe incubar por 24 horas a una temperatura que oscila entre 35-37 °C, durante este paso, el antibiótico tiene la capacidad de difundir radialmente desde el disco hacia el agar.

Al final, se realiza la lectura del diámetro del área inhibida por el antibiótico y se procede a la determinación cualitativa categórica de sensible, intermedio o resistente de acuerdo a las tablas publicadas por los organismos responsables como el CLSI, EUCAST o FDA. La actividad *in vitro* de la sustancia es representada por la lectura de los resultados de los halos obtenidos (Ramirez & Castaño, 2009).

#### 2.2.8.1.2 Epsilon test (E-test)

Es un método cuantitativo de difusión en agar, que en general se traduce en una especie de tira plástica que tiene impregnada el gradiente de concentración creciente del agente antimicrobiano ubicado de un extremo a otro. Al colocar las Etest sobre el Mueller Hinton inoculado previamente, el antimicrobiano se difundirá en todo el medio (Pena, 2016).

El procedimiento es el mismo que el método de Kirby-Bauer, pero a diferencia de los discos de papel filtro se utilizará la tira plástica del antimicrobiano que se requiera. Después de la incubación se observará una zona de inhibición elipsoidal y la lectura se realiza desde el punto del extremo de inhibición de la elipse formada al punto de unión con la tira (Pena, 2016).

#### 2.2.8.2 Métodos de dilución

Los métodos de dilución son empleados en la cuantificación *in vitro* de los antimicrobianos que busca determinar el crecimiento de la bacteria en diluciones crecientes del antibiótico obteniendo la CMI del antimicrobiano (Malbrán, 2012) definiéndose como CMI a la concentración más baja de sustancia que puede llegar a inhibir después de una incubación de 24 horas, el crecimiento visible del microorganismo en estudio.

La técnica de macrodilución es utilizada con volúmenes grandes, es decir, de un volumen final al menos de 1000 µL. Esta técnica se la realiza en tubos estériles de vidrio (13x100mm); y la técnica de microdilución utiliza valores pequeños con un volumen final de 100 µL, esta se realiza en microplacas de poli-estireno que consta de 96 pocillos (12x8).

El caldo de preferencia tanto por sus propiedades y condiciones requeridas es el Mueller Hinton, utilizado para pruebas de susceptibilidad de microorganismos aeróbicos y/o facultativos de rápido crecimiento; debe cumplir con ciertas especificaciones claves para su elaboración como es un número apropiado de iones y cationes, su pH que debe oscilar entre 7,2 - 7,4 y temperatura ambiente (Cavalieri et al., 2005).

La lectura se realiza al observar a simple vista la menor concentración de antimicrobiano encontrado en tubos o en microplacas, comparando con el control positivo. Los resultados se deben interpretar en la Guía M100 del CLSI 2018, que consta de tablas con los criterios para cada punto de corte que guíaran en la interpretación y reporte de los resultados obtenidos (Cavalieri et al., 2005). Se considera que la CMI es el Gold Standard frente al resto de métodos, debido a que confirman inusitadas resistencias y sobre todo da respuestas definitivas (Ramirez & Castaño, 2009).

### **2.2.9 Moléculas antibióticas nuevas**

En los últimos años, la resistencia antimicrobiana representa un grave problema mundial en salud pública debido a la existencia de una alta prevalencia de microorganismos MDR, XDR y PDR, especialmente en Gram negativos causando elevadas tasas de morbilidad y mortalidad (Sader, Farrell, Castanheira, Flamm, & Jones, 2014; Alatoon et al., 2017). Los organismos de salud se han visto alarmados por esta situación y vieron la necesidad de crear y aprobar nuevos antibióticos específicos para contrarrestar este problema. Es por eso que a finales del 2014 e inicios del 2015 la FDA aprueba nuevos antibióticos.

#### **2.2.9.1 Cefotolozano/tazobactam**

El 19 de diciembre del 2014, la FDA aprobó el nuevo antibiótico denominado Zerbaxa (Merck&Co.), compuesto de cefotolozano que es una cefalosporina de tercera generación, adicionado un inhibidor de betalactamasa conocido como tazobactam(Alatoon et al., 2017).

Cefotolozano tiene una fuerte actividad y estabilidad frente a *Pseudomonas aeruginosa*, y el tazobactam actúa como inhibidor contra las clases A y C, protegiendo al cefotolozano de sufrir hidrólisis. Este antibiótico fue diseñado para combatir infecciones intra-abdominales complicadas, infecciones del tracto urinario complejas incluyendo

pielonefritis e infecciones asociadas a ventilación mecánica (Sader, Farrell, Castanheira, Flamm, & Jones, 2014; Alatoom et al., 2017).

La actividad *in vitro* de ceftolozano/tazobactam es frente a enterobacterias productoras de BLEE, a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Bacteroides fragilis* (bacteria anaerobia), a *Streptococcus spp.* (microorganismos Gram positivos); con excepción de KPC, MBL y con actividad variable contra las AmpC (Solomkin et al., 2015; Alatoom et al., 2017).

Zerbaxa (1g/0,5g) equivalente a 1 gramo de ceftolozano (sulfato de ceftolozano) y 0,5 gramos de tazobactam (tazobactam sódico), su presentación es en polvo para concentrado y se administra por perfusión intravenosa, su dosis recomendada es cada 8 horas debido a que la vida útil de ceftolozano es de 2.14 horas, es por eso que se recomienda 3 dosis en un día. Este tratamiento dura dependiendo del lugar y gravedad de la infección, que van desde los 4 a 14 días. Es recomendado para pacientes mayores de 18 años que padezcan de las infecciones mencionadas anteriormente.

#### **2.2.9.2 Ceftobiprole**

Es una cefalosporina de quinta generación por su amplio espectro de actividad, que fue aprobada como monoterapia para neumonía tanto adquirida en el hospital como en la comunidad, en la Unión Europea (UE) (Syed, 2015). Su sustancia inactiva o profármaco se denomina ceftobiprole medocaril sódico y su conversión en sustancia activa se realiza mediante esterasas plasmáticas inespecíficas (IQB, 2015). En la industria farmacéutica es conocido como Zevtera o Mabelio (Syed, 2015).

Este agente antimicrobiano exhibe un amplio espectro de actividad contra SARM con unión a la PBP2a (*Staphylococcus aureus*); *Enterococcus* sensibles a ampicilina con unión a PBP5 (*Enterococcus faecalis*); *Streptococcus* resistentes a la penicilina con unión a la PBP2x (*Streptococcus pneumoniae*) (IQB, 2015; Scheeren, 2015) y a enterobacterias en especial a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* pero que no produzcan BLEEs. Su dosis recomendada es de 500mg por infusión intravenosa que dura alrededor de 2 horas y se debe administrar cada 8 horas (Scheeren, 2015)

### 2.2.9.3 *Ceftazidime/avibactam*

#### - **Ceftazidime**

Las cefalosporinas son una gran familia de agentes antimicrobianos betalactámicos que presentan un amplio espectro de acción. Estos antibióticos se caracterizan por una estructura especial denominada anillo betalactámico, que este al ser bactericida, va a inhibir todas las fases finales de la síntesis del peptidoglicano, es decir, que actúan en la última etapa de síntesis de la pared celular bacteriana induciendo a un efecto autolítico. En el espacio que existe entre la membrana citoplasmática y la pared de peptidoglicano, existen proteínas con actividad enzimática como lo son las carboxipeptidasas y transpeptidasas que cumplen una función específica que es la formación de tetrapéptidos unidos; estas proteínas son las fijadoras de penicilina y otro tipo de betalactámicos, las cuales se conocen como PBPs (Penicillin Binding Protein), en español, proteínas fijadoras de penicilina.

En la producción de betalactamasa que es una enzima encargada del rompimiento del anillo betalactámico, provocará que el antibiótico sea incapaz de unirse a las PBPs, cerrando las vías vulnerables de división bacteriana, causando un efecto natural que es la presión hiperosmótica intrabacteriana, y por lo tanto finaliza con la muerte de la bacteria (Harrison & Bratcher, 2014).

Esta familia de antibióticos se encuentra dividida por generaciones, entre las cuales las primeras generaciones tienen un amplio espectro y actividad frente a Gram positivas y las de última generación, presentan amplio espectro y actividad frente a Gram negativas.

La primera generación es más activa a cocos Gram positivos, incluyendo SASM (*Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina) y Estreptococos, pero no presenta actividad frente a Enterococos, Listeria y a SARM (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina). La segunda generación o también conocida como espectro extendido, presentan una baja actividad frente a SASM, pero son más efectivas en Gram negativos como *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*. La tercera generación o de amplio espectro, tiene mayor actividad en Gram negativos, sobre todo frente a la mayoría de la familia *Enterobacteriaceae*; la característica principal es que son muy resistentes a la acción de las betalactamasas de espectro extendido. Por último, la cuarta generación cuenta con una mayor actividad en Gram positivos al igual que Gram negativos

productores de betalactamasas plasmídicas clásicas, presentan una estabilidad frente a las productoras de betalactamasas de espectro extendido (Rodríguez, Tolón, & López, 2013).

En estudios e investigaciones realizadas, se presenta cefalosporinas de quinta generación presentando un espectro extendido para Gram positivas que sean multirresistentes (Rodríguez et al., 2013). Ceftazidime es una cefalosporina de tercera generación, bactericida, que inhibe la síntesis de la pared celular porque posee una elevada afinidad por las PBPs que facilitará la penetración en dicha estructura bacteriana.

Este antibiótico se destaca entre todos los de tercera generación por tener gran actividad frente a las especies de *Pseudomonas*, en especial a *Pseudomonas aeruginosa* (Shirley, 2018) y también frente a enterobacterias. Además, posee actividad tanto para Gram positivos como Gram negativos y presenta una amplia resistencia a la mayor parte de betalactamasas, incluyendo las de *Pseudomonas*. Se recomienda para tratamiento de infecciones producidas por Gram negativos, en especial por enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*. Su administración es exclusivamente por vía parenteral (CECMED, 2017).

#### - **Avibactam**

Avibactam conocido inicialmente como NXL104 o como AVE1330A (Pozzi et al., 2018). Se caracteriza por ser un inhibidor de betalactamasa capaz de actuar en contra de la resistencia de la proliferación antimicrobiana, por su notable inhibición con las PBPs y serin betalactamasas, también por ser un derivado de diazabicyclo octano, que le permite ser una molécula más estable (Kumar & Nair, 2016).

Se le considera un inhibidor de amplio espectro ya que se encarga de inhibir las carbapenemasas (KPC-2, KPC-3), TEM-1, CTX-M-15 de clase A; betalactamasas de espectro extendido (BLEE); también las enzimas codificadas por plásmidos de clase C cromosómica (Amp-C); las OXA 48 y OXA-10 que corresponden a la clase D, a excepción de las metalobetalactamasas del grupo B, todas estas de la clasificación de Ambler; contando con la capacidad de restaurar la susceptibilidad a la Ceftazidime de microorganismos con fenotipo denominado MDR/XDR (multidrug resistant/ extensively drug resistant) (Pozzi et al., 2018), es decir, que protege a Ceftazidime de la degradación causada por las serin betalactamasas.

Para este estudio se ha decidido utilizar la metodología de microdilución en caldo de CAZ/AVI, utilizadas para evaluar la actividad *in vitro* de distintas concentraciones y en combinaciones (solo ceftazidime, ceftazidime + avibactam) en un tiempo fijo, con la finalidad de determinar la sinergia antibiótica, es decir, medir la potencia de la combinación de los distintos antibióticos en comparación con sus actividades individuales. Esta metodología se utiliza para combinar una cefalosporina de tercera generación (ceftazidime) + un inhibidor de betalactamasa (avibactam) entre sí, observando si avibactam inhibe a ceftazidime, y así reportar si son sensibles o resistentes, con la ayuda del CLSI M100 28<sup>va</sup> Edición, tabla 2A de Diámetro y Punto de corte para enterobacterias y tabla 2B-1 para *Pseudomonas aeruginosa*.

### 2.3 MARCO CONCEPTUAL

**Antagonismo:** término utilizado en farmacodinamia, cuando el efecto combinado de 2 fármacos es inferior al de cada uno administrado por separado. Existen 4 tipos: el antagonismo funcional, bioquímico, clínico y farmacológico (IESIT, 2013).

**Betalactamasas:** enzimas bacterianas capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo betalactámico de las penicilinas, cefalosporinas y otros antimicrobianos betalactámicos, dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana (Ardanuy, Cercenado, Cantón, & Torres, 2011).

**Betalactámicos:** familia de antibióticos bactericidas que su mecanismo de acción radica en la inhibición de la pared celular del microorganismo. Los betalactámicos pertenecen a la familia más numerosa y utilizada en la práctica clínica. Poseen una baja toxicidad y un amplio margen terapéutico (Marín & Gudiol, 2003).

El anillo betalactámico define químicamente a estos antibióticos, formando parte de la estructura de varias familias de antibióticos; consiste en un anillo heterocíclico de cuatro átomos, tres de carbono y uno de nitrógeno y según la naturaleza de los radicales se diferencian las distintas moléculas, siendo las cadenas laterales complementarias las más relacionadas con su actividad antimicrobiana, farmacocinética y toxicidad. Su mecanismo de acción consiste la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, interfiriendo en la síntesis del peptidoglicano mediante un bloqueo en la última etapa de su producción

(transpeptidación) pero también actúan activando la autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano (Gómez et al., 2015).

**Carbapenemasas:** representan la familia de betalactamasas más versátil, con un amplio espectro. La mayoría de estas enzimas reconocen e hidrolizan a casi todos los betalactámicos y son resistentes a la acción de los inhibidores de los betalactámicos (Pena, 2016).

**IAAS:** infección Asociada a la Atención en Salud que son contraídas por un paciente en el hospital durante su estancia en dicha casa de salud, que no tenía en el momento de su ingreso. Pueden afectar a cualquier tipo de paciente e inclusive puede contraer al momento de dar el alta. Son el evento adverso más frecuente durante la estancia sanitaria (OMS, 2015).

**ITU:** la infección del tracto urinario (ITU) consiste en la colonización y multiplicación microbiana, habitualmente bacteriana, a lo largo del trayecto del tracto urinario. Se denomina pielonefritis si afecta al riñón y la pelvis renal, cistitis si implica a la vejiga, uretritis si afecta a la uretra y prostatitis si la infección se localiza en la próstata (González, 2016).

**Microbiología de las heridas:** el medio de cultivo propicio para una gran proliferación y colonización de microorganismos es el grado de exposición del tejido subcutáneo, que va a depender de las características de la lesión que presente, es decir, el tipo de herida, grado de perfusión sanguínea, profundidad, localización, inmunidad, y además de los factores propios de los agentes microbianos, como la carga bacteriana y también los factores de virulencia de los mismos (Burillo, Moreno, & Salas, 2010).

**Neumonía Adquirida en la Comunidad:** afección aguda del parénquima pulmonar que afecta a pacientes no hospitalizados y que se caracteriza por la aparición de fiebre y/o síntomas respiratorios, junto con la presencia de infiltrados pulmonares en la radiografía de tórax (Méndez, García, Baquero, & Marín, 2010).

**Plásmidos:** son moléculas de ADN extra cromosómico, a manera de círculo cerrado, replicándose de forma independiente del cromosoma bacteriano. Su origen es reconocido por la maquinaria replicativa de cada bacteria (UNAM, 2014). Además de portar información génica para muchas funciones no esenciales para las células en condiciones normales de su crecimiento (Betancor, Gadea, & Flores, 2005).

**Sinergismo:** el concepto se emplea en farmacodinamia, cuando el efecto de 2 o más fármacos que son administrados a la par, es igual o superior al de cada uno administrado separadamente. Existen dos tipos de sinergismo, el de suma y el de potenciación (IESIT, 2013).

