

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Tesis previa a la obtención del título de Magister en
Biología con mención en Ciencias Biomédicas**

**Caracterización fenotípica y genotípica de determinantes
de resistencia a antimicrobianos en bacterias patógenas**

Sandra Balvina Tamami Tualombo

Directora: Iliana del Rocío Alcocer Negrete

Quito, 2024

Certifico que la Tesis del Programa de Maestría en Biología con mención en con mención en Ciencias Biomédicas de la Srta. Sandra Balvina Tamami Tualombo ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Iliana Alcocer Negrete

Directora de la Tesis

Quito, 7 de octubre de 2024

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Sandra Balvina Tamami Tualombo, identificado con Cédula Nro. 0202134243, egresado del programa de Maestría en Biología mención en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, declaro bajo juramento que:

Soy autor del trabajo titulado: “Caracterización fenotípica y genotípica de determinantes de resistencia a antimicrobianos en bacterias patógenas”, el mismo que presento bajo la modalidad de trabajo de tesis para optar por el título de profesional de Magister.

El texto de mi trabajo final respetó y no vulnera los derechos de terceros. En tal sentido su información no ha sido plagiada total ni parcialmente, respetando las normas internacionales de citas y referencias bibliográficas. Declaro que los contenidos, resultados, conclusiones y demás información presentada son de mi exclusiva responsabilidad legal y académica.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador la publicación de mi Trabajo de Titulación, en el Repositorio Digital Institucional – Biblioteca Virtual –, después de cumplidos los detalles del Anexo relacionado al embargo de la información no publicada.

En la ciudad de Quito, a los trece días del mes de septiembre de 2024.



Sandra Balvina Tamami Tualombo

C.I. 020213424-3

DECLARACIÓN DE APORTES DE TERCEROS

En la elaboración de esta tesis titulada “**Caracterización fenotípica y genotípica de determinantes de resistencia a antimicrobianos en bacterias patógenas**”, he contado con la colaboración y apoyo de diversas personas, cuyas contribuciones han sido fundamentales para el desarrollo y culminación de este trabajo de investigación. A continuación, detallo sus aportes específicos:

1. **Dra. Iliana Del Rocío Alcocer Negrete**, Directora de tesis. Supervisión y orientación académica durante todo el proceso de investigación. Revisión crítica de los capítulos y sugerencias para mejorar la estructura y contenido del documento.
2. **M. Sc. María Fernanda Yauri Bucheli**. Apoyo en el proceso de la investigación y la facilitación de los equipos utilizados para el desarrollo de mi investigación en el Laboratorio de Microbiología de la escuela de Ciencias Biológicas.
3. **Lcdos. David Arregui, Paul Vargas e Isaac Ñacata**. Asistencia en el desarrollo de mi trabajo investigativo y aporte de conocimientos.
4. **Pontificia Universidad Católica del Ecuador**. Por sus destacados docentes e investigadores que compartieron sus conocimientos teóricos y prácticos en el desarrollo de mi perfil profesional

Agradezco profundamente a todas las personas mencionadas y Colección Bacteriana - Quito Católica (CB-QCA) del Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, sin los cuales esta investigación no habría sido posible.

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está dedicado a mi Familia y amigos por todo el apoyo incondicional y constante que me supieron dar, y de manera especial a mis padres que son un ejemplo de vida, enseñándome cada día a ser una mejor persona, por los valores inculcados, el amor y respeto el cual me siento afortunada de tenerlos. A mis dos ángeles guardines que desde el cielo me cuidan, mi padrino Manuel Pachala y mi abuelito Venacio Tualombo, y a Dios por darme la fortaleza de seguir adelante.

RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una importante amenaza para la salud pública mundial, que dificulta el uso de antimicrobianos para el tratamiento de infecciones bacterianas. En este estudio se caracterizaron los perfiles fenotípicos y genotípicos de los determinantes de la resistencia a los antimicrobianos en bacterias de origen clínico procedentes de procesos infecciosos de pacientes atendidos en hospitales de Quito, Ecuador. Se analizaron 9 aislados bacterianos seleccionados de la Colección Bacteriana - Quito Católica (CB-QCA) del Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, preservadas a -20°C y -80°C . Se analizaron: un aislado de *E. coli*, tres aislados de *Klebsiella pneumoniae*, dos *Proteus mirabilis* y tres *Pseudomonas aeruginosa*. Las pruebas de sensibilidad antibiótica fenotípica y las pruebas de mCIM y eCIM se realizaron mediante el método de difusión en disco. La caracterización genotípica de los genes de resistencia a betalactámicos y carbapenemasas se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los resultados revelaron una alta prevalencia de resistencia entre los aislados, siendo los β -lactámicos, las quinolonas y los aminoglucósidos las clases de antibióticos más comúnmente detectados. Los hallazgos resaltan la necesidad de una vigilancia continua de los patrones de resistencia a los antimicrobianos.

Palabras clave: Enterobacterias; genes de resistencia; betalactámicos; carbapenemasas; β -lactamasas (BLEE); serin β -lactamasas, metalo β -lactamasas.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) is a major global public health threat, hampering the use of antimicrobials for the treatment of bacterial infections. In this study, we characterized the phenotypic and genotypic profiles of antimicrobial resistance determinants in clinically derived bacteria from infectious processes in patients treated in hospitals in Quito, Ecuador. Nine bacterial isolates selected from the Catholic Bacterial Collection - Quito (CB-QCA) of the Microbiology Laboratory of the Pontifical Catholic University of Ecuador, preserved at -20°C and -80°C , were analyzed. One *E. coli* isolate, three *Klebsiella pneumoniae* isolates, two *Proteus mirabilis* isolates, and three *Pseudomonas aeruginosa* isolates were analyzed. Phenotypic antibiotic susceptibility testing and mMIC and eMIC tests were performed using the disk diffusion method. Genotypic characterization of beta-lactam and carbapenemase resistance genes was performed by polymerase chain reaction (PCR). The results revealed a high prevalence of resistance among isolates, with β -lactams, quinolones and aminoglycosides being the most commonly detected antibiotic classes. The findings highlight the need for continued surveillance of antimicrobial resistance patterns.

Keywords: Enterobacteriaceae; resistance genes; beta-lactams; carbapenemases; β -lactamases (ESBL); serine β -lactamases, metallo β -lactamasas.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar de forma fenotípica y genotípica determinantes de resistencia a antimicrobianos en bacterias patógenas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar la identificación bioquímica de los aislados bacterianos patógenas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.
- Confirmar la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), serin β -lactamasas, metalo β - lactamasas mediante pruebas fenotípicas.
- Confirmar la presencia de genes que codifican β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), genes que codifican serin β -lactamasas y genes que codifican metalo β -lactamasas mediante reacción en cadena de la polimerasa.

DESCRIPCIÓN DEL MANUSCRITO

El presente manuscrito, titulado “**Caracterización fenotípica y genotípica de determinantes de resistencia a antimicrobianos en bacterias patógenas**”, ha sido presentado para consideración de publicación de la Revista Bionatura Journal – Ibero – American Journal of Biotechnology and Life Sciences. El manuscrito ha sido escrito siguiendo los lineamientos de la revista que se encuentran disponibles en el siguiente [enlace](https://revistabionatura.com/). <https://revistabionatura.com/>

La revista Revista Bionatura Journal – Ibero – American Journal of Biotechnology and Life Sciences se encuentra indexada en la base de datos de Scopus, de acuerdo a la información del siguiente [enlace](#).

MANUSCRITO

A continuación, a manera de anexo, se incluye en manuscrito enviado a la revista científica Revista Bionatura Journal – Ibero – American Journal of Biotechnology and Life Sciences.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE DETERMINANTES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN BACTERIAS PATÓGENAS

Sandra Balvina Tamami Tualombo¹, Iliana Del Rocío Alcocer Negrete¹, María Fernanda Yauri Bucheli¹

¹Pontificia Universidad Católica del Ecuador | PUCE – Quito. sbtamami@puce.edu.ec

RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una importante amenaza para la salud pública mundial, que dificulta el uso de antimicrobianos para el tratamiento de infecciones bacterianas. En este estudio se caracterizaron los perfiles fenotípicos y genotípicos de los determinantes de la resistencia a los antimicrobianos en bacterias de origen clínico procedentes de procesos infecciosos de pacientes atendidos en hospitales de Quito, Ecuador. Se analizaron 9 aislados bacterianos seleccionados de la Colección Bacteriana - Quito Católica (CB-QCA) del Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, preservadas a -20°C y -80°C. Se analizaron: un aislado de *E. coli*, tres aislados de *Klebsiella pneumoniae*, dos *Proteus mirabilis* y tres *Pseudomonas aeruginosa*. Las pruebas de sensibilidad antibiótica fenotípica y las pruebas de mCIM y eCIM se realizaron mediante el método de difusión en disco. La caracterización genotípica de los genes de resistencia a betalactámicos y carbapenemasas se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los resultados revelaron una alta prevalencia de resistencia entre los aislados, siendo los β -lactámicos, las quinolonas y los aminoglucósidos las clases de antibióticos más comúnmente detectados. Los hallazgos resaltan la necesidad de una vigilancia continua de los patrones de resistencia a los antimicrobianos.

Keywords: Enterobacterias; genes de resistencia; betalactámicos; carbapenemasas; β -lactamasas (BLEE); serin β -lactamasas, metalo β -lactamasas.

ABSTRACT:

Antimicrobial resistance (AMR) is a major global public health threat, hampering the use of antimicrobials for the treatment of bacterial infections. In this study, we characterized the phenotypic and genotypic profiles of antimicrobial resistance determinants in clinically derived bacteria from infectious processes in patients treated in hospitals in Quito, Ecuador. Nine bacterial isolates selected from the Catholic Bacterial Collection - Quito (CB-QCA) of the Microbiology Laboratory of the Pontifical Catholic University of Ecuador, preserved at -20°C and -80°C, were analyzed. One *E. coli* isolate, three *Klebsiella pneumoniae* isolates, two *Proteus mirabilis* isolates, and three *Pseudomonas aeruginosa* isolates were analyzed. Phenotypic antibiotic susceptibility testing and mCIM and eCIM tests were performed using the disk diffusion method. Genotypic characterization of beta-lactam and carbapenemase resistance genes was performed by polymerase chain reaction (PCR). The results revealed a high prevalence of resistance among isolates, with β -lactams, quinolones and aminoglycosides being the most commonly detected antibiotic classes. The findings highlight the need for continued surveillance of antimicrobial resistance patterns.

Keywords: Enterobacteriaceae; resistance genes; beta-lactams; carbapenemases; β -lactamases (ESBL); serine β -lactamases, metallo β -lactamases.

INTRODUCCIÓN:

La resistencia a los antimicrobianos está aumentando en todo el mundo a niveles alarmantes y constituye uno de los problemas de salud más frecuentes en la actualidad. Según la Organización Mundial de la Salud, OMS, la resistencia antimicrobiana es una emergencia de salud pública. Actualmente en todo el mundo se propagan nuevos mecanismos de resistencia bacteriana y ponen en riesgo la eficacia en el tratamiento de enfermedades infecciosas comunes en nuestra sociedad¹.

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es la capacidad que tienen las bacterias, los virus, los hongos y los parásitos de permanecer inmune a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de los antibióticos y otros medicamentos antimicrobianos ¹.

La resistencia a los antimicrobianos puede ser intrínseca o adquirida. Los mecanismos de resistencia intrínseca son de origen natural y se deben a los rasgos genéticos propios de cada microorganismo. La resistencia intrínseca es propia de cada bacteria por ejemplo, todos los Gram negativos son resistentes a la vancomicina, y esta situación no es variable. Se transmite de generación en generación de forma vertical. La resistencia adquirida es variable y puede producirse a través de mutaciones, por cambios en la secuencia de bases del ADN, o por transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias. En este último caso, la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético móvil como transposones e integrones ^{2,3}.

La transferencia horizontal de genes constituye una ruta altamente eficaz para la diseminación de genes de resistencia ya que, no solo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas mediante estas estructuras genéticas móviles. Donde juega un papel protagónico los plásmidos, transposones e integrones⁴esto que permite la dispersión de la resistencia y favorece la aparición de brotes a nivel hospitalario. El uso indiscriminado e inapropiado de antibióticos, combinado con un control deficiente de infecciones intrahospitalarias, es uno de los factores que contribuyen a la diseminación de los mecanismos de resistencia^{5 6}.

La resistencia microbiana adquirida ha estado presente en el campo de las enfermedades infecciosas desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 y su producción a principios de la década de los 40s marcaron los inicios de la era de los antibióticos en el uso clínico ⁷

Las enterobacterias son un grupo diverso y ampliamente distribuido en la naturaleza. El 80% corresponden a los aislamientos Gram negativos en enfermedades humanas. En general, las enterobacterias causantes de infecciones han desarrollado mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos. El más importante de estos mecanismos es la producción de enzimas betalactamasas; estas enzimas son de naturaleza proteica y son codificadas por genes de origen cromosómico o plasmidial ⁵.

Los antibióticos betalactámicos representan el principal grupo de antibióticos más seguros, eficaces y ampliamente utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas ⁸. Estos agentes actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana como resultado de su fuerte unión covalente a las proteínas ligadoras de penicilina PBP (por sus siglas en inglés “penicillin-binding-proteins”) ⁹que catalizan una serie de reacciones de

transpeptidación y carboxilpeptidación necesarias para la síntesis de la pared celular y además activan una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano¹⁰.

Los antibióticos betalactámicos tienen una estructura común llamada anillo betalactámico. La presencia de grupos sustitutivos unidos al anillo betalactámico establece su clasificación en: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactámicos. Las penicilinas han sido, por largo, tiempo el tratamiento de elección para infecciones humanas. Las cefalosporinas tienen un gran abanico de acción y pueden ser de primera, segunda, tercera, cuarta y quinta generación¹¹. Los carbapenemes se usan en infecciones intrahospitalarias y en infecciones causadas por bacterias resistentes a quinolonas, aminoglucósidos y otros antibióticos de amplio espectro¹².

Se han descrito alrededor de 8100 betalactamasas¹³. Las betalactamasas son enzimas bacterianas que inactivan a los antibióticos betalactámicos por hidrólisis. Se han clasificado de acuerdo a dos esquemas generales; la clasificación molecular de Ambler y el sistema de clasificación funcional de Bush–Jacoby–Mideros¹⁴. Para el presente estudio tomaremos en consideración la clasificación de Ambler.

"Ambler (1980) propuso una clasificación de betalactamasas en cuatro clases (A, B, C, D) basándose en similitudes aminoacídicas. Las clases A, C y D son serin-betalactamasas, mientras que la clase B son metalo-betalactamasas, diferenciándose por el mecanismo de hidrólisis del anillo betalactámico: serina en el sitio activo para las primeras y un ion zinc para las últimas¹⁵.