**Transposones:** segmentos de ADN que poseen información indispensable para la transposición, también tienen genes extra, que pueden codificar para distintas propiedades fenotípicas, entre las más importantes, la resistencia a antimicrobianos (Betancor et al., 2005).

## CAPÍTULO III

### 3.1 Marco Metodológico

#### 3.1.1 Tipo de estudio

El estudio fue de tipo descriptivo y transversal utilizando aislados de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* caracterizados por el Centro de Referencia Nacional de Resistencia Antimicrobiana (CRN-RAM), INSPI. Descriptivo porque es un estudio que determinó la eficacia de Ceftazidime/Avibactam en cepas de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* a través de microdilución en caldo; y fue transversal porque se realizó en un periodo determinado.

#### 3.1.2 Muestra

Muestreo por conveniencia, es decir, que se seleccionó directa e intencionalmente a los individuos de la población que conformaron la muestra. Se analizaron 92 cepas resultantes positivas para enterobacterias o *Pseudomonas aeruginosa* enviados a CRN-RAM, INSPI en el año 2017.

#### 3.1.3 Criterios de inclusión

Se tomaron en cuenta a las muestras que cumplan con los siguientes criterios:

- Cepas que cuenten con los siguientes datos epidemiológicos: edad, genero, tipo de muestra, año de recepción de la muestra, localización hospitalaria de la muestra, tipo de microorganismo y su fenotipo molecular, datos Vitek.
- Cepas previamente identificadas y caracterizadas por Biología Molecular como enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Cepas receptadas en el periodo comprendido del año 2017.
- Cepas que correspondan a diagnóstico de afección respiratoria, gastrointestinal, urinarias, líquidos estériles, abscesos y secreción de heridas causadas por enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 3.1.4 Criterios de exclusión

- Aislamientos bacterianos de otros géneros y especies, no correspondientes a enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Cepas fuera del periodo requerido para el estudio.
- Cepas de muestras provenientes de heces, hisopados rectales y secreción rectal.

### 3.2 Operacionalización de variables

**Tabla 5.**

*Operacionalización de las variables*

| Objetivos  | Variables   | Categorías                            | Tipo de variables | Escala de medición | Definición Operacional   | Metodología, Técnica o Instrumento   |
|--|---|---------------------------------------|-------------------|--------------------|--|--|
| <b>Detectar carbapenemasas en cepas de enterobacterias y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mediante la técnica de mCIM y eCIM.</b> | Carbapenemasas en enterobacterias y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Presencia<br>Ausencia                 | Cualitativa       | Nominal            | Las carbapenemasas son beta-lactamasas que hidrolizan las penicilinas, en la mayoría de los casos también a las cefalosporinas y, en varios grados, a las carbapenemas. En definitiva, pueden conferir resistencia a todos los beta-lactámicos, con la excepción del aztreonam, que no se hidroliza por las metalo-betalactamasas. Presentes en la mayoría de enterobacterias y en <i>Pseudomonas spp.</i> en especial <i>aeruginosa</i> . | Método: Técnica mCIM y Ecim, basándose en las normas de funcionamiento de pruebas de susceptibilidad para los antimicrobianos M100-ED28:2018 del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). |
|  | Técnica de mCIM   | Positivo<br>Negativo<br>Indeterminado | Cualitativa       | Nominal            | Método modificado de inactivación del carbapenémico (mCIM) es utilizado para la detección de carbapenémicos en enterobacterias y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .   | Basarse en las normas de funcionamiento de pruebas de susceptibilidad para los antimicrobianos M100-ED28:2018 del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI).                                |

|   |  |   |              |          |  |   |
|---|--|---|--------------|----------|--|---|
|   | Técnica de eCIM  | Positivo<br>Negativo<br>Indeterminado                       |              | Nominal  | Método modificado de inactivación del carbapenémico – EDTA (eCIM) utilizado junto al mCIM para diferenciar metalobetalactamasas de serin-carbapenemasas en Enterobacterias. El eCIM se reporta siempre y cuando el mCIM de positivo. | Basarse en las normas de funcionamiento de pruebas de susceptibilidad para los antimicrobianos M100-ED28:2018 del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI).   |
| <b>Establecer protocolos de trabajo para microdilución en caldo de Ceftazidime / Avibactam en enterobacterias y <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> | Microdilución en caldo en enterobacterias<br><br><i>Microdilución en caldo <i>Pseudomonas aeruginosa</i></i> | Sensible<br>Intermedio<br>Resistente<br>Concentración ug/mL | Cuantitativa | Continua | Técnica basada en la cuantificación <i>in vitro</i> del crecimiento de la bacteria expuesta a diluciones crecientes del antibiótico llegándose a conocer su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).                                  | Microdiluciones a diferentes concentraciones de CAZ/AVI utilizando cepas del INSPI, año 2017 de enterobacterias y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> basándose en las normas de funcionamiento de pruebas de susceptibilidad para los antimicrobianos M100-ED28:2018 del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). |

**Fuente:** Investigación **Elaborado por:** Pamela Moncayo

### 3.3 Materiales, equipos y reactivos

Los materiales, equipos y reactivos empleados en este estudio se describen en la siguiente tabla.

**Tabla 6.**  
*Materiales, Reactivos y Equipo*

| Bioseguridad y Reactivos  | Técnica  | Equipos                                     |
|---|--|---|
| Agar MacConkey  | Asas plásticas descartables doble lado de 1µl y 10µl                               | Autoclave                                   |
| Agar Mueller Hinton   | Cajas Mono-petri y Bi-petri plásticas diámetro 90mm*15mm                           | Balanza analítica                           |
| Agar Nutritivo  | CLSI M100-ED28:2018 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing | Cabina de bioseguridad                      |
| Antibióticos: Cefotaxime hidratado Lot: 067M4806V y Avibactam G312379 | Espejo invertido   | Cabina de bioseguridad                      |
| Bicarbonato de sodio solución saturada                                | Frascos de vidrio de 50, 100 y 500mL   | Estufa                                      |
| Caldo BHI   | Gradillas  | Incubadora de 37°C                          |
| Caldo BHI + Glicerol  | Hisopos estériles  | Pipetas automáticas de diferentes volúmenes |
| Caldo Mueller Hinton-Catión ajustado LOT: 6258541                     | Matraz Erlenmeyer de vidrio de 200, 400, 500 y 800mL                               | Refrigeradora-congeladora                   |
| Discos de difusión de Meropenem                                       | Microplaca de 96 pocillos immunoGrade PS Estándar 330 µl 100 pl                    | Turbidímetro                                |
| Gorros quirúrgicos  | Microtubos plásticos de 1.5mL  | Vórtex                                      |
| Guantes de nitrilo  | Palillos estériles   |   |
| Guantes de nitrilo  | Parafilm   |   |
| Mandiles desechables  | Pinzas metálicas   |   |
| Mascarillas protectoras   | Probetas de vidrio de 25, 100 y 1000mL   |   |
| Solución salina al 0.9%   | Puntas plásticas para pipetas automáticas de múltiples volúmenes.                  |   |
| Tripticasa de soya  | Tubos de plástico 12 x 75 mm.  |   |
| Zapatones   | Tubos de vidrio de 5 y 10mL  |   |

**Fuente:** *Investigación Elaborado por: Pamela Moncayo*

### **3.4 Procedimiento**

#### **3.4.1 Fase I: Solicitudes, Permisos y Autorizaciones**

##### **3.4.1.1 Solicitud al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI)**

Para empezar con la presente investigación, se requirió enviar una solicitud llenando una ficha metodológica proporcionada por el INSPI, con los datos requeridos del estudio para la aprobación de la realización de la parte práctica en el área del Centro de Referencia Nacional de Resistencia Antimicrobiana (CRN-RAM). Al obtener la aprobación de la ficha técnica, se enviaron los documentos necesarios para entablar un acuerdo de entendimiento entre la investigadora y el INSPI.

##### **3.4.1.2 Solicitud al Comité de Ética de la Universidad San Francisco de Quito**

Para garantizar el cumplimiento de las normas bioéticas en esta investigación, se recurrió al Comité de Ética de la Universidad San Francisco de Quito que es parte de la nómina actualizada de Comités de Ética aprobados por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Se llenaron y enviaron los formularios solicitados por este comité.

##### **3.4.1.3 Autorizaciones**

Una vez enviado toda la documentación, se esperó por las correcciones y sugerencias pertinentes por parte de las dos instituciones, y al finalizar con todo se obtuvo las autorizaciones:

**Anexo 1.** Acuerdo de entendimiento INSPI

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

#### **3.4.2 Fase II: Recolección de datos**

A partir de la base de datos del WHONET, por medio de los criterios de inclusión y exclusión fueron seleccionadas las cepas, y con ello se procedió a la elaboración de una base de datos en Microsoft Excel. Una vez lista la base de datos, se acudió al cepario de CRN-RAM a buscar los viales correspondientes. Estos fueron sembrados utilizando la técnica de aislamiento por agotamiento por estría en dos tipos de medios, en Agar Nutritivo Oxoid y en Agar selectivo MacConkey Lactosa Oxoid, a 37°C por 24 horas en aerobiosis.

Se realizó una resiembra en Agar MacConkey Lactosa Oxoid a las cepas con crecimiento mixto, con el fin de obtener colonias puras pertenecientes a los microorganismos por estudiar.

### **3.4.3 Fase III: Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana**

#### ***3.4.3.1 Método de microdilución en caldo para Ceftazidime***

Esta técnica fue aplicada bajo los preceptos dispuestos por el CLSI (2018) en la Guía MO7-11<sup>ED</sup>. El primer paso fue la preparación de una solución madre del antibiótico liofilizado, en este caso de Ceftazidime, a una concentración de 1280 µg/mL. En este cálculo se consideraron los datos del antibiótico como la pureza, potencia, fracción activa y porcentaje de agua **Anexo 3**.

Para reconstituir Ceftazidime se utilizó Bicarbonato de Sodio solución saturada. Adicional, la solución madre es fundamental para la preparación de la solución de trabajo que se realizó a una concentración de 128 µg/mL para poder emplear las 8 diluciones propuestas previamente; y fueron elaboradas con Caldo Mueller Hinton- Cation ajustado de acuerdo a las siguientes concentraciones de dilución: 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 y 2 µg/mL **Anexo 4**.

Como siguiente paso se preparó una solución 0.5 McFarland, utilizando solución salina al 0.9% adicionando las colonias aisladas de los medios obtenidos, sin dejar pasar más de 15 minutos para su empleo. Después de este paso, se hizo una dilución 1:100 de la solución McFarland. Al momento de tener listo ambas diluciones tanto la del antibiótico (A) como la bacteriana (B), con la ayuda de una pipeta automática se absorbió 50 µL de la dilución A y se pipeteó en los pocillos correspondientes según el diseño propuesto de las microplacas en el estudio, de la misma manera con la dilución B, obteniendo 100µL como volumen final. Se identificó cada microplaca y se incubó en condición aeróbica a 37°C por 24 horas.

Para la lectura de las microplacas se utilizó un espejo invertido para observar la turbidez en cada pocillo y la guía M100 del CLSI para analizar e interpretar los puntos de corte correspondiente a cada bacteria y antibiótico. Cada resultado fue recogido en plantillas realizadas por la investigadora, donde se detalla la codificación de cada microplaca, fecha de realización y disposición de cada muestra con su correspondiente dilución **Anexo 5**.

#### ***3.4.3.2 Método de microdilución en caldo para CAZ/AVI***

Tras la finalización y obtención de resultados de la microdilución en caldo de Ceftazidime en todas las 92 cepas del estudio, se procedió con la segunda microdilución que corresponde a Ceftazidime/Avibactam. La solución madre preparada fue a una concentración de 160 µg/ml considerando en el cálculo los datos del antibiótico mencionados anteriormente **Anexo 6**. La

concentración que se utilizó fue de 4 µg/ml de Avibactam en combinación con diluciones seriadas dobladas de Ceftazidime que van de 4 a 32 µg/ml **Anexo 7**.

Luego de que se prepararon las diluciones de los antibióticos, se siguió el mismo procedimiento que la microdilución inicial. Los resultados fueron anotados en plantillas diseñadas por la investigadora, correspondiente a CAZ/AVI **Anexo 5**.

#### **3.4.3.3 Método de mCIM y eCIM**

Métodos utilizados para la detección de carbapenemasas en enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*. Ambos métodos fueron aplicados en todas las cepas del estudio, como pruebas fenotípicas confirmatorias de enzimas tipo serin carbapenemasa y metalobetalactamasas.

##### **- mCIM**

Para la realización de mCIM se utilizó 1000µL de caldo TBS dispensados en un microtubo de 1.5mL, y a través de asas calibradas se agregó 1µL para enterobacterias o 10µL *Pseudomonas aeruginosa*, después se colocó en el vórtex por 15 segundos e inmediatamente el disco de Meropenem fue dispensado en cada preparación, esto se incubó por 4 horas a 37°C. Al finalizar el tiempo de incubación, el disco de Meropenem fue bien escurrido y colocado sobre el agar Mueller Hinton previamente inoculado con la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, por último esto fue incubado de 18-24 horas a 37 °C y reportado según las normas CLSI (2018). Los resultados fueron almacenados en la base de datos de la investigadora.

##### **- eCIM**

Este método es realizado conjuntamente con mCIM para diferenciar metalobetalactamasas de serin carbapenemasas. En eCIM se añadió 20µL de EDTA a cada 1000µL de caldo TSB, y se siguió el mismo procedimiento que mCIM. Los resultados fueron reportados según las normas CLSI (2018) y almacenados en la base de datos de la investigadora.

#### **3.4.3.4 Sistema automatizado Vitek 2**

Los datos del sistema automatizado *Vitek 2 Compact* de todas las cepas, fueron tomados de la base de datos de CRN-RAM. Las tarjetas codificadas como AST-N272 se utilizaron para obtener la CMI de Imipenem, Meropenem, Ertapenem, Ceftazidime, Ceftriaxona, Cefepime,

Ciprofloxacina, Gentamicina, Amikacina y Colistín de todas las cepas correspondientes al estudio.

### **3.4.3.5 Análisis molecular**

Los datos moleculares de cada cepa fueron tomados de la base de datos de CRN-RAM. Estos datos fueron obtenidos mediante la técnica de PCR para la identificación de genes de resistencia en enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a betalactámicos y Polimixinas. Los genes utilizados fueron: BLEE, GES, MBL, Serin carbapenemasa, MCR.

## **3.4.4 Control de Calidad**

### **3.4.4.1 Agar Nutritivo y Agar MacConkey**

Estos medios de cultivo fueron elaborados bajo las normas dictadas por el CLSI M100-ED28-2018 y a su vez, se mandaron tres cajas representativas de cada agar preparado, al área de control de calidad del INSPI-GUAYAQUIL, para su aprobación y obtención de un certificado **Anexo 9**.

### **3.4.4.2 Agar Mueller Hinton**

El control de calidad del agar Mueller Hinton fue elaborado bajo los criterios establecidos por la Guía M100 del CLSI 2018. Este agar se empleó para la confirmación de carbapenemasas de acuerdo al método de mCIM y eCIM **Anexo 9**.

### **3.4.4.3 Control de calidad del método de microdilución en caldo**

#### *3.4.4.3.1 Control de calidad del inóculo bacteriano*

Se realizó un control de calidad al inóculo bacteriano como parte de la microdilución para obtener resultados fiables. Una solución 0.5 McFarland de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 y de esta solución se realizó una dilución 1:1000; en agar Nutritivo se inóculo 100 µL de esta dilución que fue incubada a 37°C de 16-24 horas. La lectura se realizó con un conteo  $\leq 50$  colonias para comprobar que el inóculo sea el adecuado.