"Las betalactamasas de clase A, como TEM, SHV, GES y CTX-M, se encuentran en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, codificadas en plásmidos y cromosomas." En la clase D, OXA-48 es común en enterobacterias. Las enzimas de clase C, BLEE y carbapenemasas son de mayor interés en Enterobacterias¹⁶.

Las betalactamasas de clase A son las más diversas, incluyendo enzimas como KPC¹⁷, que hidrolizan casi todos los betalactámicos. Las de clase B (metalo-betalactamasas) como IMP, VIM y NDM son inhibidas por quelantes metálicos^{18 19}.

Este estudio tuvo como objetivo caracterizar los perfiles fenotípicos y genotípicos de los determinantes de resistencia a antimicrobianos en bacterias clínicas aisladas de pacientes atendidos en la red hospitalaria de Quito.

Debido a la gran diversidad de estas enzimas que hidrolizan β -lactámicos y a su importancia en la clínica se han planteado los siguientes objetivos en esta tesis.

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar de forma fenotípica y genotípica determinantes de resistencia a antimicrobianos en bacterias patógenas.

Objetivo Específicos:

Confirmar la identificación bioquímica de los aislados bacterianos patógenas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Confirmar la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), serin β -lactamasas, metalo β -lactamasas mediante pruebas fenotípicas.

Confirmar la presencia de genes que codifican β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), genes que codifican serin β -lactamasas y genes que codifican metalo β -lactamasas mediante reacción en cadena de la polimerasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudios y aislados bacterianos

La población de estudio para llevarse a cabo esta investigación se constituyó por aislados bacterianos de origen clínico previamente seleccionada de la Colección Bacteriana - Quito Católica (CB-QCA) del Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Se seleccionaron 9 aislados bacterianos: 1 aislado de *Escherichia coli*, 2 aislados de *Proteus mirabilis*, 3 aislados de *Klebsiella pneumoniae*. Además 3 aislados de *Pseudomonas aeruginosa*. Los aislados seleccionados son productores de betalactamasas tipo serin β -lactamasas y metalo β -lactamasas (MBL), β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Reidentificación de los aislados bacterianos

Para la reidentificación de los aislados bacterianos seleccionados se encontraron preservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, el proceso de reactivación de los aislados comienza con la transferencia de los cultivos congelados a tubos con caldo BHI (por sus siglas en inglés, Brain Heart Infusion), que fueron posteriormente incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas. Esta etapa fue crucial para asegurar que las bacterias se encontraran en condiciones óptimas de crecimiento y reproducción.

Una vez activados los aislados en medios de cultivo de caldo BHI, se procedió a cultivar las bacterias en agar nutriente, agar eosina azul de metileno (EMB), agar cetramida o agar Hektoen (DifcoTM) a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

La identificación de los aislados entéricas se realizó mediante pruebas bioquímicas específicas, como el Agar Citrato de Simmons (CIT), Sulfuro, Indol y Motilidad (SIM), Hierro-Triple azúcar (TSI), Rojo de metilo (RM), Voges Proskauer (VP), Urea (U), Fenilalanina (FA) y Motilidad, Indol y Lisina (MILI). Estas pruebas

permitieron determinar características bioquímicas importantes de las bacterias, como su capacidad de fermentación de carbohidratos, producción de enzimas y metabolismo de compuestos nitrogenados.

Mientras que para las *Pseudomonas aeruginosa* fue identificada mediante la prueba de citocromo oxidasa mediante el uso de las tirillas de oxidasa (Hardy Diagnostics OxiStrips™). Procedimiento que consistió en impregnar una parte de las tirillas con una pequeña cantidad de colonias que fueron aisladas; transcurrido 2 minutos indicando un color azul-violeta, color característico de las *Pseudomonas aeruginosa*. Posteriormente se sometieron a pruebas bioquímicas; En primer lugar la prueba Motilidad-Indol-Ornitina (MIO), esta se realizó a partir del cultivo puro de *Pseudomonas aeruginosa* con asa bacteriológica mediante punción profunda en línea recta en el tubo que contiene el agar, donde se observó si hay un crecimiento doble alrededor de la línea de inoculación; y finalmente se sometió a la prueba MILI, el procedimiento de esta, es similar a la prueba de MIO, donde se determina la motilidad y la producción de indol de un microorganismo, determinando la producción de enzima lisina descarboxilasa y se visualizó una coloración purpura en el medio de cultivo revelando un resultado positivo para *Pseudomonas aeruginosa*.

Confirmación por espectrometría de masas (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI-TOF)

La espectrometría de masas por desorción/ionización asistida por láser y tiempo de vuelo (MALDI-TOF) ha emergido como una herramienta poderosa y ampliamente utilizada para la identificación rápida y precisa de bacterias²⁰.

En este estudio, se empleó la técnica MALDI-TOF para la identificación confirmatoria de 9 aislados bacterianos. El análisis se realizó en el Centro de Investigación Microbiológica, ubicado en la ciudad de Guayaquil.

Confirmación fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

La detección precisa de BLEE es fundamental para el manejo adecuado de las infecciones causadas por bacterias productoras de estas enzimas.

En este contexto, la prueba de difusión en disco con antibióticos β -lactámicos y β -lactámicos combinados con inhibidores como el ácido clavulánico constituye un método fenotípico efectivo para la detección inicial de BLEE. Este texto describe detalladamente la metodología para realizar esta prueba, siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)²¹.

Los aislados bacterianos fueron sembrados con estría continua en cajas Petri con agar nutriente a 37 °C por un periodo de 18 a 24 horas para la obtención de colonias aisladas. Obtenidas las colonias, se tomaron alrededor de 4 a 5 colonias que fueron suspendidas en 200 μ L de caldo Müeller Hinton (MHB) estéril contenido en una cubeta para eppendorf descartable. Por espectrofotometría se calculó el índice de refracción hasta alcanzar una medida de turbidez del 0,5 de la escala de McFarland o una densidad óptica de 0,61 – 0,63 en espectrofotómetro (BioPhotometer plus) a una longitud de onda de 620 nm. Una vez ajustada la turbidez, esta suspensión se sembró en placas de Müeller Hinton (MHA), con ayuda de un cotonete estéril, en 3 direcciones (horizontal, vertical y diagonal) sobre la superficie de una placa de agar Müeller Hinton (MHA). Luego se colocaron los discos de antibióticos con la ayuda de una pinza estéril en un periodo de tiempo que no sobrepase los 10 a 15 minutos. Los discos que fueron usados en la detección de BLEE son: ceftazidima (30

μg) y cefotaxima (30 μg), Ceftazidima/Ácido Clavulánico (30 $\mu\text{g}/10 \mu\text{g}$), Cefotaxima/Ácido Clavulánico (30 $\mu\text{g}/10 \mu\text{g}$), que han sido colocadas en la superficie del MHA con siembra en césped. Después de incubar a 37 °C durante 18 - 24 horas se midió el diámetro de los halos de inhibición y el reporte de sensibilidad sigue lo dispuesto por el CLSI en el año 2023.