#### *3.4.4.3.2 Cepas ATCC utilizadas para el control de calidad*

Las cepas ATCC necesarias para el control de calidad de microdilución en caldo tanto para Ceftazidime como para Ceftazidime/Avibactam fueron las siguientes: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* 700603 y una cepa caracterizada en CRN-RAM de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa de tipo

NDM (considerada resistente genotípicamente a Ceftazidime/Avibactam). Estas cepas fueron parte de cada microplaca utilizadas conjuntamente con las cepas de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 3.4.4.3.3 Control de crecimiento del medio

En cada microplaca se destinó un pocillo para colocar 100 µL del medio utilizado para cada una de las cepas a analizar. El objetivo fue evidenciar si el medio está en buen estado o si se encuentra contaminado.

#### 3.4.4.4 Control de calidad de la técnica de mCIM y eCIM

Para mCIM y eCIM fueron empleadas las mismas cepas ATCC utilizadas en el control de calidad de microdilución en caldo, es decir, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* 700603 y una cepa caracterizada en CRN-RAM de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa de tipo NDM (considerada resistente genotípicamente a Ceftazidime/Avibactam).

### 3.4.5 Fase IV: Análisis de datos y resultados

#### 3.4.5.1 Análisis de datos

El manejo y tabulación de datos fue realizado en plantillas de Microsoft Excel 2013, partiendo de una base de datos con información obtenida del WHONET y del área de RAM. Por medio de Excel se obtuvo gráficos de frecuencia.

Se empleó estadística descriptiva para el análisis de datos apoyada en el programa IBM SPSS con la creación de tablas de contingencia, frecuencias y la prueba de *Chi cuadrado* que determinó la relación entre las variables nominales del estudio.

## CAPITULO IV

### 4.1 RESULTADOS

#### 4.1.1 Descripción general de las cepas utilizadas en el estudio

Se utilizó 92 cepas pertenecientes a CRN-RAM del INSPI-Q del periodo 2017, que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión propuestos en este estudio. Todas las cepas fueron aisladas de muestras invasivas procedentes de diversas casas de salud e identificadas molecularmente según sea el caso por medio de la técnica de PCR. Estas cepas fueron preservadas a una temperatura de -70°C en BHI + Glicerol.

De las cepas aisladas y analizadas, se demostró un predominio del género masculino con un 56,5% (n=52/92), en edades comprendidas entre los 0 a 93 años, con el rango de edad de mayor frecuencia de 51 a 75 años con el 34,8% (n=32/92), como se detalla en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.**

*Tabla de contingencia de Rangos de edad vs Género*

|        |           | Rangos de edad |            |            |           |       |
|--------|-----------|----------------|------------|------------|-----------|-------|
|        |           | 0-25 años      | 26-50 años | 51-75 años | > 76 años | Total |
| Género | Femenino  | 12 %           | 7,6%       | 17,4%      | 6,5%      | 43,5% |
|        | Masculino | 20%            | 16,3%      | 17,4%      | 3,3%      | 56,5% |
| Total  |           | 32%            | 23,9%      | 34,8%      | 9,8%      | 100%  |

**Fuente:** *Investigación Elaborado por: Pamela Moncayo*

En cuanto al servicio hospitalario, UCI encabeza la lista con un 39,13% (n=36/92), sucesivo del servicio quirúrgico 25% (n=23/92), como se describe en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.**

*Tipo de servicio hospitalario del que provienen las cepas de enterobacterias y Pseudomonas aeruginosa.*

|                              |                                | <b>Frecuencia</b> | <b>Porcentaje</b> |
|------------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Servicio Hospitalario</b> | UCI                            | 36                | 39,1%             |
|                              | Quirúrgicas                    | 23                | 25%               |
|                              | Clínica                        | 18                | 19,6%             |
|                              | Emergencia                     | 7                 | 7,6%              |
|                              | Consulta externa y ambulatorio | 6                 | 6,5%              |
|                              | Pediatría                      | 2                 | 2,2%              |
|                              | <b>Total</b>                   | <b>92</b>         | <b>100%</b>       |

**Fuente:** Investigación **Elaborado por:** Pamela Moncayo

La **Tabla 9** indica los tipos de muestras que fueron empleados en el estudio, de las cuales se distinguen los aislados de origen respiratorio, al contar con el mayor porcentaje de 26,1%, (n=24/92), y dentro de esta categoría secreción traqueal es la predominante.

**Tabla 9.**

*Tipos de muestras clínicas de las que provienen las cepas de enterobacterias y Pseudomonas aeruginosa.*

|                        |              | <b>Frecuencia</b> | <b>Porcentaje</b> |
|------------------------|--------------|-------------------|-------------------|
| <b>Tipo de Muestra</b> | Respiratorio | 24                | 26,1%             |
|                        | Sangre       | 23                | 25%               |
|                        | Orina        | 16                | 17,4%             |
|                        | Secreciones  | 10                | 10,9%             |
|                        | Heridas      | 10                | 10,9%             |
|                        | Líquidos     | 9                 | 9,8%              |
|                        | <b>Total</b> | <b>92</b>         | <b>100%</b>       |

**Fuente:** Investigación **Elaborado por:** Pamela Moncayo

Los datos que se representan en la **Tabla 10**, indican el porcentaje de los microorganismos más prevalentes en el estudio, determinando que *Klebsiella pneumoniae* fue dominante al presentar un 43,5%, (n=40/92), seguido de *Pseudomonas aeruginosa* (Pae) 26,1% (n=24/92),

**Tabla 10.**  
*Tipos de microorganismos aislados más frecuentes.*

|                        | <b>Frecuencia</b>                 | <b>Porcentaje</b> |       |
|------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------|
| <b>Microorganismos</b> | <i>Klebsiella pneumoniae</i>      | 40                | 43,5% |
|                        | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | 24                | 26,1% |
|                        | <i>Enterobacter cloacae</i>       | 7                 | 7,6%  |
|                        | <i>Klebsiella aerogenes</i>       | 6                 | 6,5%  |
|                        | <i>Escherichia coli</i>           | 3                 | 3,3%  |
|                        | <i>Klebsiella oxytoca</i>         | 3                 | 3,3%  |
|                        | <i>Morganella morganii</i>        | 3                 | 3,3%  |
|                        | <i>Proteus mirabilis</i>          | 2                 | 2,2%  |
|                        | <i>Serratia marcescens</i>        | 2                 | 2,2%  |
|                        | <i>Providencia rettgeri</i>       | 1                 | 1,1%  |
|                        | <i>Raoultella ornithinolytica</i> | 1                 | 1,1%  |
| <b>Total</b>           | <b>92</b>                         | <b>100%</b>       |       |

**Fuente:** Investigación **Elaborado por:** Pamela Moncayo

En cuanto a los mecanismos de resistencia, se destaca con un 39,1% (n=36/92) a los microorganismos carentes de genes, consecutivamente se ubican los serin carbapenemasas con 37% (n=34/92), como se explica en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.**  
*Frecuencia de mecanismos de resistencia presentes en los microorganismos*

|                                  | <b>Frecuencia</b>   | <b>Porcentaje</b> |             |
|----------------------------------|---------------------|-------------------|-------------|
| <b>Mecanismos de Resistencia</b> | Sin genes           | 36                | 39,1%       |
|                                  | Serin carbapenemasa | 34                | 37%         |
|                                  | MBL                 | 9                 | 9,8%        |
|                                  | GES                 | 7                 | 7,6%        |
|                                  | BLEE                | 4                 | 4,6%        |
|                                  | MCR                 | 2                 | 2,2%        |
|                                  | <b>Total</b>        | <b>92</b>         | <b>100%</b> |

**Fuente:** Investigación **Elaborado por:** Pamela Moncayo

Y en cuanto a la descripción de la **Tabla 12**, se analiza detalladamente la distribución de los mecanismos de resistencia por grupo de especie, percatándose que KPC ocupa el primer lugar con 35% (n=32/92).

**Tabla 12.**

*Clasificación de los aislados clínicos con respecto a su fenotipo y porcentaje de cada microorganismo.*

|                           | Carbapenemasas |     |       |     |     | No Carbapenemasas |      |      |       |                 | Otras | Total |
|---------------------------|----------------|-----|-------|-----|-----|-------------------|------|------|-------|-----------------|-------|-------|
|                           | KPC            | GES | OXA48 | NDM | VIM | IMP               | AmpC | BLEE | MCR-1 | Impermeabilidad | WT    |       |
| <i>K. pneumoniae</i>      | 26             |     | 1     | 1   |     | 1                 |      | 5    |       | 1               | 5     | 43,5% |
| <i>P. aeruginosa</i>      |                | 7   |       |     | 7   |                   |      |      |       | 10              |       | 26,1% |
| <i>E. cloacae</i>         |                |     |       |     |     |                   | 1    | 1    |       | 3               | 2     | 7,6%  |
| <i>K. aerogenes</i>       | 4              |     |       |     |     |                   |      |      |       | 1               | 1     | 6,5%  |
| <i>E.coli</i>             |                |     |       |     |     |                   |      | 1    | 2     |                 |       | 3,3%  |
| <i>K. oxytoca</i>         | 2              |     |       |     |     |                   |      |      |       | 1               |       | 3,3%  |
| <i>M.morganii</i>         |                |     |       |     |     |                   |      |      |       |                 | 3     | 3,3%  |
| <i>P.mirabilis</i>        |                |     |       |     |     |                   |      |      |       |                 | 2     | 2,2%  |
| <i>S.marscencens</i>      |                |     |       |     |     | 1                 |      |      |       | 1               |       | 2,2%  |
| <i>P. rettgeri</i>        |                |     |       |     |     |                   |      |      |       |                 | 1     | 1,1%  |
| <i>R. ornithinolytica</i> |                | 1   |       |     |     |                   |      |      |       |                 |       | 1,1%  |
| <b>Total</b>              | 35%            | 8%  | 2%    | 1%  | 8%  | 1%                | 2%   | 8%   | 2%    | 18%             | 15%   | 100%  |

**Fuente:** Investigación **Elaborado por:** Pamela Moncayo

#### 4.1.2 Susceptibilidad antibiótica

##### 4.1.2.1 Relación del mecanismo de resistencia de las enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* frente a la acción de Ceftazidime y Ceftazidime/Avibactam.

De la técnica empleada para conocer la CMI de ceftazidime y ceftazidime/avibactam de cada una de las 92 cepas en estudio, se comprobó que existe una relación significativa entre el fenotipo de los microorganismos con el espectro de acción de los antibióticos, a través de la prueba estadística de *Chi cuadrado con un valor  $p=0,000$* , como lo indica la **Tabla 13**.

**Tabla 13.**

Relación de los mecanismos de resistencia de enterobacterias frente a la acción de ceftazidime y ceftazidime/avibactam.

| Enterobacterias          |                     | CAZ      |            | CAZ/AVI  |            |
|--------------------------|---------------------|----------|------------|----------|------------|
|                          |                     | Sensible | Resistente | Sensible | Resistente |
| Mecanismo de Resistencia | Sin genes           | 71,4%    | 23,4%      | 39,4%    | 0,0%       |
|                          | BLEE                | 4,8%     | 6,4%       | 6,1%     | 0,0%       |
|                          | MBL                 | 0,0%     | 4,3%       | 0,0%     | 100%       |
|                          | Serin Carbapenemasa | 23,8%    | 61,7%      | 51,5%    | 0,0%       |
|                          | MCR                 | 0,0%     | 4,3%       | 3,0%     | 0,0%       |
| <b>Valor p</b>           |                     | 0,005    |            | 0,000    |            |

**Fuente:** Investigación **Elaborado por:** Pamela Moncayo

La **Tabla 14** señala la relación significativa entre los mecanismos de resistencia presentes en *Pseudomonas aeruginosa* frente a CAZ y CAZ/AVI. Al igual que los datos de las enterobacterias, existe una resistencia del 100% a CAZ/AVI por parte de MBL.

**Tabla 14.**

Relación de los mecanismos de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* frente a la acción de ceftazidime y ceftazidime/avibactam.

| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |           | CAZ      |            |            | CAZ/AVI  |            |
|-------------------------------|-----------|----------|------------|------------|----------|------------|
|                               |           | Sensible | Intermedio | Resistente | Sensible | Resistente |
| Mecanismos de Resistencia     | Sin genes | 100%     | 40%        | 15,4%      | 58,8%    | 0,0%       |
|                               | GES       | 0,0%     | 20%        | 46,2%      | 41,2%    | 0,0%       |
|                               | MBL       | 0,0%     | 40%        | 38,5%      | 0,0%     | 100%       |
| <b>Valor p</b>                |           | 0,014    |            |            | 0,000    |            |

**Fuente:** Investigación **Elaborado por:** Pamela Moncayo

A continuación, en la **Tabla 15** se especifica los resultados obtenidos de CAZ y CAZ/AVI, correspondiente a cada fenotipo.

**Tabla 15.**

*Resultados de la CMI de ceftazidime y ceftazidime/avibactam de las cepas.*

| Enzima                   | Ceftazidime |           | <4 | 4 | 8 | 16 | 32 | >32 |
|--------------------------|-------------|-----------|----|---|---|----|----|-----|
|                          | ±           | Avibactam |    |   |   |    |    |     |
| <b>Carbapenemasas</b>    |             |           |    |   |   |    |    |     |
| KPC (32)                 | CAZ         |           |    |   | 2 | 1  | 1  | 28  |
|                          | CAZ/AVI     |           | 32 |   |   |    |    |     |
| GES (7)                  | CAZ         |           |    |   |   |    |    | 7   |
|                          | CAZ/AVI     |           | 7  |   |   |    |    |     |
| OXA 48 (2)               | CAZ         |           | 2  |   |   |    |    |     |
|                          | CAZ/AVI     |           | 2  |   |   |    |    |     |
| NDM (1)                  | CAZ         |           |    |   |   |    |    | 1   |
|                          | CAZ/AVI     |           |    |   |   |    |    | 1   |
| VIM (7)                  | CAZ         |           |    |   |   |    | 1  | 6   |
|                          | CAZ/AVI     |           |    |   |   |    | 3  | 4   |
| IMP (1)                  | CAZ         |           |    |   |   |    |    | 1   |
|                          | CAZ/AVI     |           |    |   |   |    |    | 1   |
| <b>No Carbapenemasas</b> |             |           |    |   |   |    |    |     |
| AmpC (2)                 | CAZ         |           | 1  |   |   |    |    | 1   |
|                          | CAZ/AVI     |           | 2  |   |   |    |    |     |
| BLEE (7)                 | CAZ         |           | 2  |   |   | 1  | 1  | 3   |
|                          | CAZ/AVI     |           | 7  |   |   |    |    |     |
| MCR-1 (2)                | CAZ         |           |    |   |   | 1  | 1  |     |
|                          | CAZ/AVI     |           | 2  |   |   |    |    |     |
| <b>Otros</b>             |             |           |    |   |   |    |    |     |
| Impermeabilidad (17)     | CAZ         |           | 1  | 1 |   | 5  | 1  | 9   |
|                          | CAZ/AVI     |           | 17 |   |   |    |    |     |
| WT (14)                  | CAZ         |           | 13 |   |   | 1  |    |     |
|                          | CAZ/AVI     |           | 14 |   |   |    |    |     |

**Fuente:** Investigación **Elaborado por:** Pamela Moncayo

#### 4.1.2.2 Método automatizado Vitek 2 Compact

Previo al resultado del perfil de susceptibilidad antibiótica por Vitek de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*, los resultados logrados de CAZ a través de la microdilución en caldo fueron relacionados con los alcanzados por el método automatizado Vitek. La prueba de *Chi cuadrado* determinó que si existe una relación significativa con un valor  $p=0,000$ , como se visualiza en la siguiente tabla.

**Tabla 16.***Relación de resultados de ceftazidime obtenidos por microdilución en caldo frente a Vitek.*

|                   |            | Ceftazidime (CAZ) |            |       |
|-------------------|------------|-------------------|------------|-------|
|                   |            | CAZ VITEK         |            |       |
| CAZ Microdilución |            | Sensible          | Resistente | Total |
|                   | Sensible   | 85,7%             | 0%         | 26,5% |
|                   | Resistente | 14,3%             | 100%       | 73,5% |
|                   | Total      | 100%              | 100%       | 100%  |

Valor p= **0,000****Fuente:** Investigación **Elaborado por:** Pamela Moncayo

De las 68 cepas de enterobacterias, el 76,5% presenta resistencia a ceftriaxona continuo de ceftazidime 69,1%. Por otro lado, poseen una alta sensibilidad a colistín 66,2%, como lo indica la **Tabla 17**.