Confirmación fenotípica de serin β -lactamasas

La prueba que detectó serin β -lactamasas en enterobacterias es la prueba mCIM. Resumiendo, se realizó a las bacterias en placas de agar sangre que fueron incubadas a 37 °C por toda la noche. Las colonias fueron transferidas a tubos que contenían 2 ml de caldo Trypticasa de Soya (TSB) estéril y mezclas con agitación por vórtex durante 10 a 15 segundos. A continuación, se agregó a la bacteria suspendida en caldo, un disco de meropenem (10 μg) con ayuda de una pinza estéril. Posteriormente, se incubó a 35 °C \pm 2 °C durante 4 horas \pm 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se preparó una suspensión bacteriana al 0,5 de McFarland de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 en solución salina. En una placa de Müller Hinton Agar (MHA) se inoculó la suspensión de *Escherichia coli* ATCC 25922 siguiendo la normativa para el proceso de difusión en disco. Esto se desarrolló durante los primeros 15 minutos posteriores a la preparación del inóculo de *E. coli*. La placa inoculada se secó por 3 – 10 minutos antes de ser agregado el disco de meropenem. Transcurrido el tiempo, se removió el disco de meropenem (10 μg) inmerso en el caldo TSB, utilizando pinzas estériles o empleando un asa bacteriológica. El exceso de caldo en el disco se retiró presionándolo contra las paredes del tubo de ensayo. El disco de meropenem (10 μg) fue colocado sobre el agar Müller-Hinton previamente inoculando con *E. coli*. En una placa de 100 mm de diámetro se logró analizar hasta 4 discos. Las placas de agar Müller-Hinton serán incubadas a 35°C \pm 2°C por 18 - 24 horas. Después de la incubación se midió las zonas de inhibición siguiendo los parámetros establecidos para el método de rutina de difusión en disco siguiendo las recomendaciones del CLSI, 2024.

Aislado positivo a la presencia de Serin β -lactamasas:

El diámetro de la zona de inhibición fue de 6 – 15 mm o se registró la presencia de colonias dentro de una zona de 16-18 mm. Si el aislado de prueba produce una carbapenemasa, el meropenem en el disco se hidrolizará y no habrá inhibición o una inhibición limitada del crecimiento de la *E. coli* ATCC 25922 susceptible al meropenem.

Aislado negativo a la presencia de Serin β -lactamasas:

La zona de inhibición será de ≥ 19 mm. Se observó una zona clara libre de crecimiento microbiano.

Confirmación fenotípica de metalo β -lactamasas (eCIM)

Los aislados que presenten resultados positivos en la prueba inicial se sometieron a un análisis complementario denominado eCIM (EDTA-modified carbapenem inactivation method), con el objetivo de confirmar la presencia de metalo- β -lactamasas. Este análisis se complementa con el método mCIM (Modified Carbapenem Inactivation Method), el cual también permitieron la detección de estas ^{22, 23}.

En el método de eCIM se suspendieron colonias bacterianas en tubos con 2mL de caldo TSB, se adicionó 20 μ L de EDTA 0,5 M y se homogenizó para obtener una concentración final EDTA 5mM. El método de eCIM se realizó conjuntamente con el método mCIM. En la interpretación de resultados se observó:

Aislado positivo a la presencia de Metalo β -lactamasas (MBL):

Un incremento de la zona de inhibición ≥ 5 mm de eCIM vs. mCIM. Si el aislamiento produce Metalo β -lactamasas (MBL), la actividad de la carbapenemasa será inhibida por el EDTA, de manera que el meropenem (10 μ L) contenido en el disco no estará tan eficiente hidrolizado como en la muestra sin EDTA. Como resultado es la inhibición del crecimiento del aislamiento indicador (*E. coli* ATCC 25922) y un incremento de la zona de inhibición para el eCIM comparado a la zona de inhibición de mCIM. Siguiendo las recomendaciones del CLSI,2024.

Aislado negativo a la presencia de Metalo β -lactamasas (MBL):

Se observó un incremento de la zona de inhibición ≤ 4 mm de eCIM vs la zona de inhibición generada por mCIM. Si el aislamiento produce una serin carbapenemasa la actividad hidrolítica de la enzima no se vió afectada por la presencia de EDTA, por lo que hubo una diferencia muy marginal entre el resultado de la zona de inhibición de eCIM vs mCIM. Siguiendo las recomendaciones de CLSI, 2024.

Confirmación genotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

La identificación genotípica de los aislados se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los genes codificantes de β -lactalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) que fueron analizados son: *bla*CTX-M, *bla*TEM, *bla*SHV ²⁴.

Para las reacciones de amplificación se empleó un volumen final de 25 μ l de reacción: 12,5 μ l de GoTaq® Green Master Mix, 1 μ l de cebador forward, 1 μ l de cebador reverse, 1 μ l de ADN bacteriano y 9,5 μ l de agua grado molecular. Las condiciones de amplificación seguirán las especificaciones del fabricante de la GoTaq® Green Master Mix (Promega).

Los cebadores empleados en el proceso de PCR fueron: *bla*CTX-M), *bla*SHV, *bla*TEM (Tabla 1).

Tabla 1 Cebadores y condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de betalactamasas

Gen	Cebadores	Secuencias de los cebadores (5'-3')	Tamaño Amplicón en (pb)	Condiciones de amplificación	Bibliografía
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M F CTX-M R	ATGGTTAAAAAATCACTG TTACAAACCGTYGGTGAC	900pb	DSNTi, 95 °C por 2 min 95 °C/ 30 s 43 °C/30 s a 35 ciclos 72 °C/30 s 72 °C / 5 min	²⁵
<i>bla</i> _{SHV}	SHV F SHV R	TTTATCGGCCYTCCTCAAGG GCTGCGGGCCGGATAACG	990 pb	DSNTi, 94 °C por 2 min 94 °C/ 30 s 55 °C/30 s a 30 ciclos 72 °C/ 1min 72 °C / 7 min	²⁶
<i>bla</i> _{TEM}	TEM F TEM R	ATAAAATTCTTGAAGACGAA GACACTTACCAATGCTTAATC	1000pb	DSNTi, 94 °C por 2 min 95 °C/ 30 s 54 °C/30 s a 30 ciclos 72 °C/ 30 s 72 °C / 5 min	²⁷
<i>bla</i> _{KPC}	KPC F KPC R	CGGAACCATTTCGCTAAACTC GGCCTCGCTGTRCTTGTCAT	700pb	DSNTi, 94 °C por 5 min 94 °C/ 30 s 55 °C/30 s a 30 ciclos 72 °C/ 30 s 72 °C / 7 min	²⁶
<i>bla</i> _{GES}	GES R GES F	CTATTTGTCCGTGCTCAGG ATGCGCTTCATTCACGCAC	800pb	DSNTi, 95 °C por 2 min 95 °C/ 30 s 53 °C/30 s a 30 ciclos 72 °C/ 30 s 72 °C / 7 min	²⁶
<i>bla</i> _{VIM}	VIM R VIM F	TGGGCCATTTCAGCCAGATC ATGGTGTTTGGTTCGCATATC	400pb	DSNTi, 95 °C por 5 min 94°C/ 1min 52 °C/ 1min a 30 ciclos 72 °C/ 1min 72 °C / 7 min	²⁶

DSTNi, desnaturalización inicial; s, segundos; pb, pares de base.

Confirmación genotípica de serin β -lactamasas

Las reacciones de amplificación para los genes codificantes de serin β -lactamasas se emplearon las mismas concentraciones y volúmenes descritas anteriormente.

Los cebadores empleados en el proceso de PCR fueron: *blaKPC*; *blaGES*; *blaOXA-48*.

Confirmación genotípica de metalo β -lactamasas

Las reacciones de amplificación para los genes codificantes de metalo β -lactamasas se emplearon las mismas concentraciones y volúmenes descritas anteriormente.

Los cebadores empleados en el proceso de PCR fueron:

blaVIM F, *blaVIM R*; *blaIMP-AF*, *blaIMP-AR*; *blaNDM-New-R*, *blaNDM-New-F*

RESULTADOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los 9 aislados bacterianos patógenos que fueron tomados de la Colección Bacteriana - Quito Católica (CB-QCA) del Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador corresponden: 1/9 (11,0 %) aislado de *Escherichia coli*, 2/9 (22,0 %) aislados de *Proteus mirabilis*; 3/9 (33,0 %) aislados de *Pseudomonas aeruginosa* y 3/9 (33,0 %) aislados de *Klebsiella pneumoniae*. Confirmados por análisis fenotípico por pruebas bioquímicas y por el análisis de MALDI-TOF. Todos los aislados fueron confirmados según su identificación y registro en la Colección Bacteriana Quito, Católica original.

El origen de los aislados bacterianos indicó que: 1/9 (11,1 %) fué obtenida a partir de la muestra de líquido sublingual; líquido peritoneal 1/9 (11,1%); aspirado traqueal 1/9 (11,1 %); orina 2/9 (22,2 %); pollo/hisopado cloacal 2/9 (22,2 %); herida 1/9 (11,1 %); sonda 1/9 (11,1 %).

Confirmación fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en enterobacterias

Como resultados en los aislados enterobacterias se encontraron que las 3 *Klebsiella pneumoniae* seleccionadas presentaron resistencia Ampicilina (AMP) (penicilina), 2 a la Amoxicilina/clavulánico (AMC) (agentes combinados de β -lactámicos), 3 a Cefotaxime (CTX) (cefalosporina), 2 a Meropenem (MEM), 2 a Imepenem (IMP) (carbapenemas), 3 a Aztreonam (ATM) (monobactámico), 3 a Tobramycim (Top) (aminoglucósido), 3 Azitromicina (AZM) (nuevo macrólido), y 3 a Ciprofloxacina (CIP) (Quinolona); aislados intermedios 2 a Amoxicilina/clavulánico (AMC) (agentes combinados de β -lactámicos), 2 a Imepenem (IMP) (carbapenemasas) y por ultimo sensibilidad, 1 a meropenem (MEM) (carbapenemasas) y 3 a Tetraciclina (TE). Con relación a la *Escherichia coli* se encontraron resistencia: a la Ampicilina (AMP) (penicilinas), Amoxicilina/clavulánico (AMC) (agentes combinados de β -lactámicos), Tetraciclina (TE), Cefotaxime (CTX) (cefalosporina); y muestran sensibilidad al meropenem (MEM), Imepenem (IMP) (carbapenemasas), Aztreonam (ATM) (monobactámico), Tobramycim (Top) (aminoglucósido), Azitromicina (AZM) (nuevo macrólido) y Ciprofloxacina (CIP) (quinolona). De acuerdo a los 2 *Proteus mirabilis* se registraron resistencia: 2 a la Ampicilina (AMP)(penicilina), 2 a la Tobramycim (Top) (aminoglucósido), 2 a la Tetraciclina (TE), 2 a la Ciprofloxacina (CIP) (quinolona) y 1 a la Cefotaxime (CTX) (cefalosporina); y sensibilidad a: Amoxicilina/clavulánico (AMC) (agentes combinados de β -lactámicos), meropenem (MEM), Imepenem (IMP) (carbapenemasa), Aztreonam (ATM) (monobactámicos) y Azitromicina (AZM) (nuevo macrólido).

En la identificación de aislados productores de BLEE se realizó con los antibióticos más el inhibidor acuerdo a las recomendaciones de CLSI: ceftazidima (30 µg); Ceftazidima/Ácido Clavulánico (30 µg/10 µg); cefotaxima (30 µg); Cefotaxima/Ácido Clavulánico (30 µg/10 µg); donde se encontró que son productores de BLEE, presentando un halo de inhibición igual o superior a 5mm en relación al antibiótico y al antibiótico y su inhibidor: Ceftazidima y Ceftazidima/Ácido Clavulánico, así como cefotaxima (30 µg) y Cefotaxima/Ácido Clavulánico (30 µg/10 µg). Estos presentaron halos comparativos con su inhibidor superiores a 5 mm.

Confirmación fenotípica de serin β-lactamasas (mCIM) y metalo β-lactamasas (eCIM)

Mediante la prueba de mCIM que se detectó serin β-lactamasas se encontró que 5/9 (50,0 %) son positivos del total de los aislados bacterianos. Donde 2/9 (22,2 %) corresponde a *Klebsiella pneumoniae*; 1/9 (11,1 %), *P. mirabilis*; *P. aeruginosa* 2/9 (22,2 %). Y no son productores de serin β-lactamasas 4/9 (40,0 %); 1 aislado de *Klebsiella pneumoniae*; 1 aislado de *E. coli*; 1 aislado de *P. mirabilis*; 1 aislado de *P. aeruginosa*.

En la prueba de eCIM que se realizó, se identificó que los aislados bacterianos no son productores de metalo β-lactamasas (Tabla 2 y Figura 1,2).

Resistencia bacteriana en *Pseudomonas aeruginosa*

Se encontró que de los tres aislados de *P. aeruginosa* analizados dos son resistentes a todos los antibióticos probados. Se reportó resistencia a piperacilina/tazobactam (penicilina con agente combinado), Ceftazidime (cefalosporina), aztreonam (monobactámico), imipenem y meropenem (cabapenemes) amikacina y tobramicina (aminoglucósido y ciprofloxacina y norfloxacina (floroquinolonas). Un aislado es sensible a Aztreonam e intermediariamente resistente a Piperacillin/Tazobactan y Ceftazidime.

TABLA N°2

Confirmación fenotípica de la producción de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), serin β-lactamasas (mCIM) y metalo β-lactamasas (eCIM) para los 6 aislados estudiados

CÓDIGO PUCE	IDENTIFICACION MADI-TOF	Aumento en el halo entre CAZ y CZC (mm)	Aumento en el halo entre CTX y CTC (mm)	CRITERIO CAZ - CZC	CRITERIO CTX y CTC	BLEE
CB-QCA 3435	<i>K. pneumoniae</i>	10	9	P	P	Positivo
CB-QCA 3505	<i>K. pneumoniae</i>	9	4	P	A	Positivo
CB-QCA 3527	<i>K. pneumoniae</i>	16	14	P	P	Positivo
CB-QCA 4609	<i>E. coli</i>	14	16	P	P	Positivo
CB-QCA 5162	<i>P. mirabilis</i>	2	13	A	P	Positivo
CB-QCA 5197	<i>P. mirabilis</i>	1	11	A	P	Positivo

Tabla 2: CB-QCA, Colección Bacteriana – Quito Católica; P, halo de inhibición > 5 mm, productor de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE); A, halo de inhibición < 5 mm, no productor de BLEE.

Figura: 1 y 2

Figura: 1

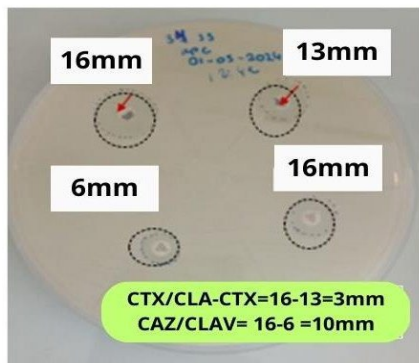


Figura: 2

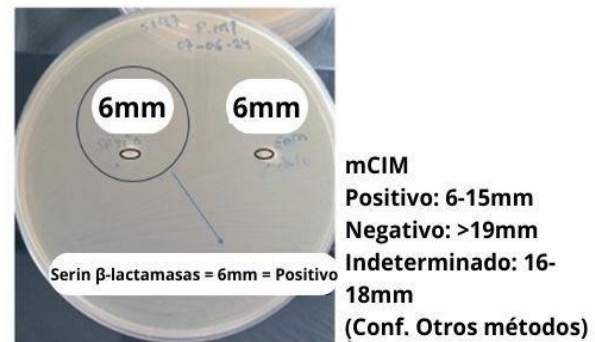


Figura N°1: Prueba confirmatoria de producción de BLEE: Positivo > 5 mm

Detección molecular de presencia de genes de resistencia en β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), serin β -lactamasas y metalo β -lactamasas

La amplificación de genes mediante PCR, permitió identificar la presencia de genes productores de BLEE y carbapenemasas. Para la detección de estos genes se realizó en los gels de agarosa.