**Tabla 17.***Perfil de susceptibilidad de enterobacterias por Vitek.*

| Enterobacterias |          |            |            |       |
|-----------------|----------|------------|------------|-------|
| Antibióticos    | Sensible | Intermedio | Resistente | Total |
| IMP             | 38,9%    | 5,9%       | 55,9%      | 100%  |
| MEM             | 44,1%    | 1,5%       | 54,4%      |       |
| ERT             | 30,9%    | 4,4%       | 64,7%      |       |
| CAZ             | 30,9%    | 0%         | 69,1%      |       |
| CRO             | 23,5%    | 0%         | 76,5%      |       |
| FEP             | 38,2%    | 0%         | 61,8%      |       |
| CIP             | 63,2%    | 0%         | 36,8%      |       |
| AK              | 73,5%    | 0%         | 26,5%      |       |
| GENT            | 47,1%    | 2,9%       | 50%        |       |
| COL             | 66,2%    | 0%         | 33,8%      |       |
| <b>Total</b>    |          | 100%       |            |       |

**Fuente:** Investigación **Elaborado por:** Pamela Moncayo

En las 24 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se constató una gran resistencia a los carbapenémicos como Imipenem 100% y Meropenem 79,1%, y el 100% sensibles a Colistín, descrita en la **Tabla 18**.

**Tabla 18.***Perfil de susceptibilidad de Pseudomonas aeruginosa por Vitek.*

| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |                 |                   |                   |              |
|-------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|--------------|
| <b>Antibióticos</b>           | <b>Sensible</b> | <b>Intermedio</b> | <b>Resistente</b> | <b>Total</b> |
| IMI                           | 0%              | 0%                | 100%              |              |
| MEM                           | 0%              | 20,8%             | 79,2%             |              |
| ERT                           | N/A             | N/A               | N/A               |              |
| CAZ                           | 25%             | 20,8%             | 54,2%             |              |
| CRO                           | N/A             | N/A               | N/A               |              |
| FEP                           | 20,8%           | 12,5%             | 66,7%             | 100%         |
| CIP                           | 12,5%           | 20,8%             | 66,7%             |              |
| AK                            | 79,2%           | 4,2%              | 16,7%             |              |
| GENT                          | 25%             | 8,3%              | 66,7%             |              |
| COL                           | 100%            | 0%                | 0%                |              |
| <b>Total</b>                  |                 | 100%              |                   |              |

**Fuente:** *Investigación* **Elaborado por:** *Pamela Moncayo*

\*N/A: No Aplica

#### 4.1.2.3 Método de mCIM y eCIM

Se lograron excelentes resultados en cuanto a la detección de Carbapenemasas con la aplicación de la metodología de mCIM y eCIM. El más relevante fue el 10% que corresponde a MBL al dar positivo en ambas pruebas, como lo indica la **Tabla 19**.

**Tabla 19.***Frecuencia obtenida de los métodos mCIM y eCIM.*

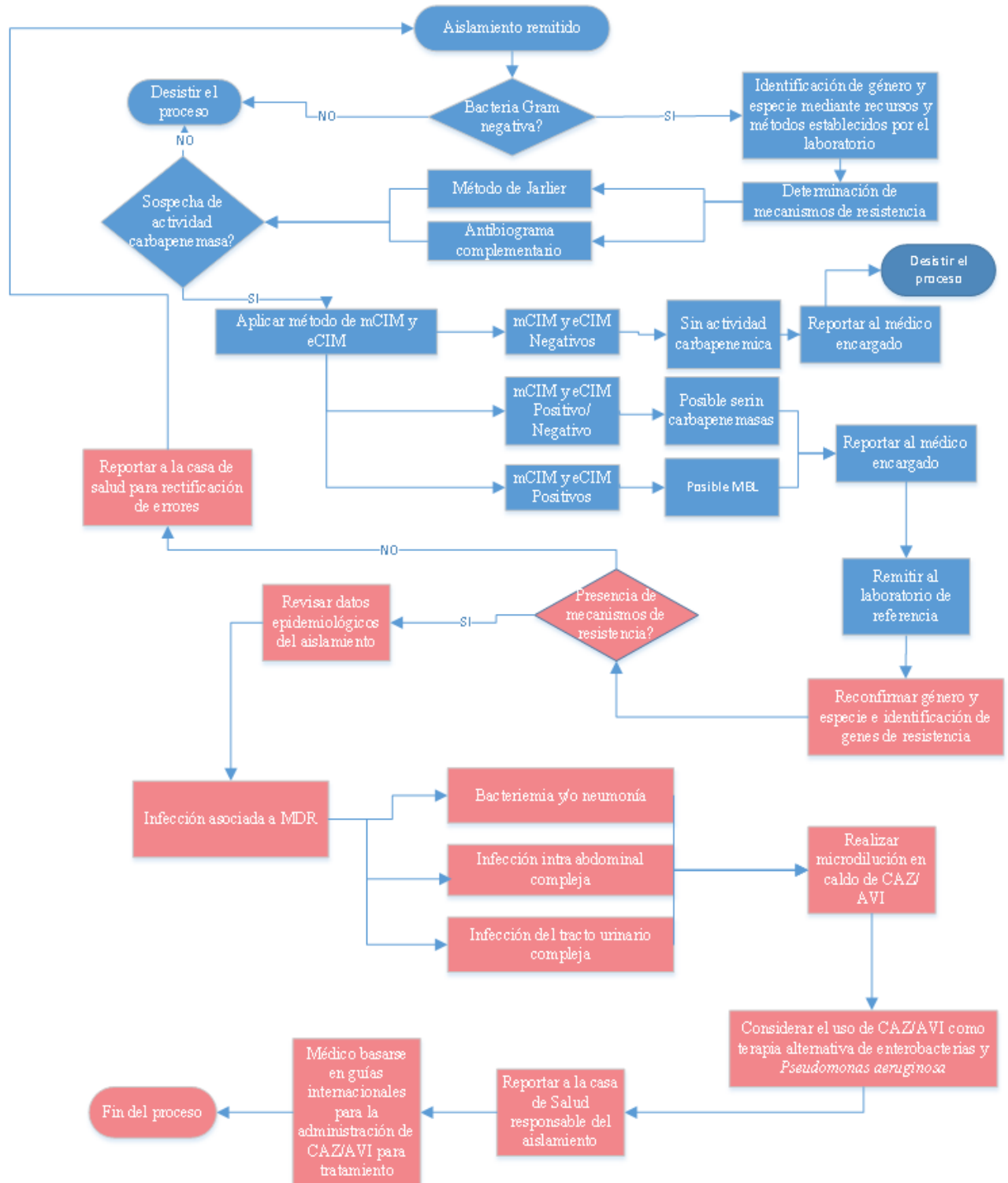
| <b>Resultado</b>  | <b>mCIM y eCIM</b> |                   |
|-------------------|--------------------|-------------------|
|                   | <b>Frecuencia</b>  | <b>Porcentaje</b> |
| Negativo-Negativo | 49                 | 53,3%             |
| Positivo-Negativo | 34                 | 36,9%             |
| Positivo-Positivo | 9                  | 9,8%              |
| <b>Total</b>      | 92                 | 100%              |

**Fuente:** *Investigación* **Elaborado por:** *Pamela Moncayo*

#### 4.1.3 Algoritmo de evaluación y reporte para ceftazidime/ avibactam en los aislados estudiados.

En la **Figura 2**, se puede apreciar la propuesta de un algoritmo de evaluación y reporte para ceftazidime/avibactam, el cual fue diseñado a través del análisis de resultados de esta investigación y con el fin de plantear una mejora en cuanto a los procesos operativos manejados con respecto al procesamiento de aislamientos analizados en una casa de salud, y en caso de presentar algún tipo de resistencia, enviarlas al CRN-RAM para efectuar el análisis pertinente. Esta guía práctica presenta dos etapas, diferenciadas por dos colores. La primera parte, representada por el color azul, indica el procedimiento instaurado en casas de salud para el

análisis de un aislamiento problema, y el color rosado corresponde a la segunda etapa en la cual el aislamiento es remitido a CRN-RAM.



**Figura 2** Algoritmo de evaluación y reporte para ceftazidime/avibactam en los aislados estudiados

**Fuente:** Investigación **Elaborado por:** Pamela Moncayo

## CAPITULO V

### 5.1 DISCUSIÓN

En los últimos años la diseminación mundial de bacterias multiresistentes ha provocado la reducción drástica del arsenal de antimicrobianos y como resultado se obtiene aumento en la resistencia de estos (OMS, 2017). En el presente trabajo, se llevó a cabo un estudio descriptivo-transversal, en el cual se probó la eficacia *in vitro* de la nueva combinación antimicrobiana CAZ/AVI mediante el método de microdilución en caldo, en cepas de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* que presentaban diferentes enzimas y perfiles de susceptibilidad, al igual que la investigación realizada por Livermore et al.(2018).

A partir de los hallazgos encontrados, existe un dominio de cepas que corresponden al género masculino con 56,5%, dato semejante al reportado por King et al. (2017) con 60% , al igual que Shields et al. (2017) con 56%, sin embargo, en el análisis de Van Duin et al. (2018) se reflejó que el sexo femenino fue superior con 53%. En cuanto a la edad, la totalidad de aislados clínicos se ubicaron en el rango de 51 a 75 años con 34,8%. La gran parte de microorganismos pertenecientes a esta investigación conforman la microbiota natural, pero pueden comportarse como patógenos oportunistas, es decir, que puede llegar a afectar a cualquier individuo independientemente de su edad y género, solo dependiente de su estado inmunológico.

En cuanto al servicio hospitalario, las cepas analizadas en su mayor parte provenían de UCI con un 39,1%, dato que se relaciona con lo publicado por King et al. (2017) y por Shields et al. (2017) que obtuvieron un 58.33% y 50% en UCI respectivamente en aislados provenientes de enterobacterias, y con respecto a *Pseudomonas aeruginosa*, Guano, (2017) identifica al 41%. Razón por la cual, UCI es el área más propensa para la permanencia y diseminación de microorganismos oportunistas. De igual manera, existen otras áreas en este estudio, en las cuales se adjudica un 25% a Quirúrgicas, 19,6% a Clínica y un 7,6% a Emergencia. La unidad oncohematológica alberga el 100% de pacientes inmunocomprometidos vulnerables a los patógenos oportunistas, pero solo se consiguieron 2 casos englobados en el área Clínica, y se puede atribuir a que las medidas profilácticas de los hospitales son focalizadas en esta zona y así garantizar un mejor manejo preventivo en los pacientes oncológicos (Hachem, Reitzel, Rolston, & Chافتari, 2017). En general, los pacientes hospitalizados pertenecen a una población que demanda mayor atención debido a los múltiples procedimientos invasivos que se les realiza, favoreciendo así diseminación endógena y cruzada de microorganismos multiresistentes.

Las principales infecciones causadas por enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* son bacteriemia, infecciones al tracto urinario, infecciones abdominales complicadas (Carmeli et al., 2016), neumonía asociada a ventilación mecánica y neumonía nosocomial (Flamm, Nichols, Sader, Farrell, & Jones, 2016). Las muestras respiratorias, de sangre, y orina ocupan un lugar preeminente dentro de los tipos de cepas que se analizaron, los porcentajes fueron los siguientes: 26,1% respiratorias, 25% sangre y 17,4% orina, lo cual concuerda con varias investigaciones científicas realizadas por Van Duin et al. (2018) con 46% sangre, en segundo lugar tracto respiratorio con 22% y orina 14%; y en Castón et al. (2017) bacteriemia 45,2% y 19,4% respiratorio. Dentro de la categoría respiratoria, la secreción traqueal fue la más frecuente con 17,4%. Como se mencionó en un inicio, tanto las enterobacterias como *Pseudomonas aeruginosa* son patógenos oportunistas que aprovechan la vulnerabilidad del paciente para causar una gran infección así estén en órganos o tejidos estériles, pero estos microorganismos se encuentran vinculados a factores de riesgo destacados, como los cita Blanco et al. (2015) al uso previo de antibióticos, infecciones recurrentes, alimentación asistida, más de una hospitalización en el año y comorbilidades que requieran estancia en UCI.

Con respecto a la diversidad de microorganismos recibidos en el estudio, 68 cepas correspondieron a enterobacterias y 24 cepas fueron *Pseudomonas aeruginosa*. Entre estos, los más frecuentes fueron *Klebsiella pneumoniae* en un 43,5%, *Pseudomonas aeruginosa* 26,1% y *Enterobacter cloacae* con 7,6%, situación similar encontramos detallado en el trabajo de Van Duin et al. (2018). En un estudio preliminar del 2013, el Centro para el Control y Prevención de enfermedades arroja valiosa información al decir que organismos anteriormente mencionados, son los más reportados y muestra el incremento de porcentaje del 1,6% en el 2001 al 10,4% en el 2010 de IAAS causadas por *Klebsiella pneumoniae* (Jacob et al., 2013).

En relación con el mecanismo de resistencia de los microorganismos, el 39,1% pertenecían a los microorganismos sin presencia de genes, el 37% a serin carbapenemasas y el 9,8% a MBL. En la categoría de serin carbapenemasas, KPC fue la que predominó con un 34,8% comparado con Castanheira, Mendes, & Sader, (2017) con un 72,5%. Livermore et al.(2018) presenta 9,6% de MBL, datos similares a los del estudio realizado. Se presume que la prevalencia de estos mecanismos de resistencia se debe a factores tanto externos como internos de los microorganismos, como se puede citar, el factor más importante es la exposición previa a antibióticos, en especial a los carbapenémicos, que puede ser adquirida a través de mutaciones

localizadas en su material genético u obtenido por genes procedentes de otra bacteria. La futura exposición que se tenga al antibiótico va a elegir a la población bacteriana que será la encargada de manifestar la resistencia, logrando así ser el genoma predominante Maldonado et al.(2015).

En consideración a la relación planteada entre el mecanismo de resistencia de las enterobacterias frente a la acción de Ceftazidime y Ceftazidime/Avibactam, se obtuvo una relación significativa para CAZ ( $p= 0,005$ ) y para CAZ/AVI ( $p=0,000$ ), incluido los porcentajes de sensibilidad y resistencia presentados por cada uno de los fenotipos, de los cuales en un inicio presentaron resistencia a CAZ, como por ejemplo, las serin carbapenemasas con un 61,70% pero que al ser expuestos a CAZ/AVI , el único grupo que mantuvo el 100% de resistencia fue el de MBL, debido a que avibactam no inhibe las enzimas de clase B. La misma relación se hizo con *Pseudomonas aeruginosa* que se obtuvo resultados semejantes a los anteriores, es decir, con la relación significativa para CAZ ( $p=0,014$ ) y CAZ/AVI ( $p= 0,000$ ), y la resistencia 100% a CAZ/AVI por parte de las VIM correspondientes al grupo de las MBL. No existen artículos preliminares que se relacionen con este tipo de comparación, debido a que la mayoría de trabajos investigativos no tienen como objetivo principal el estudio *in vitro* de esta nueva molécula antimicrobiana, si no su enfoque es in vivo. Publicaciones como la de Shields et al. (2017) que realizó su estudio con 109 cepas obteniendo resultados interesantes al concluir que el tratamiento para *Klebsiella pneumoniae* KPC con CAZ-AVI está asociado a un incremento en mejoramiento del paciente con un valor de  $p=0.006$  y de personas sobrevivientes a una bacteriemia con un  $p=0.001$ .