De los 9 aislados presentando el gen blaCTX-M el 33,0 % (3/9); gen blaSHV 56,0 % (5/9); blaTEM 44,0 % (4/9); blaKPC 33,0 % (3/9); blaGES 11,0 % (1/9); blaVIM 33,0 % (3/9); los blaOXA 0,0 %; blaIMP 0,0 %; blaNDM 0,0 %.

Durante la amplificación de PCR no se visualizó la presencia de estos genes blaOXA 0,0 %; blaIMP 0,0 %; blaNDM 0,0 %.

El tamaño de los amplicones fueron: blaCTX-M 900pb; blaSHV 990pb; blaTEM 1000pb; blaKPC 700pb; blaGES 800pb; blaVIGRAFICO 3M 350pb (Tabla 3; Figura 3, 4).

TABLA N°3

Genes de resistencia

CÓDIGO PUCE	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{GES}</i>	<i>bla_{OXA}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{IMP}</i>	<i>bla_{NDM}</i>
CB-QCA 3435	P	P	P	P	P	A	A	A	A
CB-QCA 3505	A	P	P	P	A	A	P	A	A
CB-QCA 3527	A	P	A	A	A	A	P	A	A
CB-QCA 4609	P	P	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5162	P	A	P	P	A	A	A	A	A
CB-QCA 5197	A	P	P	A	A	A	P	A	A
CB-QCA 5395	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5404	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5407	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Tabla N° 3: CB-QCA Coleccion bacteriana Quito- Católica; A, Gen ausente; P, Gen presente

Figura 3

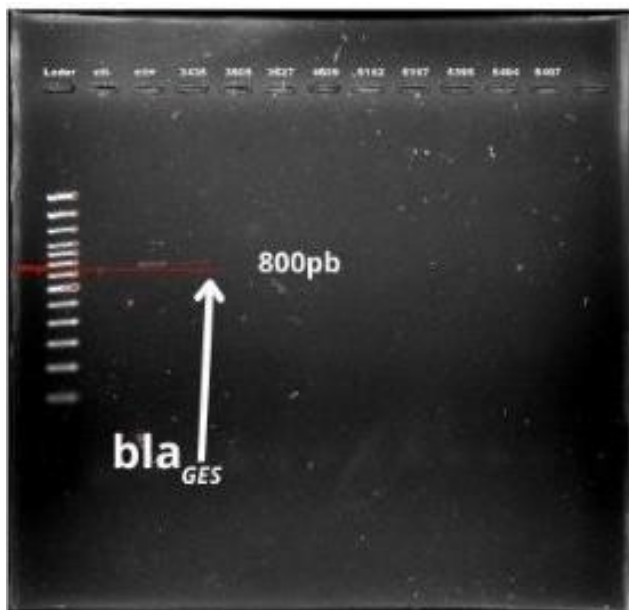


Figura 3: Gel de agarosa representativo para genes serin β -lactamasas mediante PCR peso molecular 800pb; carriles 1-12; 1: Lader; 2: control (-); 2, control (+), carril 3, gen positivo para *bla_{GES}*.

Figura 4

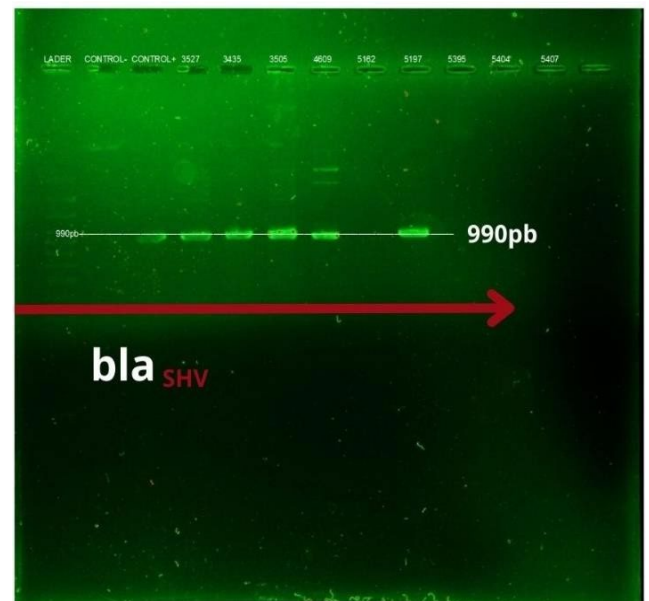


Figura 4, *bla_{SHV}*: Gel de agarosa representativo para genes serin β -lactamasas mediante PCR peso molecular 990pb; carriles 1-12; 1: Lader; 2: control (-); 2, control (+), carril 4,7,9, gen positivo para *bla_{SHV}* -BLEE en aislado bacteriano.

DISCUSIÓN:

La presente investigación pone de manifiesto la impresionante realidad de la resistencia a antimicrobianos (RAM) en muestras preservadas del laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universitaria Católica del Ecuador. Los resultados revelan una prevalencia preocupante de Resistencia Anti Microbiana (RAM), principalmente entre las clases de antibióticos: Penicilina (Ampicilina (AMP), Penicilina con agente combinado (Amoxicilina/clavulánico (AMC) y Piperacillin/Tazobactan); Cefalosporina (Cefotaxime y Ceftazidime; Monobactámico (Aztreonam); Carbapenemasas (Meropenem y Imepenem); Aminoglucósido (Tobramycim, Amikacin); macrólido (Azitromicina); Tetraciclina (Tetraciclina); Fluoroquinolona (Norfloxacin, Ciprofloxacina).

Para este estudio se seleccionaron 9 aislados patógenos: 1/9 (11,0 %) aislado de *Escherichia coli*, 2/9 (22,0 %) aislados de *Proteus mirabilis*; 3/9 (33,0 %) aislados de *Pseudomonas aeruginosa* y 3/9 (33,0 %) aislados de *Klebsiella pneumoniae*, correspondiendo al 100% de las bacterias analizadas, todas estas bacterias fueron identificadas por pruebas bioquímicas y el análisis de MALDI-TOF. En las enterobacterias se identificó que las tres *Klebsiella pneumoniae* seleccionadas presentaron resistencia a: Ampicilina (AMP), dos a la Amoxicilina/clavulánico (AMC), dos a Meropenem (MEM), dos a Imepenem (IMP), tres a Aztreonam (ATM);