En la determinación de la CMI para Ceftazidime por medio de microdilución en caldo, se trabajó de acuerdo a los puntos de corte que indica el CLSI correspondiente a enterobacterias ( $\leq 4$  para Sensible, 8 Intermedio y  $\geq 16$  Resistente) y en *Pseudomonas aeruginosa* ( $\leq 8$  Sensible, 16 Intermedio y  $\geq 32$  Resistente), obteniendo así mayor concentración de CMI en  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$  (11) y en  $\geq 128$   $\mu\text{g/mL}$  (50); solo se decidió realizar 8 diluciones para Ceftazidime. Al momento de la comparación con Vitek, se logró resultados similares al de microdilución, solo que la mayor concentración de cepas fue en  $\geq 64$  (52) debido a que el sistema automatizado solo puede reportar CMI desde  $\leq 1$  hasta  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ , además que en Vitek no se obtuvo cepas con CMI correspondiente a 2, 8 y 32  $\mu\text{g/mL}$ , es decir, que la metodología manual de microdilución en caldo, al ser *Gold Standard* , confirma inusitadas resistencias y más que nada da respuestas definitivas que ayudarán al médico con la dosis exacta de antibiótico según el reporte entregado y así evitar la resistencia antimicrobiana. Como dato adicional, se relacionó estos resultados

con el fin de saber si es que existe una relación significativa entre los dos métodos utilizados en el estudio, y se obtuvo un valor de  $p=0,000$ , es decir, que existe una relación de dependencia entre ambas variables; tampoco existen investigaciones científicas que hagan referencia a este tipo de relación entre método manual y automatizado aplicado a un antibiótico.

Referente a la microdilución en caldo de CAZ/AVI se aplicó en todas las cepas sin excepción alguna. Avibactam actuó como se lo describe en la literatura, es decir, que aumentó el espectro de acción de Ceftazidime pero lamentablemente no funcionó en las Metalobetalactamasas. La concentración que se utilizó fue de  $4\mu\text{g/mL}$  al igual que el estudio de López-Hernández et al. (2017); Nichols et al. (2018) en combinación con diluciones seriadas dobladas de Ceftazidime que van de 4 a  $32\mu\text{g/mL}$ . Los resultados del presente trabajo indican que CAZ/AVI actuó de manera efectiva en 83 cepas que corresponde al 90,2%, cabe destacar que dentro de este porcentaje se detallan fenotipos KPC, GES, OXA-48, BLEE, entre otros., pero el 9,8% restante pertenece a la resistencia frente a este antimicrobiano, dentro de este porcentaje están los fenotipos correspondientes a la clase B de Ambler que son NDM, VIM e IMP. Esta investigación se puede comparar con varias publicaciones como en Castanheira et al. (2017) que alcanzaron un 90,21% de sensibilidad frente a CAZ/AVI, al igual que García et al. (2018) que determinaron el 100% de acción y efectividad en microorganismos productores de KPC y OXA-48.

De acuerdo a los porcentajes de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana para enterobacterias, se consiguió un 66,2% de sensibilidad al Colistín, porcentaje que comparte con el estudio de Temkin et al. (2016) con 41,2%. Colistín y polimixinas B son las opciones de tratamiento para las infecciones causadas por enterobacterias a pesar de que a la larga los efectos secundarios como nefrotoxicidad amenacen la vida del paciente. Ceftazidime y Ceftriaxona con un 69,1% y 76,5% de resistencia respectivamente. Y en *Pseudomonas aeruginosa* se logró una alta resistencia a los carbapenems como Imipenem con 100%, Meropenem con 79,2%, y el Colistín estuvo 100% sensible.

Los genes carbapenémicos están asociados a alarmantes tasas de mortalidad debido a su alta propagación a través de la expansión clonal o por la transferencia horizontal de genes a otro tipo de bacteria. La CDC recomienda la detección activa de aislamientos con sospecha de carbapenemasas. En el 2017, los nuevos métodos modificados para la detección de

carbapenemasas mCIM y eCIM fueron adicionados a la 27<sup>ava</sup> edición de la guía M100 del CLSI.

El método modificado de inactivación del carbapenémico o mCIM como tal, fue descrito en el 2015 (Tamma, 2018) e implica la actividad de un disco de meropenem dentro de una sustancia elaborada con el inóculo de una cepa sospechosa de carbapenemasa, si este microorganismo no es productor, el disco de meropenem conservará su actividad pero en caso de que sí sea productor, el disco sufrirá una hidrolización. A su vez, el método de eCIM consiste en seguir el mismo procedimiento que mCIM, solo que al caldo TSB se debe adicionar EDTA, los discos impregnados con dicha sustancia permiten la detección de metalobetalactamasas y así diferenciar de las serin carbapenemasas. En el presente estudio se realizó esta técnica con el fin de detectar carbapenemasas presentes en las cepas y comparar con sus datos moleculares correspondientes a cada una. Al aplicar ambos métodos, se obtuvo un 53% sin carbapenemasas, 37% de serin carbapenemasas y tan solo un 10% de metalobetalactamasas, que comparado con los datos moleculares y de la microdilución en caldo de CAZ-AVI nos arrojan esos porcentajes, sobre todo en las metalobetalactamasas. Estos porcentajes fueron comparados con un trabajo realizado en *Pseudomonas aeruginosa* y enterobacterias en especial en *Acinetobacter baumannii*, en el cual detallan una especificidad y sensibilidad del 98 y 95% respectivamente (Tamma, 2018).

## CONCLUSIONES

El renacimiento de nuevos tipos de inhibidores de betalactamasa ofrece esperanza a la Salud Pública, en general al mundo que se encuentra dominado por los microorganismos multiresistentes. En este estudio, CAZ/AVI demostró una potente actividad *in vitro* en aislamientos clínicos de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*, este devolvió la sensibilidad a CAZ en un 90,2%.

Se evidenció que CAZ/AVI es un tratamiento efectivo contra las serin carbapenemasas, en especial de las KPC, debido a que en esta investigación se obtuvo un alto porcentaje de dichas enzimas que a un inicio eran resistentes a CAZ pero bajo la acción de Avibactam pasaron a ser sensibles. CAZ/AVI no tuvo acción en las cepas clasificadas como MBL, ya que permanecieron con la misma resistencia a CAZ. Entre las cuales podemos destacar las enzimas NDM, VIM e IMP, incluidas en este estudio.

Durante el periodo 2017, se obtuvo varios aislamientos clínicos pertenecientes a enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*, distribuidos en varias casas de salud a nivel nacional lo que indica una alta prevalencia de estos microorganismos en nuestro medio.

Las enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* son considerados microorganismos oportunistas que son capaces de causar brotes epidémicos, debido a sus mecanismos de transmisión de genes. La mayor parte de estos son causantes de IAAS, con un alto porcentaje en UCI, esto debido a los procesos invasivos que sufre cada paciente y a su estado inmunológico que queda seriamente comprometido después de estos procedimientos. La mayor parte de aislados clínicos provinieron de pacientes adultos, que permanecieron en UCI y de muestras respiratorias.

Se encontró relación estadísticamente significativa entre los mecanismos de resistencia de las enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* con CAZ y CAZ/AVI. De la misma manera, existió relación significativa entre la metodología manual, en este caso microdilución en caldo y la metodología automatizada Vitek para obtener resultados de CAZ.

Fue posible detectar carbapenemasas en cepas de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* por medio del método de mCIM y eCIM. Y gracias al método eCIM se pudo diferenciar las

metalobetalactamasas de las serin carbapenemasas, al obtener resultados positivos en ambas pruebas.

No se han encontrado trabajos investigativos a nivel nacional vinculados con CAZ/AVI, es por eso, que al ser un tema de interés científico y más que nada enfocado en salud pública, se ha creado protocolos para el empleo de microdilución en caldo de CAZ/AVI en enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*, con el fin de incentivar la investigación sobre esta nueva terapia antimicrobiana. Del mismo modo, se ha propuesto algoritmos de evaluación y reporte para CAZ/AVI, basado tanto en la práctica como en la teoría. El estudio y conocimiento de los aspectos epidemiológicos de las infecciones causadas por microorganismos multiresistentes, van a fortalecer, guiar y sobre todo ser la base para el desarrollo de programas de control y prevención.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con esta investigación realizando una comparación entre las tres técnicas de laboratorio más usadas, es decir, microdilución en caldo, difusión de disco y sistema automatizado Vitek. Serían datos interesantes que de alguna u otra manera aportarán al sistema de salud pública en especial al sistema de vigilancia de la RAM, para que actualicen su base de datos, impulsen protocolos y estándares nacionales con el fin de tener un mecanismo de acción rápido ligado a estos resultados, para controlar cualquier tipo de brote causado por microorganismos multiresistentes a nivel nacional.

Se debe incentivar y promulgar charlas y campañas a nivel nacional sobre el impacto del uso insuficiente, excesivo e inapropiado de antibióticos que repercute en la salud humana. Igualmente, se debe conformar una red nacional en la cual se tenga acceso a herramientas de capacitación e implementación de métodos necesarios para la correcta identificación de microorganismos y reporte de ellos, de esta manera existirá una mejor recopilación de datos de RAM a nivel nacional, los cuales serán de conocimiento público al ser compartidos a través de publicaciones realizadas por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador.

Se recomienda a todos los sistemas de vigilancia que estén alerta ante cualquier muestra o aislado clínico sospechoso de multiresistencia, para que siguiendo los protocolos del caso se reporte de manera oficial obteniendo datos reales, para conocer si debe aplicar seguimiento y/o control al caso en particular.

Ecuador debería formar parte del Sistema Mundial de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos (GLASS) para poder monitorear, detectar e informar sobre las resistencias emergentes mediante estándares globales.

La literatura internacional sugiere realizar un estudio *in vitro* con mayor número de muestras, que permita conocer la actividad de aztreonam combinado con avibactam, para observar si podría ser un agente terapéutico viable contra las MBL.

Y, por último, se recomienda realizar estudios socio-económicos sobre la implementación de Ceftazidime-Avibactam en el Ecuador, y de ser el caso se recomendaría tomar en consideración el algoritmo de evaluación y reporte de este nuevo agente antimicrobiano.

## BIBLIOGRAFÍA

- AEMPS. (2018). Informe de Posicionamiento Terapéutico de ceftazidima/avibactam (Zavicefta®). Retrieved from <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-ceftazidima-avibactam-Zavicefta-antibioticos.pdf>
- Aguayo, A., Mella, S., Riedel, G., Bello, H., Domínguez, M., & González-Rocha, G. (2016). Colistín en la era post-antibiótica. *Revista Chilena de Infectología*, 33(2), 166–176. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000200006>
- Aguilar, D. (2015). E . coli BLEE , la enterobacteria que ha atravesado barreras. *Rev Invest Med Sur Mex*, 22(2), 57–63.
- Alatoom, A., Elsayed, H., Lawlor, K., AbdelWareth, L., El-Lababidi, R., Cardona, L., ... Mirza, I. (2017). Comparison of antimicrobial activity between ceftolozane–tazobactam and ceftazidime–avibactam against multidrug-resistant isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Infectious Diseases*, 62, 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.06.007>
- Alibert, S., Diarra, J. N. G., Hernandez, J., Stutzmann, A., Fouad, M., Boyer, G., & Pages, J. (2016). Multidrug efflux pumps and their role in antibiotic and antiseptic resistance : A pharmacodynamic perspective. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1251581>
- Álvarez, D., Garza, G., & Vázquez, R. (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Rev Chilena Infectol*, 32(5), 499–504.
- Ardanuy, C., Cercenado, E., Cantón, R., & Torres, C. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos.
- Bahr, G., Vitor-horen, L., Bethel, C. R., Bonomo, R. A., González, L., & Vila, A. (2018). Clinical Evolution of New Delhi Metallo-B-Lactamase (NDM) Optimizes Resistance under Zn(II) Deprivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(1), 1–10.
- Bassetti, M., Pecori, D., & Peghin, M. (2016). Multidrug-resistant Gram-negative Bacteria-Resistant Infections: Epidemiology, Clinical Issues and Therapeutic Options. *Italian Journal of Medicine*, 10(4), 364-375.
- Betancor, L., Gadea, P., & Flores, K. (2005). Genética bacteriana. *Mecanismos de Las Enfermedades Infecciosas*, 1–15. Retrieved from <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap 12.pdf>
- Blanco, V., Maya, J., Correa, A., Perenguez, M., Muñoz, J., Mota, G., Pallares, C., Rosso, F.,

- Villegas, M. (2015). Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(9), 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.11.017>
- Bou, G., Chaves, F., Palomo, A., & Oteo, J. (2015). Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. Retrieved from <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia55.pdf>
- Brañas, P., Gil, M., Villa, J., Orellana, M., & Chaves, F. (2016). Epidemiología molecular de las infecciones/colonizaciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital de Madrid. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.10.004>
- Brennan-Krohn, T., Pironti, A., & Kirby, J. E. (2018). Synergistic Activity of Colistin-Containing Combinations against Colistin-Resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, AAC.00873-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00873-18>
- Burillo, A., Moreno, A., & Salas, C. (2010). Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos. Retrieved from <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia22.pdf>
- Carmeli, Y., Armstrong, J., Laud, P. J., Newell, P., Stone, G., Wardman, A., & Gasink, L. B. (2016). Ceftazidime-avibactam or best available therapy in patients with ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* complicated urinary tract infections or complicated intra-abdominal infections (REPRISE): a randomised, pathogen-directed,. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(6), 661–673. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30004-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30004-4)
- Castanheira, M., Mendes, R. E., & Sader, H. S. (2017). Low frequency of ceftazidime-avibactam resistance among Enterobacteriaceae isolates carrying blaKPCcollected in U.S. hospitals from 2012 to 2015. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(3), 1–19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02369-16>
- Castón, J. J., Lacort-Peralta, I., Martín-Dávila, P., Loeches, B., Tabares, S., Temkin, L., ... Paño-Pardo, J. R. (2017). Clinical efficacy of ceftazidime/avibactam versus other active agents for the treatment of bacteremia due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in hematologic patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 59, 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.03.021>

- Cavaliere, S., Harbeck, R., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., Sautter, R., ... Spiegel, C. (2005). Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Retrieved from <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
- CECMED. (2017). Resumen de las características del producto: Ceftazidima. Retrieved from [http://www.cecmecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/rcp/m17180j01\\_ceftazidima.pdf](http://www.cecmecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/rcp/m17180j01_ceftazidima.pdf)
- Cercenado, E. (2015). Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio. *Rev Esp Quimioter*, 28(1), 8–11. Retrieved from <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimi->
- CLSI. (2018). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*.
- Escalante, J., Síme, A., & Díaz, C. (2013). Características clínicas y epidemiológicas en pacientes con infección intrahospitalaria por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. *REVISTA PERUANA DE EPIDEMIOLOGÍA*, 17(1), 1–6.
- Falcone, M., & Paterson, D. (2016). Spotlight on ceftazidime / avibactam : a new option for MDR Gram-negative infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1–10. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw239>
- Fariñas, M., & Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 31(6), 402–409.
- Flamm, R. K., Nichols, W. W., Sader, H. S., Farrell, D. J., & Jones, R. N. (2016). In vitro activity of ceftazidime/avibactam against Gram-negative pathogens isolated from pneumonia in hospitalised patients, including ventilated patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 47(3), 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.01.004>
- García-Hernández, A. M., García-Vázquez, E., Hernández, A., Ruiz, J., Yagüe, G., Herrero, J., & Gómez, J. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido ( BLEE ): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter*, 24(2), 57–66.
- García, A. M., García-fernández, S., Gómez-gil, R., Pitart, C., Oviaño, M., Gracia-ahufinger, I., ... Group, S. (2018). Activity of ceftazidime-avibactam against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from urine samples obtained during the infection-carbapenem resistance evaluation surveillance trial ( iCREST ) in Spain Servicio de Microbiología , Hospital Universitar. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.01.011>

- García, J., Cantón, R., Gómez, M., Martínez, L., Rodríguez, C., & Vila, J. (2000). Procedimientos en microbiología clínica: Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *SEIMC*.
- Gómez, J., García, E., & Hernández, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter*, 28(1), 1–9.
- González, E. (2016). Infecciones de tracto urinario. *Revista Nefrología*. Retrieved from <http://revistanefrologia.com/es-monografias-nefrologia-dia-articulo-infecciones-tracto-urinario-4>
- González, L., & Cortés, J. A. (2014). Revisión sistemática de la farmacorresistencia en enterobacterias de aislamientos hospitalarios en Colombia. *Biomédica*, 34, 180–197.
- Goodlet, K., Nailor, M., & Nicolau, D. (2016). Ceftolozane / tazobactam and ceftazidime / avibactam for the treatment of complicated intra-abdominal infections. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 12, 1811–1826.
- Guano, A. (2017). *Infección nosocomial: Prevalencia de Pseudomonas aeruginosas en aislamientos microbiológicos y su resistencia a los Carbapenémicos en pacientes del Hospital Carlos Andrade Marín en el periodo Julio - Diciembre 2016*. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/13054/1/T-UCE-0006-021-2017.pdf>
- Hachem, R., Reitzel, R., Rolston, K., & Chaftari, A. (2017). Antimicrobial Activities of Ceftazidime/Avibactam and Comparator Agents against Clinical Bacteria Isolated from Patients with Cancer. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1–21. <https://doi.org/10.1128/AAC.02106-16>
- Harrison, C. J., & Bratcher, D. (2014). Cephalosporins : A Review. *Pediatrics in Review*, 29(8), 265–273.
- Hong, D. J., Bae, I. K., Jang, I., Jeong, S. H., Kang, H., Lee, K., ... Asia, N. (2015). Epidemiology and Characteristics of Metallo-  $\beta$  - Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother*, 47(2), 81–97.
- ICMJE. (2015). ICMJE | Recommendations | Defining the Role of Authors and Contributors.
- INSHT. (2017). *Pseudomonas aeruginosa*. Retrieved from <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas de agentes biologicos/Fichas/Pseudomonas aeruginosa 2017.pdf>
- IQB. (2015). Ceftobiprol. Retrieved from <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/c148.htm>
- Jacob, J., Klein, E., Laxminarayan, R., Beldavs, Z., Lynfield, R., Kallen, A., & Ricks, P. (2013). Vital signs: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 62(9), 165–169. Retrieved from

<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6209a3.htm>

- Jiménez, A., Tijerino, A., & Vargas, J. (2011). Mecanismos de resistencia a los antibióticos de importancia clínica en enterobacterias. Retrieved from [https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia\\_epidemiologica/Manuales/Mecanismos de resistencia a los antibioticos en enterobacterias.pdf.pdf](https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/Manuales/Mecanismos_de_resistencia_a_los_antibioticos_en_enterobacterias.pdf.pdf)
- King, M., Heil, E., Kuriakose, S., Bias, T., Huang, V., El-Beyrouy, C., ... Gallagher, J. C. (2017). Multicenter study of outcomes with ceftazidime-avibactam in patients with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(7), 1–11. <https://doi.org/10.1128/AAC.00449-17>
- Kumar, C., & Nair, N. (2016). Molecular Insights into Avibactam Mediated Class C  $\beta$ -Lactamase Inhibition: Competition Between Reverse Acylation and Hydrolysis Through Desulfation. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *18*(39), 10270–10280. <https://doi.org/10.1039/b000000x/>
- Lepelletier, D., Bonnet, R., Plésiat, P., Nicolas-Chanoine, M. H., Berger-Carbonne, A., Chidiac, C., & Grandbastien, B. (2017). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1) among Enterobacteriaceae strains: Laboratory detection of resistance and measures to control its dissemination. *Med Mal Infect*, *48*(4), 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2018.01.010>
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., ... Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Livermore, D. M., Meunier, D., Hopkins, K. L., Doumith, M., Hill, R., Pike, R., ... Woodford, N. (2018). Activity of ceftazidime/avibactam against problem Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* in the UK, 2015-16. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(3), 648–657. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx438>
- López-Hernández, I., Alonso, N., Fernández-Martínez, M., Zamorano, L., Rivera, A., Oliver, A., ... Pascual, A. (2017). Actividad de ceftazidima/avibactam en enterobacterias multirresistentes con mecanismos de resistencia combinados. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, *35*(8), 499–504. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.09.013>
- Luján, D. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamérica*, *48*(4), 465–474.
- Macnair, C. R., Stokes, J. M., Carfrae, L. A., Fiebig-comyn, A. A., Coombes, B. K., Mulvey, M. R., & Brown, E. D. (2018). Overcoming mcr-1 mediated colistin resistance with

- colistin in combination with other antibiotics. *Nature Communications*, 9(458), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02875-z>
- Makena, A., Duzgun, A. O., Brem, J., McDonough, M. A., Rydzik, A. M., Abboud, M. I., ... Schofield, C. J. (2015). Comparison of Verona Integron-Borne Metallo-beta-Lactamase (VIM) Variants Reveals Differences in Stability and Inhibition Profiles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(3), 1377–1384. <https://doi.org/10.1128/AAC.01768-15>
- Malbrán, G. carlos. (2012). Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. Retrieved from [http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/02-METODO\\_DE\\_DETERMINACION\\_DE\\_SENSIBILIDAD\\_ANTIMICROBIANA\\_PO\\_R\\_DIFUSION\\_2012.pdf](http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/02-METODO_DE_DETERMINACION_DE_SENSIBILIDAD_ANTIMICROBIANA_PO_R_DIFUSION_2012.pdf)
- Maldonado, N., Castro, B., Berrio, I., Manjarrés, M., Robledo, C., & Robledo, J. (2015). Resistencia a ertapenem en 2 instituciones hospitalarias de alto nivel de complejidad: microbiología, epidemiología y factores de riesgo. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(8), 511-515.
- Marín, M., & Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21(1), 42–55.
- Márquez, K., Rojas, A., & Camacho, G. (2017). Klebsiella productora de carbapenemasa en pediatría : revisión de la literatura. *Rev Latin Infect Pediatr*, 30(3), 107–115.
- Martínez, D. (2009). Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29, 78–89.
- Martínez, L., & Aguirre, A. (2016). Non-molecular detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *J Infect Chemother*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2016.09.008>
- Martínez, L., & González, J. J. (2014). Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, 32(4), 4–9. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70168-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70168-5)
- Méndez, A., García, M., Baquero, F., & Marín, F. (2010). Neumonía adquirida en la comunidad. *Infectologia Pediátrica*, 46(7), 26–30. [https://doi.org/10.1016/S0300-2896\(10\)70043-0](https://doi.org/10.1016/S0300-2896(10)70043-0)
- Merino, L., & Losch, L. (2013). FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.
- Moreno, K. (2013). Carbapenémicos : Tipos y mecanismos de resistencias bacterianos. *Revista Médica de Costa Rica Y Centroamérica LXX*, 599–605.
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., ... Iorga, B. I.

- (2017). Beta-lactamase database (BLDB)–structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 917–919. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>
- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., & Fernández, F. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(7), 524–534. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>
- Nichols, W. W., Stone, G. G., Newell, P., Broadhurst, H., Wardman, A., Macpherson, M., ... Das, S. (2018). Ceftazidime-Avibactam Susceptibility Breakpoints Against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.02590-17>
- Nicolau, C. J., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 28, 19–28. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70004-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70004-5)
- Oliver, A., & Cantón, R. (2012). ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE  $\beta$ -LACTAMASAS PLASMÍDICAS DE ESPECTRO EXTENDIDO.
- OMS. (2015). Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria.
- OMS. (2017). Datos sobre la resistencia a los antimicrobianos. Retrieved from [http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial\\_resistance/facts/es/](http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/facts/es/)
- OPS. (2011). Resistencia a los antimicrobianos. Retrieved from <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/Pan-American-Journal-Res-Antim-2011.pdf>
- OPS. (2012). *Vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención de la salud*. Retrieved from [http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=22315&Itemid=270](http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22315&Itemid=270)
- OPS. (2016). Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, implicaciones para la salud pública en las Américas. Retrieved from <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-jun-10-alerta-epi-enterob-resist.pdf>
- Oteo, J., Calbo, E., Rodríguez-ba, J., Ruiz-garbajosa, P., Horcajada, J. P., Luis, J., ... Salavert, M. (2014). La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas ~ documento de posicionamiento de los grupos de estudio en España : GEIH y GEMARA de la SEIMC, 32(10), 666–670.
- Paciel, D., Seija, V., Prieto, J., Vignoli, R., Medina, J., & Savio, E. (2011). Enterobacterias

- productoras de KPC. *Tendencias En Medicina*, 45(9), 1–6.
- Pena, I. (2016). *Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología molecular y alternativas terapéuticas*. Universidad Complutense de Madrid.
- Pestaña, M., & Pozo, J. (2018). Infecciones por bacilos Gram negativos no fermentadores : *Pseudomonas aeruginosa* , *Acinetobacter* spp . y *Stenotrophomonas maltophilia*. *Medicine*, 12(50), 2931–2940. <https://doi.org/10.1016/j.med.2018.02.010>
- Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(2), 557–596.
- Pozzi, C., Di Pisa, F., De Luca, F., Benvenuti, M., Docquier, J. D., & Mangani, S. (2018). Atomic-Resolution Structure of a Class C  $\beta$ -Lactamase and Its Complex with Avibactam. *ChemMedChem*, 13(14), 1437–1446. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800213>
- Puerta, A., & Rodriguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3426–3431.
- Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases : the Versatile B-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440–458. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
- Ramirez, S., & Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in Vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 42(42), 263–268. <https://doi.org/10.22517/23447214.2687>
- Rodríguez, Z., Tolón, B., & López, M. (2013). Antibióticos cefalosporánicos: Actualidades y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44(1), 57–68.
- SADEBAC. (2014). Caracterización fenotípica de la resistencia a los B-lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. Retrieved from [http://www.aam.org.ar/src/img\\_up/21072014.1.pdf](http://www.aam.org.ar/src/img_up/21072014.1.pdf)
- Sader, H. S., Farrell, D. J., Castanheira, M., Flamm, R. K., & Jones, R. N. (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*, 69(10), 2713–2722. <https://doi.org/10.1093/jac/dku184>
- Sader, H. S., Rhomberg, P. R., Huband, M. D., Critchley, I. A., Stone, G. G., Flamm, R. K., ... Sader, H. S. (2018). Assessment of Ceftazidime-Avibactam 30/20  $\mu$ g Disk Content Versus MIC Results When Tested against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.01960-17>
- Salgado, P. (2017). *FACTORES DE RIESGO DE COLONIZACIÓN INTESTINAL POR ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS AL INGRESO EN*

- UNA UNIDAD DE CUIDADOS CRÍTICOS*. Universidad Autónoma de Madrid. Retrieved from [https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/681484/salgado\\_aranda\\_patricia.pdf?sequence=1](https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/681484/salgado_aranda_patricia.pdf?sequence=1)
- Scheeren, T. W. (2015). Ceftobiprole medocaril in the treatment of hospital-acquired pneumonia. *Future Microbiology*, 10(12), 1913–1928. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.115>
- Schwarz, S., Loeffler, A., & Kadlec, K. (2017). Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Vet Dermatol*, 28, 82–95. <https://doi.org/10.1111/vde.12362>
- Seral, C., Gude, M., & Castillo, F. (2012). Emergencia de  $\beta$ -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC o cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Rev Esp Quimioter*, 25(2), 89–99.
- Seral, C., Pardos, M., & Castillo, F. (2010). Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 28(1), 12–18.
- Shields, R. K., Nguyen, M. H., Chen, L., Press, E. G., Potoski, B. A., Marini, R. V., ... Clancy, C. J. (2017). Ceftazidime-avibactam is superior to other treatment regimens against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(8). <https://doi.org/10.1128/AAC.00883-17>
- Shirley, M. (2018). Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs*, 78(6), 675–692. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0902-x>
- Solomkin, J., Hershberger, E., Miller, B., Popejoy, M., Friedland, I., Steenbergen, J., ... Eckmann, C. (2015). Ceftolozane/tazobactam plus metronidazole for complicated intra-abdominal infections in an era of multidrug resistance: Results from a randomized, double-blind, phase 3 trial (ASPECT-cIAI). *Clinical Infectious Diseases*, 60(10), 1462–1471. <https://doi.org/10.1093/cid/civ097>
- Stone, G. G., Newell, P., & Bradford, A. (2018). *In Vitro* Activity of Ceftazidime - Avibactam Against Isolates from Patients in a Phase 3 Clinical Trial for the Treatment of Complicated Intra - Abdominal Infections. <https://doi.org/10.1128/AAC.02584-17>
- Syed, Y. Y. (2015). Ceftobiprole medocaril: a guide to its use in hospital- or community-acquired pneumonia in the EU. *Drugs & Therapy Perspectives*, 31, 150–156. <https://doi.org/10.1007/s40267-015-0199-8>

- Tafur, D., Villegas, V., & Torres, J. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(3), 223–233. Retrieved from file:///C:/Users/SAMSUNG/Downloads/tafur%252c%20torres%252c%20villegas.pdf
- Tamma, P. D. (2018). Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.01140-18>
- Tamma, P. D., Suwantararat, N., Rudin, S. D., Logan, L. K., Simner, P. J., Rojas, L. J., ... Bonomo, R. A. (2016). First report of a verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection in a child in the United States. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 5(3), 24–27. <https://doi.org/10.1093/jpids/piw025>
- Temkin, E., Torre, J., Beovic, B., Benito, N., Giannella, M., Gilarranz, R., ... Carmeli, Y. (2016). Ceftazidime-avibactam as salvage therapy for infections caused by carbapenem-resistant organisms: a case series from the compassionate-use program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01964-16>
- UNAM. (2014). Genética bacteriana. Retrieved from [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/geneticabacteriana\\_9091.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/geneticabacteriana_9091.pdf)
- Van Duin, D., Lok, J. J., Earley, M., Cober, E., Richter, S. S., Perez, F., ... Evans, S. (2018). Colistin Versus Ceftazidime-Avibactam in the Treatment of Infections Due to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Infectious Diseases*, 66(2), 163–171. <https://doi.org/10.1093/cid/cix783>
- Vera, A., Barría-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C., Aguayo-Reyes, A., Domínguez, M., ... González-Rocha, G. (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista Chilena de Infectología*, 34(5), 476–484. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476>
- Vila, J., & Marco, F. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 28(10), 726–736. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.05.001>
- Voor, A. F., Wattel, A. A., Boers, S. A., Jansen, R., Hays, J. P., Goessens, W. H. F., & Vos, M. C. (2016). Detection of Healthcare-Related Extended- Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Transmission Events Using Combined Genetic and Phenotypic Epidemiology. *PLoS ONE*, 11(7), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160156>
- Weston, N., Sharma, P., Ricci, V., & Piddock, L. J. V. (2017). Regulation of the AcrAB-TolC

- efflux pump in Enterobacteriaceae. *Research in Microbiology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.10.005>
- Wilson, H., & Török, M. E. (2018). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microbial Genomics*, 4, 1–14.  
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000197>
- Wise, M. G., Estabrook, M. A., Sahm, D. F., Stone, G. G., & Kazmierczak, K. M. (2018). Prevalence of mcr-type genes among colistinresistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. *PLoS ONE*, 13(4), 1–8.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195281>
- Woodford, N., Ward, M. E., Kaufmann, M. E., Turton, J., Fagan, E. J., James, D., ... Livermore, D. M. (2004). Community and hospital spread of Escherichia coli producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(4), 735–743. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh424>
- Zasowski, E. J., Rybak, J. M., & Rybak, M. J. (2015). REVIEWS THERAPEUTICS The  $\beta$ -Lactams Strike Back: Ceftazidime-Avibactam. *Pharmacotherapy*, 35(8), 755–770.  
<https://doi.org/10.1002/phar.1622>

# ANEXOS

## Anexo 1. Carta de aprobación del estudio- CEISH-USFQ.

2018-1418



Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos  
Universidad San Francisco de Quito

El Comité de Revisión Institucional de la USFQ  
The Institutional Review Board of the USFQ

Aprobación MSP, Oficio No. MSP-VDIS-2018-0384-Q, 26 de Abril de 2018

Quito, 18 de julio de 2018

Señora

Pamela Monserrate Moncayo Cabascango  
Investigadora Principal  
Facultad de Medicina  
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
Ciudad

De mi mejor consideración:

Por medio de la presente, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito se complace en informarle que su solicitud de revisión y aprobación del estudio de investigación "Determinación de la eficacia de Ceftazidime/Avibactam por el método de microdifusión en caldo en cepas de Enterobacterias y de Pseudomonas aeruginosa recibidas en el INSPI, año 2017", ha sido aprobado el día de hoy como un estudio exento, debido a que la investigación va a tomar datos personales pero el investigador asegura que serán codificados para el análisis y presentación de los resultados y una vez concluido el estudio cualquier dato que pudiese identificar al participante será borrado.