tres a Tobramycim (Top) , tres Azitromicina (AZM), tres a Ciprofloxacín (CIP), y tres a Cefotaxime (CTX); aislados intermedios se encontraron dos a la Amoxicilina/clavulánico (AMC, dos a Imepenem (IMP) y por último sensibilidad, se identificó uno al meropenem (MEN) y tres a Tetraciclina (TE); Con relación a la *Escherichia coli* se encontró resistencia: a la Ampicilina (AMP), Amoxicilina/clavulánico (AMC), Tetraciclina (TE), Cefotaxime (CTX; y mostraron sensibilidad al meropenem (MEN), Imepenem (IMP), Aztreonam (ATM, Tobramycim (TOP), Azitromicina (AZM) y Ciprofloxacín (Cip); De acuerdo a los dos *Proteus mirabilis* se encontró resistencia a: dos a la Ampicilina (AMP), dos a la Tobramycim (Top), dos a la Tetraciclina (TE), dos a la Ciprofloxacín (CIP) y uno a la Cefotaxime (CTX; y hallo sensibilidad a: Amoxicilina/clavulánico (AMC), meropenem(MEN), Imepenem (IMP), Aztreonam (ATM) y Azitromicina (AZM). También se identificaron que de las 3 *P. aeruginosa* dos de ellas con resistencia a todos los antibióticos seleccionados: Piperacillin/Tazobactan (Penicilina con agente combinado), Ceftazidime Cefalosporina de tercera generación); Aztreonam (ATM) (Monobactámico), Imepenem (IMP) (Carbapenemasas), Meropenem (MEM) (Carbapenemasas), Amikacin (Aminoglucósido de segunda generación), Tobramycim (TOP) (Aminoglucósido de segunda generación), Ciprofloxacín (CIP) (Fluoroquinolona), Norfloxacín (Fluoroquinolona). Se encontró sensibilidad a Aztreonam (ATM); Y finalmente aislados intermedias a Piperacillin/Tazobactan (Penicilina con agente combinado) y Ceftazidime (Cefalosporina de tercera generación).

La identificación de genes de resistencia como bla_{CTX-M}, bla_{TEM}, bla_{SHV} son los determinantes más prevalentes de RAM acentúa el papel decisivo de la transferencia horizontal de genes en la expansión de esta problemática. Estos genes, a menudo huéspedes en plásmidos, proporciona la rápida propagación de la resistencia entre numerosos patógenos. Tal cual como se refleja en el Gráfico 3: Gel de agarosa representativo para genes serin β-lactamasas mediante PCR peso molecular 800pb; carriles 1-12; 1: Lader; 2: control (-); 2, control (+), carril 3, gen positivo para bla_{GES}. Tabla 1.

Este entorno figura una grave amenaza para la salud pública, ya que estos antibióticos son esenciales para el tratamiento eficaz de una extensa gama de infecciones bacterianas. Las infecciones por bacterias productoras de BLEE son un serio problema en América Latina y en Ecuador, debido a su alta incidencia ²⁸. Para el 2050, se estima que las infecciones por bacterias resistentes se convertirán en la primera causa de muerte global.

Actualmente las infecciones por bacterias productoras de BLEE se encuentran diseminadas a nivel mundial y así lo confirman numerosos estudios. En Cuba en 2021, los aislados de *E. coli* productoras de BLEE alcanzaron el 46,0 %. Según el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública- INSPI en el reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador en el 2014-2018, se describió el primer caso de resistencia antimicrobiana en el 2010. Se trataba de una *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenémicos debido a una enzima que produce, llamada carbapenemasas. Además, refiere en el Gráfico 1 donde refleja la presencia de los principales genes de resistencia hallados en establecimientos de salud del país. La resistencia predominante se debe a la enzima KPC, descubierta inicialmente en la bacteria *Klebsiella pneumoniae*. De igual forma reporta en la Tabla 3, la frecuencia de los microorganismos sujetos a vigilancia anualmente en el sistema Whonet desde el 2014 al 2018, donde se encontró un 61% de casos aislados de *Escherichia coli*, 21,0 % de *Klesiella pneumoniae*, 10,0 % de *Estafilococos aureus* y el 8% *Pseudomona aeruginosa*; en síntesis, se refleja la *Escherichia coli* con más del 50,0 %, seguido por *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Con respecto al control de la RAM para el 2019-2023 está próximo a ser oficializado mediante Acuerdo Ministerial, dentro del Plan Nacional para la prevención. ^{29 30 31}

La resistencia a los antibióticos es un problema a escala mundial. Según datos de la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) y del PRAN (Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos), las bacterias multirresistentes provocan alrededor de 3000 muertes al año en España, 33000 muertes al año en Europa y 700000 muertes al año en todo el mundo. Además, la resistencia bacteriana genera un gasto sanitario adicional de unos 1500 millones de euros^{32, 33}.

Representado por todos los aislamientos de bacilos Gram negativos provenientes de muestras clínicas de las diferentes áreas de atención del hospital Belén de Trujillo-Perú de julio 2018 a julio 2019. Se incluyeron 105 cultivos resistentes a carbapenémicos, de los cuales 49,5% salieron positivos al Test de Hodge modificado, como productores de carbapenemasas (Tabla 1). En lo que respecta a carbapenemasa se encontró que una mayor cantidad de cultivos eran productores de serincarbapenemasas (Tabla 2). Del total de bacilos Gram negativos trabajados en este estudio, fueron los de tipo no fermentadores de glucosa, los encontrados con mayor frecuencia como resistentes a carbapenémicos 90,0 % y productores de carbapenemasas 50,5% principalmente las especies de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Tabla 3). *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *Klebsiella pneumoniae* fueron las especies donde se encontró los mayores porcentajes de bacterias productoras de serincarbapenemasas. En cuanto a las enterobacterias se encontró muy pocos cultivos como resistentes a carbapenémicos, pero con elevado porcentaje en cuanto a la producción de carbapenemasas (Tabla 4)³⁴.

Los hallazgos de este estudio coinciden con los resultados de los estudios anteriormente detallados y con las tendencias globales de Resistencia Antimicrobiana (RAM), que indican un aumento constante de las tasas de resistencia en todo el mundo. Esta situación alarmante exige esfuerzos concertados y multisectoriales para combatir esta amenaza creciente a la salud pública. La implementación de programas efectivos de administración de antibióticos, la mejora de las prácticas de saneamiento e higiene, y el desarrollo de nuevos antibióticos son elementos esenciales para mitigar la carga de Resistencia Antimicrobiana (RAM).

La alta prevalencia de Resistencia Antimicrobiana (RAM) observada en este estudio tiene un impacto significativo en el tratamiento de las infecciones bacterianas. La resistencia a los antibióticos de primera línea obliga a recurrir a antibióticos de segunda o tercera línea, que suelen ser más costosos, tóxicos y menos efectivos. Esto puede conducir a tratamientos prolongados, mayor morbilidad y mortalidad, y un aumento de los costos de atención médica.

Limitaciones del estudio: se declara que durante la amplificación de PCR no se visualizó la presencia de estos genes blaOXA 0%; blaIMP 0%; blaNDM 0%.