El CEISH - USFQ aprueba el estudio ya que cumple con los siguientes parámetros:

- El proyecto de investigación muestra metas y/o objetivos de significancia científica con una justificación y referencias.
- El protocolo de investigación cuenta con los procedimientos para minimizar sus riesgos de sus participantes y/o los riesgos son razonables en relación a los beneficios anticipados del estudio.
- El protocolo cuenta con provisiones para proteger la privacidad y confidencialidad de los participantes del estudio en sus procesos de recolección, manejo y almacenamiento de datos
- El protocolo detalla las responsabilidades del investigador

Además el investigador principal de este estudio ha dado contestación a todas las dudas y realizado todas las modificaciones que este Comité ha solicitado en varias revisiones. Los documentos que se aprueban y que sustentan este estudio es la versión # 1 de julio 10, 2018 que incluyen:

- Solicitud de revisión y aprobación de estudio de investigación, 16 páginas;
- Solicitud de no aplicación al consentimiento informado por escrito, 2 páginas;
- Hoja de vida de la investigadora principal, 2 páginas.

Calle Postal 17-13-841, Quito, Ecuador  
[www.usfq.edu.ec](http://www.usfq.edu.ec)  
FAX (593-3) 207-1780 ext 1149

**2018-141E**

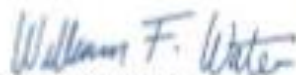
Esta aprobación tiene una duración de un año (365 días) transcurrido el cual se deberá solicitar una extensión si fuere necesario. En toda correspondencia con el Comité de Bioética favor referirse al siguiente código de aprobación: **2018-141E**. El Comité estará dispuesto a lo largo de la implementación del estudio a responder cualquier inquietud que pudiese surgir tanto de los participantes como de los investigadores.

Favor tomar nota de los siguientes puntos relacionados con las responsabilidades del investigador para este Comité:

1. El Comité no se responsabiliza por los datos que hayan sido recolectados antes de la fecha de esta carta; los datos recolectados antes de la fecha de esta carta no podrán ser publicados o incluidos en los resultados.
2. El Comité ha otorgado la presente aprobación en base a la información entregada por los solicitantes, quienes al presentarla asumen la veracidad, corrección y autoría de los documentos entregados.
3. De igual forma, los solicitantes de la aprobación son los responsables por la ejecución correcta y ética de la investigación, respetando los documentos y condiciones aprobadas por el Comité, así como la legislación vigente aplicable y los estándares nacionales e internacionales en la materia.

Deseándole los mejores éxitos en su investigación, se solicita a los investigadores que notifiquen al Comité la fecha de terminación del estudio.

Atentamente,



William F. Waters, PhD

Presidente Comité de Ética de Investigación en SOTEC Humanos USFQ  
cc. Archivo general, Archivo protocolo



## Anexo 2. Protocolo de preparación solución madre de Ceftazidime

### PROTOCOLO DE PREPARACIÓN SOLUCIÓN MADRE DE CEFTAZIDIME HYDRATE

| DATOS ANTIBIÓTICO               |                         |
|---------------------------------|-------------------------|
| Lote: 067m4806v                 | Casa Comercial: SIGMA   |
| Potencia: 681.12 ug/mg          | Almacenamiento: 2-8°C   |
| Solvente: NaHCO <sub>3</sub> 1M | Pureza: 99% (HPLC)      |
| Fracción Activa: 80%            | Porcentaje de Agua: 14% |

#### CÁLCULO POTENCIA

$$\text{Potencia} = \text{Pureza} \times \text{Fracción Activa} (1 - \% H_2O)$$

$$\text{Potencia} = 990 \times 0.8 (1 - 0.14)$$

$$\text{Potencia} = 681.12 \frac{\mu g}{mg}$$

#### PREPARACIÓN SOLUCIÓN MADRE (SM)

Volumen final: 2 ml

Concentración: 1280 ug/ml

$$\text{Peso Ceftazidime} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{Concentración} \left(\frac{\mu g}{ml}\right)}{\text{Potencia } \mu g/mg}$$

$$\text{Peso Ceftazidime} = \frac{2 \text{ ml} \times 1280 \frac{\mu g}{ml}}{681.12 \frac{\mu g}{mg}}$$

$$\text{Peso Ceftazidime} = 3.75 \text{ mg}$$

3.75 mg Ceftazidime en Polvo + 1000 ul de NaOH 1M + 1000 ul de Agua Molecular

#### PREPARACIÓN SOLUCIÓN DE TRABAJO (ST)

Volumen Final: 700 ul

Concentración Final: 128 ug/ml

A partir de una alícuota de la SM:

**70 ul de SM + 630 ul de MHB**

Almacenar -20°C

### Anexo 3. Solución de Trabajo de Cefotaxime

#### DILUCIONES

**Solución de Trabajo 1 (ST1):** 128 ug/ml

Preparación de diluciones (2 placas): VF: 1400 ul

| ANTIBIÓTICO            | Cefotaxime            |             |                  |
|------------------------|-----------------------|-------------|------------------|
| # MUESTRAS             | 16                    | Vol/muestra | 1000             |
| Concentración dilución | Concentración pocillo | Volumen ST  | Volumen Solvente |
| 256                    | 128                   | 1000        | -                |
| 128                    | 64                    | 500         | 500              |
| 64                     | 32                    | 250         | 750              |
| 32                     | 16                    | 125         | 875              |
| 16                     | 8                     | 62,5        | 937,5            |
| 8                      | 4                     | 31,25       | 968,75           |
| 4                      | 2                     | 15,625      | 984,375          |
| 2                      | 1                     | 7,8125      | 992,1875         |
| <b>Total</b>           |                       | 1992,1875   | 6007,8125        |
| <b>Aprox.</b>          |                       | <b>3000</b> | <b>8857,8125</b> |

| Procedimiento  |  |
|--|--|
| 1. Preparación de la suspensión bacteriana   | 2. Preparación de los pocillos   |
| <b>1.1</b> Sembrar las cepas en Agar nutritivo e incubar 24 horas incluidas las cepas control.   | <b>2.1</b> Rotular los micropocillos.                                      |
| <b>1.2</b> Preparar una solución McFarland 0,5 (1-2 x10 <sup>8</sup> UFC/ml) en solución salina (0,9%).  | <b>2.2</b> Añadir 50 µl de cada dilución en cada pocillo como corresponda. |
| <b>1.3</b> Hacer una dilución 1:100 con 10 µl de solución 0,5 McFarland + 990 µl de SSE (1x10 <sup>6</sup> UFC/ml)   | <b>2.3</b> Añadir 50 µl de la suspensión bacteriana.                       |
| <b>1.4</b> Para control de calidad tomar 10 µl del pocillo de control de crecimiento de la Cepa ATCC 25922, hacer una dilución 1:1000 (10 µl + 990 SS (1:100); 100 µl + 900 µl SS (1:10)), sembrarlo en agar nutritivo para su respectivo contaje (50 colonias). | <b>2.4</b> Incubar 24 horas a 37°C.  |

Fuente: (Alban, 2017)

**Anexo 4.** Distribución de los micropocillos para la microdilución de Cefotaxime.

| # Muestras   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11        | 12            |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|-----------|---------------|
| Diluciones   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    | Cepa ATCC | Cepa ATCC     |
| A= 128 ug/ml |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |           |               |
| B= 64 ug/ml  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |           |               |
| C= 32 ug/ml  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |           |               |
| D= 16 ug/ml  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |           |               |
| E= 8 ug/ml   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |           |               |
| F= 4 ug/ml   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |           |               |
| G= 2 ug/ml   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |           |               |
| H= 1 ug/ml   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |           | Control medio |

Nota:

1. Serán 10 cepas diferentes que se trabajarán en cada microplaca de manera vertical
2. Serán 8 diluciones del antibiótico a trabajar, desde la concentración de dilución 128 ug/ml hasta la 2 ug/ml.
3. En cada microplaca se utilizarán 2 cepas ATCC para control de calidad.
4. Y en la "12 H" se utilizará para control de crecimiento del medio.

**Anexo 5.** Protocolo de preparación solución madre de Avibactam.

**PROTOCOLO DE PREPARACIÓN SOLUCIÓN MADRE DE AVIBACTAM**

| <b>DATOS ANTIBIÓTICO</b>      |                                  |
|-------------------------------|----------------------------------|
| <b>Lote:</b> 067m4806v        | <b>Casa Comercial:</b>           |
| <b>Potencia:</b> 681.12 ug/mg | <b>Almacenamiento:</b> TA        |
| <b>Solvente:</b> NaOH 1M      | <b>Pureza:</b> 99.5% (Assay)     |
| <b>Fracción Activa:</b> 93%   | <b>Porcentaje de Agua:</b> 0.05% |

**CÁLCULO POTENCIA**

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

$$Potencia = 995 \times 0.93 (1 - 0.0005)$$

$$Potencia = 924.89 \frac{\mu g}{mg}$$

**PREPARACIÓN SOLUCIÓN MADRE (SM)**

**Volumen final:** 2 ml

**Concentración:** 160 ug/ml

$$Peso Avibactam = \frac{Volumen (ml) \times Concentración \left(\frac{\mu g}{ml}\right)}{Potencia \mu g/mg}$$

$$Peso Avibactam = \frac{2 ml \times 160 \frac{\mu g}{ml}}{924.89 \frac{\mu g}{mg}}$$

$$Peso Avibactam = 0.35 mg$$

## Anexo 6. Solución de trabajo de CAZ/AVI

| CEFTAZIDIMA  |      |          |
|--------------|------|----------|
|              | SM   | SOLVENTE |
| Sol. Madre   | 5120 | -        |
| Sol. Trabajo | 40   | 1560     |

| AVIBACTAM    |     |          |
|--------------|-----|----------|
|              | SM  | SOLVENTE |
| Sol. Madre   | 160 | -        |
| Sol. Trabajo | 220 | 1980     |

| CEFTAZIDIMA            |                       |             |                  |
|------------------------|-----------------------|-------------|------------------|
| # MUESTRAS             | 16                    | Vol/muestra | 1000             |
| Concentración dilución | Concentración pocillo | Volumen ST  | Volumen Solvente |
| 128                    | 64                    | 1000        | -                |
| 64                     | 32                    | 500         | 500              |
| 32                     | 16                    | 250         | 750              |
| 16                     | 8                     | 125         | 875              |
| <b>Total</b>           |                       | 1875        | 2125             |
| <b>Aprox.</b>          |                       | 1600        | 3685             |

| CEFTAZIDIMA/AVIBACTAM |                   |         |             |             |
|-----------------------|-------------------|---------|-------------|-------------|
| Concentración CAZ     | Concentración AVI | CAZ/AVI | Volumen CAZ | Volumen AVI |
| 128                   | 16                | (64/8)  | 400         | 400         |
| 64                    | 16                | (32/8)  | 400         | 400         |
| 32                    | 16                | (16/8)  | 400         | 400         |
| 16                    | 16                | (8/8)   | 400         | 400         |

## Anexo 7. Distribución de los micropocillos para la microdilución de Ceftazidime-Avibactam

| #                     | 1        | 2        | 3       | 4       | 5                      | 6 | 7            | 8        | 9        | 10      | 11      | 12                     |
|-----------------------|----------|----------|---------|---------|------------------------|---|--------------|----------|----------|---------|---------|------------------------|
| pocillo<br>Diluciones | 32 ug/ml | 16 ug/ml | 8 ug/ml | 4 ug/ml | Control<br>crecimiento |   |              | 32 ug/ml | 16 ug/ml | 8 ug/ml | 4 ug/ml | Control<br>crecimiento |
| A                     |          |          |         |         |                        |   | A            |          |          |         |         |                        |
| B                     |          |          |         |         |                        |   | B            |          |          |         |         |                        |
| C                     |          |          |         |         |                        |   | C            |          |          |         |         |                        |
| D                     |          |          |         |         |                        |   | D            |          |          |         |         |                        |
| E                     |          |          |         |         |                        |   | E= Cepa ATCC |          |          |         |         |                        |
| F                     |          |          |         |         |                        |   | F= Cepa ATCC |          |          |         |         |                        |
| G                     |          |          |         |         |                        |   | G= Cepa ATCC |          |          |         |         |                        |
| H                     |          |          |         |         |                        |   | H= Cepa ATCC |          |          |         |         |                        |

Nota:

1. Serán 12 cepas diferentes que se trabajarán en cada microplaca de manera horizontal.
2. Serán 4 diluciones del antibiótico a trabajar, desde la concentración de dilución 32 ug/ml hasta la 4 ug/ml.
3. En cada micro placa se utilizarán 4 cepas ATCC para control de calidad.
4. Y en la fila “5” y “12” se utilizarán para control de crecimiento del medio.

**Anexo 8. Resultados del Control de Calidad de Agar Mueller Hinton, Nutritivo y MacConkey por parte del INSPI-G.**

**- Control de Calidad del Agar Mueller Hinton**

|  |   |  |                   |                   |
|--|---|--|-------------------|-------------------|
|  | <b>CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO</b><br>(sólidos - semisólidos - líquidos)         |  | Código:           | F-MDC-032         |
|  |   |  | Edición:          | 03                |
| MACRO PROCESO:<br>Plataformas Compartidas  |   | PROCESO INTERNO:<br>Medios de Cultivo  | Fecha Aprobación: | 15/04/2018        |
| NOMBRE: Agar Mueller Hinton M6<br>DTE: AMH-M6140518<br>ECHA DE REQUERIMIENTO:<br>ECHA DE ELABORACIÓN:<br>ECHA DE EXPIRACIÓN:<br>EMPERATURA DE CONSERVACIÓN:  |   | CANTIDAD: 4 Unidades<br>16 de Mayo del 2018<br>14 de Mayo del 2018<br>14 de Junio del 2018<br>2 a 8 °C |                   |                   |
| <b>CARACTERÍSTICAS FÍSICAS</b>   |   |  |                   | <b>RESULTADOS</b> |
| OLOR:  | Ambar   |  |                   | CONFORME          |
| VOLUMEN:   | 25 ml (4mm de grosor) c/u   |  |                   | CONFORME          |
| PRESENTACIÓN:  | Cajas Monopetri Plásticas   |  |                   | CONFORME          |
| pH:  | 7,3 ± 0,1 a 25°C  |  |                   | 7,3               |
| <b>CONTROL DE ESTERILIDAD A 35°C ± 2 °C POR 24 HORAS</b>   |   |  |                   | <b>RESULTADOS</b> |
| A 35°C X 24 HORAS NO SE OBSERVO MACROSCÓPICAMENTE NI MICROSCÓPICAMENTE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS  |   |  |                   | N/A               |
| <b>EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA CON INCUBACIÓN A 35°C ± 2 °C 48 HORAS (NORMA ISO/TS11133-2)</b>   |   |  |                   | <b>RESULTADOS</b> |
| Microorganismo   | Características Físicas / Características Químicas  | Selectividad   | Productividad     |                   |
| Escherichia coli ATCC 25922  | MACROSCÓPICAMENTE PRESENTA COLONIAS CREMOSAS OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA CRECIMIENTO DE BACILOS GRAM NEGATIVOS | -  | SI                | CONFORME          |
| <b>METODO DE KIRBY BAUER</b>   |   |  |                   |                   |
| Staphylococcus aureus ATCC 25923   | ANTIBIOTICO   | ATCC 25923   | RANGO             | CONFORME          |
|  |   | AK30   | 23 mm             |                   |
|  |   | P10  | 31 mm             |                   |
|  |   | CIP5   | 25 mm             |                   |
| Pseudomonas aeruginosa ATCC 27833  |   | ATCC 27833   | RANGO             | CONFORME          |
|  |   | CN10   | 20 mm             |                   |
| Enterococcus faecalis ATCC 29212   | ANTIBIOTICO   | ATCC 29212   | RANGO             | CONFORME          |
|  |   | SXT 25   | 26 mm             |                   |
| % Productividad  |   | N/A  | N/A               | N/A               |
| Foto: El control de esterilidad es realizado en el Laboratorio de Medios de Cultivo del INSPI Quito.   |   |  |                   |                   |
| Liberado por:  | Dra. Q.F. Ivonne Gavilanes  | Firma:   |                   |                   |
| Responsable Plataforma de Medios de Cultivo:   | MGS. Q.F. Sandra Uruchima   | Firma:   |                   |                   |
| Está prohibida la reproducción total o parcial de este documento. La información contenida es de propiedad del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI Dr. Leopoldo Izquieta Pérez. |   |  |                   |                   |
| Firma de Recibido:   |   | Fecha:   | 22 - 05 - 18      |                   |

- Control de Calidad del Agar Nutritivo

|  |   |                                       |                   |            |
|--|---|---------------------------------------|-------------------|------------|
|  | <b>CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO</b><br>(sólidos - semisólidos - líquidos) |                                       | Código:           | F-MDC-032  |
|  |   |                                       | Edición:          | 03         |
|  | MACRO PROCESO:<br>Plataformas Compartidas   | PROCESO INTERNO:<br>Medios de Cultivo | Fecha Aprobación: | 16/04/2018 |

NOMBRE: Agar Nutritivo  
 LOTE: AN100518  
 FECHA DE REQUERIMIENTO:  
 FECHA DE ELABORACIÓN:  
 FECHA DE EXPIRACIÓN:  
 TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN:

CANTIDAD: 3 Unidades  
 16 de Mayo del 2018  
 10 de Mayo del 2018  
 10 de Junio del 2018  
 2-8 °C

| CARACTERÍSTICAS FÍSICAS |                           | RESULTADOS |
|-------------------------|---------------------------|------------|
| COLOR:                  | Amber Claro               | CONFORME   |
| VOLUMEN:                | 25 ml C/U aprox.          | CONFORME   |
| PRESENTACIÓN:           | Cajas Monopetrí Plásticas | CONFORME   |
| pH:                     | 7.0 ± 0.2 a 25°C          | 7.0        |

| CONTROL DE ESTERILIDAD A 35°C ± 2 °C POR 24 HORAS   |  | RESULTADOS |
|---|--|------------|
| A 36°C X 24 HORAS NO SE OBSERVO MACROSCÓPICAMENTE NI MICROSCÓPICAMENTE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS |  | N/A        |

| EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA CON INCUBACIÓN A 35°C ± 2 °C 48 HORAS (NORMA ISO/TS11133-2) |   |              |               | RESULTADOS |
|---|---|--------------|---------------|------------|
| Microorganismo  | Características Físicas / Características Químicas  | Selectividad | Productividad |            |
| Escherichia coli ATCC 25922   | MACROSCÓPICAMENTE PRESENTA COLONIAS CREMOSAS OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA CRECIMIENTO DE BACILOS GRAM NEGATIVOS | NO           | SI            | CONFORME   |
| Staphylococcus aureus ATCC 25923  | MACROSCÓPICAMENTE PRESENTA COLONIAS BLANCAS OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA CRECIMIENTO DE COCOS GRAM POSITIVOS    | NO           | SI            | CONFORME   |
| % Productividad   | Escherichia coli ATCC 25922   | 92%          |               | CONFORME   |

*Nota: El control de esterilidad es realizado en el Laboratorio de Medios de Cultivo del INSPI Quito. El certificado de control de calidad microbiológico solo respalda el parámetro de productividad de crecimiento de microorganismos.*

Liberado por: Dra. Q.F. Ivonne Gavilanes      Firma:

Responsable Plataforma de Medios de Cultivo: MGS. Q.F. Sandra Uruchima      Firma:

Está prohibida la reproducción total o parcial de este documento. La información contenida es de propiedad del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI Dr. Leopoldo Izquieta Pérez.

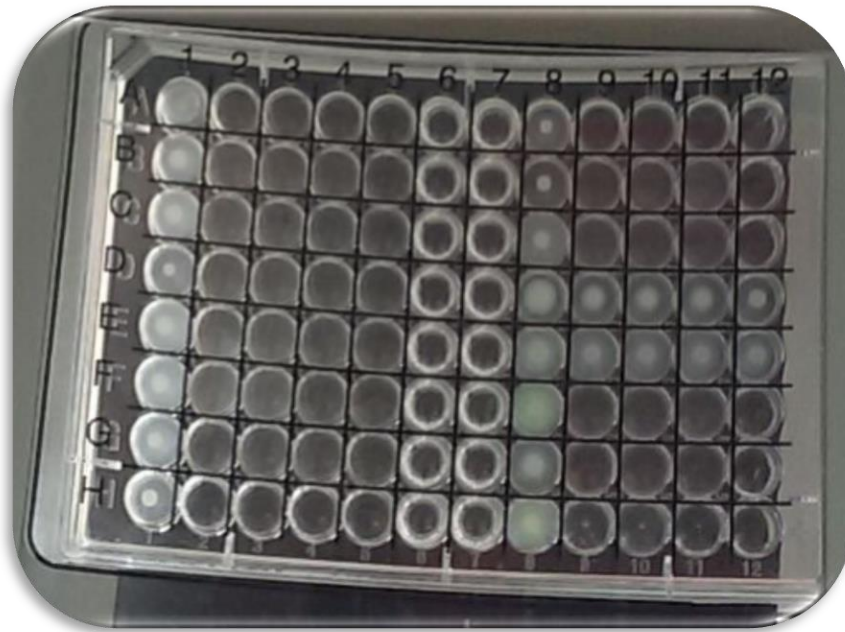
Firma de Recibido:      Fecha: 12-05-18

- Control de Calidad del Agar MacConkey

|   |   |                                       |                   |                   |
|---|---|---------------------------------------|-------------------|-------------------|
|   | <b>CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO</b><br>(sólidos - semisólidos - líquidos)         |                                       | Código:           | F-MDC-032         |
|   |   |                                       | Edición:          | 03                |
|   | MACRO PROCESO:<br>Plataformas Compartidas   | PROCESO INTERNO:<br>Medios de Cultivo | Fecha Aprobación: | 16/04/2018        |
| NOMBRE: Agar MacConkey<br>ITE: AMC100519<br>FECHA DE REQUERIMIENTO: 15 de Mayo del 2018<br>FECHA DE ELABORACIÓN: 10 de Mayo del 2018<br>FECHA DE EXPIRACIÓN: 10 de Junio del 2018<br>TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN: 2-8 °C                |   | CANTIDAD: 3 Unidades                  |                   |                   |
| <b>CARACTERÍSTICAS FÍSICAS</b>  |   |                                       |                   | <b>RESULTADOS</b> |
| COLOR:  | Rojo  |                                       |                   | CONFORME          |
| VOLUMEN:  | 25 ml C/U aprox.  |                                       |                   | CONFORME          |
| PRESENTACIÓN:   | Cajas Monopetri Plásticas   |                                       |                   | CONFORME          |
| pH:   | 7.1 ± 0.1 a 25°C  |                                       |                   | 7.1               |
| <b>CONTROL DE ESTERILIDAD A 35°C ± 2 °C POR 24 HORAS</b>  |   |                                       |                   | <b>RESULTADOS</b> |
| A 35°C X 24 HORAS NO SE OBSERVO MACROSCÓPICAMENTE NI MICROSCÓPICAMENTE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS   |   |                                       |                   | N/A               |
| <b>EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA CON INCUBACIÓN A 35°C ± 2 °C 48 HORAS (NORMA ISO/TS11133-2)</b>  |   |                                       |                   | <b>RESULTADOS</b> |
| Microorganismo  | Características Físicas / Características Químicas  | Selectividad                          | Productividad     |                   |
| Escherichia coli ATCC 25922   | MACROSCÓPICAMENTE PRESENTA COLONIAS ROSADAS OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA CRECIMIENTO DE BACILOS GRAM NEGATIVOS  | NO                                    | SI                | CONFORME          |
| Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853   | MACROSCÓPICAMENTE PRESENTA COLONIAS VERDOSAS OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA CRECIMIENTO DE BACILOS GRAM NEGATIVOS | NO                                    | SI                | CONFORME          |
| Staphylococcus aureus ATCC 25923  | SIN CRECIMIENTO BACTERIANO  | SI                                    | NO                | CONFORME          |
| % Productividad   | Escherichia coli ATCC 25922   | 87%                                   |                   | CONFORME          |
| Nota: El control de esterilidad es realizado en el Laboratorio de Medios de Cultivo del INSPI Quito. El certificado de control de calidad microbiológico solo respalda el parámetro de productividad de crecimiento de microorganismos. |   |                                       |                   |                   |
| Liberado por:   | Dr. Q.F. Ivonne Gavilanes   | Firma:                                |                   |                   |
| Responsable Plataforma de Medios de Cultivo:  | MGS. Q.F. Sandra Uruchima   | Firma:                                |                   |                   |
| Está prohibida la reproducción total o parcial de este documento. La información contenida es de propiedad del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI Dr. Leopoldo Izquieta Pérez.                                  |   |                                       |                   |                   |
| Firma de Recibido:  |   | Fecha:                                | 22-05-18          |                   |

**Anexo 9.** Fotos de placas de microdilución de CAZ/AVI.

En la siguiente imagen, se puede apreciar una placa de microdilución en caldo de CAZ/AVI, tanto los pocillos D (8) como el E (9) corresponden a MBL, es por eso, que en las diluciones continuas presentan crecimiento.



**Autora:** Pamela Moncayo, 2018

Imagen que corresponde a otra placa microdilucion de CAZ/AVI, en la cual en el pocillo D (1) se encuentra una MBL, y en el pocillo G (8) se encuentra la cepa control para MBL.

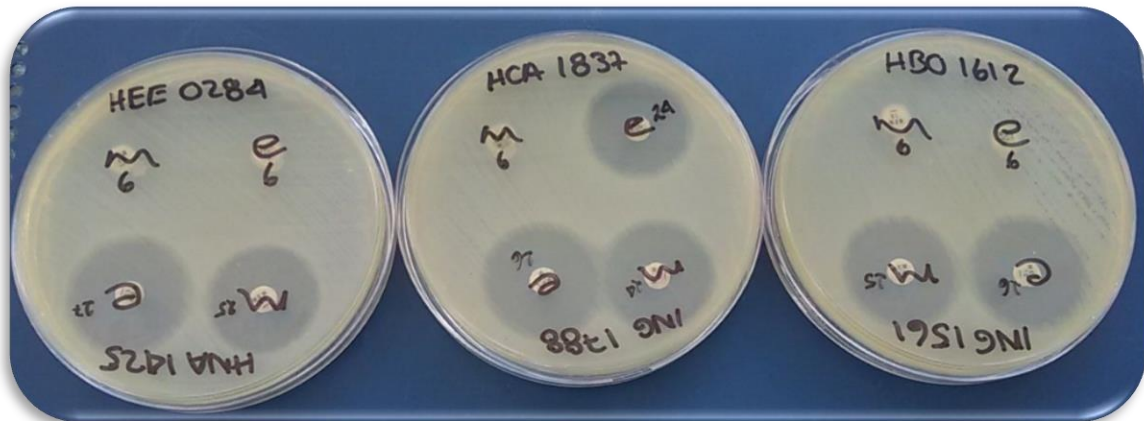


**Autora:** Pamela Moncayo, 2018

## Anexo 10. Técnica mCIM y eCIM

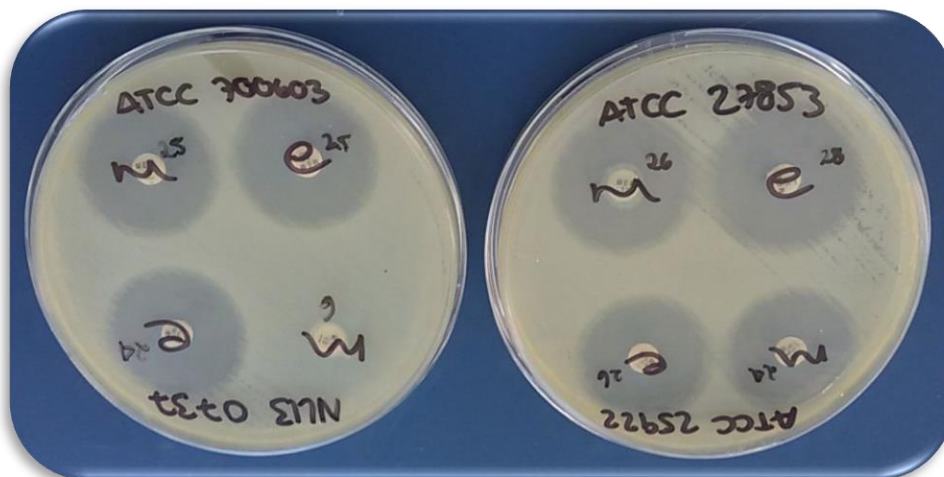
- Cepas de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* aplicadas con la técnica mCIM y eCIM.

En la siguiente imagen se puede apreciar una serin carbapenemasa representada con el código HEE 0284 y HBO 1612, una MBL con el código HCA 1837 y los códigos sobrantes no poseen actividad carbapenemasa.



Autora: Pamela Moncayo, 2018

- Controles de Calidad aplicados con la técnica mCIM y eCIM.



Autora: Pamela Moncayo, 2018

## **Anexo 11.** Protocolo de eliminación de desechos biológicos

- ❖ Los medios de cultivo listos para su eliminación serán transportados en contenedores, los mismos que serán auto clavados como medida de eliminación de microorganismos. En el caso de material de plástico, se emplearán bolsas autoclavables
- ❖ El material usado en la esterilización de material contaminado deberá ser resistente, para evitar riesgos de ruptura y derrame en la recolección y el transporte.
- ❖ Se deberá controlar la efectividad de la esterilización a través de indicadores físicos y químicos (cinta adhesiva)
- ❖ La esterilización se realiza en autoclave alcanzando los 121°C, en 1 hora.
- ❖ En caso del uso de objetos cortopunzantes como por ejemplo puntas de vidrio, inmediatamente después de utilizados se depositarán en recipientes de plástico duro o metal con tapa, con una abertura a manera de alcancía, que impida la introducción de las manos.
- ❖ Cabe indicar que el tratamiento de los desechos infecciosos y especiales se debe ejecutar en cada establecimiento de salud, en este caso el INSPI-CZ9, para lo que se tomará en cuenta el Reglamento para el Manejo de Desechos en Establecimientos de Salud, a fin a las disposiciones del Ministerio de Salud Pública.
- ❖ GADERE S.A es una empresa ecuatoriana que se encarga de la recolección y tratamiento de los desechos generados por el INSPI-CZ9. Esta empresa cuenta con la Licencia Ambiental a nivel nacional otorgada por el Ministerio del Medio Ambiente Resolución No. 118 con R.O. No. 491.

**Fuente:** OMS/PAHO