CONCLUSIÓN:

- La investigación confirma una prevalencia de resistencia a antimicrobianos (RAM) en bacterias patógenas, especialmente entre las clases de antibióticos betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos.
- Se concluye que los 9 aislados fenotípicamente analizados corresponden: 1/9 (11,0 %) aislado de *Escherichia coli*, 2/9 (22,0 %) aislados de *Proteus mirabilis*; 3/9 (33,0 %) aislados de *Pseudomonas aeruginosa* y 3/9 (33,0 %) aislados de *Klebsiella pneumoniae*, correspondiendo al 100% de las bacterias analizadas, todas estas bacterias fueron identificadas por pruebas bioquímicas y el análisis de MALDI-TOF.
- Este estudio logró los objetivos propuestos y consolidó un enfoque integral para la caracterización de aislados de bacterias patógenas. Se confirmó la identificación bioquímica de los aislados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF; Además, la producción de β -lactamasa de espectro extendido (ESBL), serin β -lactamasas y metalo β -lactamasas mediante pruebas fenotípicas; Dichos ensayos no solo corroboraron la capacidad de bacterias aisladas para inactivar antibióticos, sino que también evidenciaron la relevancia clínica de los aislados patógenos. Por último, la detección de los genes que codifican las diferentes β -lactamasas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) refuerza la comprensión molecular de los mecanismos de resistencia en los aislados bacterianos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. La OMS publica un informe sobre el estado de desarrollo de antibacterianos [Internet]. OMS. 2024 [cited 2024 Sep 3]. Available from: <https://www.who.int/es/news/item/14-06-2024-who-releases-report-on-state-of-development-of-antibacterials>
2. Camacho-Silvas LA. Resistencia bacteriana, una crisis actual. Revista Española De Salud Pública. 2023;
3. I.N.S.P.I. INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA REPORTE DE DATOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN ECUADOR 2014-2018. Ministerio de Salud Pública. 2018;1-10.
4. da Silva JD, Bens L, Santos AJ do C, Lavigne R, Soares J, Melo LDR, et al. Isolation and Characterization of the Acadevirus Members BigMira and MidiMira Infecting a Highly Pathogenic *Proteus mirabilis* Strain. Microorganisms. 2023 Aug 23;11(9):2141.
5. Semana Mundial de Concientización sobre el Uso de los Antimicrobianos 2021 [Internet]. Organización Mundial de la salud. 2021 [cited 2024 Sep 3]. Available from: <https://www.paho.org/es/campanas/semana-mundial-concientizacion-sobre-uso-antimicrobianos-2021>
6. Organización Panamericana de la Salud. Un informe pone de relieve el aumento de la resistencia a los antibióticos en infecciones bacterianas que afectan al ser humano y la necesidad de mejorar los datos al respecto. 2022 Dec 9 [cited 2024 Sep 3]; Available from: <https://www.paho.org/es/noticias/9-12-2022-informe-pone-relieve-aumento-resistencia-antibioticos-infecciones-bacterianas>
7. Espinoza González AG, Pineda Sánchez DE. 95 años del descubrimiento de la penicilina. Rev Med Hondur. 2023;91(Supl.2).
8. Jeannete Zurita. Resistencia Bacteriana en el Ecuador. 2012.

9. Sosa Flores JL, Chapoñan Mendoza JF. Resistencia antibiótica de *Escherichia coli*, según producción de beta lactamasas de espectro extendido, en urocultivos. Hospital III-1. Chiclayo, Perú 2020. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*. 2023 Feb 15;15(4):598–603.
10. Shlaes DM. Antibiotics: The perfect storm. *Antibiotics: The perfect storm*. 2010.
11. Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: The CTX-M Enzymes. Vol. 48, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004.
12. Otoya Durand E, García-Mostajo JA, Rivera-Morón P. Tendencia en el consumo de carbapenems en un hospital de asociación público privada. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*. 2021;14(2).
13. Anderson R, GPW, TA, y WA. Agentes antibacterianos: química, modo de acción, mecanismos de resistencia y aplicaciones clínicas [Internet]. 2012 [cited 2024 Sep 3]. Available from: https://scholar.google.com/ec/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&as_vis=1&q=Anderson%2C+R.%2C+Groundwater%2C+P.%2C+Todd%2C+A.+y+Worsley%2C+A.+%282012+%29.+Atibacterial+Agents%3A+Chemestry%2C+Mod e+of+action%2C+Mechanism+of+Resistance+y+Apliaaciones+Cl%3%ADnicas.+Wiley%2C+United+Kingdom.&btnG=
14. Ambler RP, Coulson AFW, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochemical Journal*. 1991 May 15;276(1):269–70.
15. Astocondor-Salazar L. Betalactamasas: la evolución del problema. *Revista Peruana de Investigación en Salud*. 2018 Dec 31;2(2):42–9.
16. Lepe JA, Martínez-Martínez L. Mecanismos de resistencia en bacterias gramnegativas. *Med Intensiva*. 2022 Jul;46(7):392–402.
17. Pintos-Pascual I, Cantero-Caballero M, Rubio EM, Sánchez-Romero I, Asensio-Vegas Á, Ramos-Martínez A. Epidemiología y clínica de las infecciones y colonizaciones causadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital de tercer nivel. *Rev Esp Quimioter*. 2020;33(2).
18. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical and Laboratory Standards. Resistencia bacteriana*. 2023;
19. Lasko MJ, Gill CM, Asempa TE, Nicolau DP. EDTA-modified carbapenem inactivation method (eCIM) for detecting IMP Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: An assessment of increasing EDTA concentrations. *BMC Microbiol*. 2020;20(1).
20. Conza JA Di. Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la microbiología clínica. *Rev Argent Microbiol*. 2022 Jul;54(3):163–5.
21. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical and Laboratory Standards. Resistencia bacteriana*. *Clinical and Laboratory Standards Resistencia bacteriana*. 2024.
22. Tsai YM, Wang S, Chiu HC, Kao CY, Wen LL. Combination of modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *BMC Microbiol*. 2020 Dec 17;20(1):315.
23. Koul N, Kakati B, Agarwal S. Use of the Combined Modified Carbapenem Inactivation Method and EDTA-modified Carbapenem Inactivation Method for Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Causing Ventilator-associated Respiratory Infections. *J Pure Appl Microbiol*. 2022 Jun 1;16(2):1239–44.
24. El Aila NA, Al Laham NA, Ayesh BM. Prevalence of extended spectrum beta lactamase and molecular detection of blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genotypes among Gram negative bacilli isolates from pediatric patient population in Gaza strip. *BMC Infect Dis*. 2023 Feb 20;23(1):99.

25. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 2007 May 8;35(Web Server):W43–6.
26. Yauri Bucheli MF, Alcocer I, Duncan C. Caracterización molecular de genes de resistencia a β -lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia Enterobacteriaceae. *Rev Ecuat Med Cienc Biol.* 2021 Apr 23;42(1).
27. Gonzales-Rodriguez AO, Infante Varilla SF, Reyes-Farias CI, Ladines Fajardo CE, Gonzales Escalante E. β -lactamasas de espectro extendido y factores de virulencia en *Escherichia coli* uropatógenas en asilos de ancianos en Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2022 Mar 24;39(1):98–103.
28. Valdez Fernandez-Baca LM. *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), un problema creciente en nuestros pacientes. *Revista Médica Herediana.* 2017;28(3).
29. Monté Cepero L MCR. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en un hospital de La Habana. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 2022;
30. Instituto Nacional de investigación en salud publica. Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador 2014-2018 [Internet]. [cited 2024 Sep 9]. Available from: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf
31. Mendieta Astudillo V, Gallegos Merchan JD, Peña Cordero SJ. Frecuencia de (BLEE) (AmpC) y CARBAPENEMASAS en muestras de urocultivo, en cepas de *Escherichia Coli* de origen comunitario. *Revista Vive.* 2021 May 4;4(11):387–96.
32. One Health high- level meeting on Antimicrobial Resistance. Plan Nacional resistencia Antibióticos. 2023;
33. portada-test-covid-19 Productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios. 2022;
34. Abanto Díaz CE, González Cabeza JG, Castillo Diestra K. GRAM-NEGATIVE BACILLI RESISTANT TO CARBAPENEMS PRODUCING CARBAPENEMASES ISOLATED FROM PATIENTS AT THE BELEN HOSPITAL IN TRUJILLO. *REBIOL.* 2023 Apr 19;42(2):147–59.