

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Médicas

Carrera de Laboratorio Clínico

### **“Genes de resistencia en bacterias productores de betalactamasa de espectro extendido en aislados clínicos del Hospital del Río, Cuenca 2023”**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Licenciado en Laboratorio Clínico


**Autor:**

Julián Andrés Abad García

Kenny Carolina Guijarro Cartuche

**Director:**

Ivanna Solmayra Agreda Orellana

ORCID:  0000-0002-3826-9596

**Cuenca, Ecuador**

2024/03/08

## Resumen

**Antecedentes:** Las betalactamasas de espectro extendido son enzimas transmitidas por plásmidos que inhiben la acción de antibióticos, los genes de resistencia bacteriana se encuentran *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M, este último es uno de los causantes de resistencia más importantes en enterobacteriales.

**Objetivos:** Caracterizar los genes de resistencia productores de betalactamasa de espectro extendido en aislados clínicos de bacterias del orden enterobacteriales del Hospital del Río, Cuenca 2023.

**Métodos:** El diseño del estudio propuesto fue descriptivo transversal, y el universo incluyó las cepas del orden Enterobacteriales productoras de BLEE aisladas en el Hospital Universitario del Río en 2023. La información se recopiló utilizando formularios de registros y se analizó en Microsoft Excel 2013 y SPSS versión 2.2.

**Resultados:** Durante el periodo Enero - Junio 2023, se aislaron 50 cepas del género enterobacteriales, donde predominó *E. coli* con el 37 (80 %) en muestras de orina, *Salmonella complex* representó con un 1 (2 %) y *Klebsiella aerogenes* 1 (2 %), así mismo en muestras de orina. El gen encontrado fue *bla*CTX-M1 que representa el 14 (28 %) en su totalidad de *Escherichia coli*, además se detectó la presencia del conjunto de 3 genes *bla*CTX-M1 + *bla*SHV+ *bla*TEM con 1 (2 %) en *Escherichia coli* y 2 (4 %) en *Klebsiella pneumoniae* predominantemente en orina.

**Conclusiones:** El gen predominante responsable de la producción de BLEE sigue siendo *bla*CTX-M1 que representa en este estudio el 28 % en su totalidad en *Escherichia coli*, mientras que el conjunto de 3 genes *bla*CTX-M1 + *bla*SHV+ *bla*TEM, 2 % en *Escherichia coli* y 4 % en *Klebsiella pneumoniae*.

**Palabras clave:** resistencia bacteriana, betalactamasas, enterobacteriales



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

**Repositorio Institucional:** <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

## Abstract

Background: Extended-spectrum beta-lactamases are plasmid-borne enzymes that inhibit the action of antibiotics. Among the antimicrobial resistance genes to which this resistance is attributed are *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*CTX-M. The latter is one of the most important causes of resistance in Enterobacterales.

Objetivos: To characterize the extended-spectrum beta-lactamase-producing resistance genes in clinical Enterobacterales isolates taken from the Hospital del Río, Cuenca 2023.

Métodos: This is a descriptive cross-sectional study. The universe comprised the ESBL-producing Enterobacterales strains isolates at Hospital del Río in 2023. Information was collected using data registration forms and analyzed Microsoft Excel 2013 and IBM SPSS V22.

Results: From January to June 2023, Enterobacterales 50 strains were isolated, in which *E. coli* prevailed showing 37 (80%) in urine samples, *Salmonella complex* represented with 1 (2 %) and *Klebsiella aerogenes*, 1 (2 %), also in urine samples. The gene found was *bla*CTX-M, which represents 14 (28%) of all of *Escherichia coli*, in addition, the presence of *bla*CTX-M + *bla*SHV+ *bla*TEM was detected, featuring 1 (2 %) in *Escherichia coli* and 2 (4 %) in *Klebsiella pneumoniae*, mainly in urine.

Conclusions: The predominant gene responsible for ESBL production continues to be *bla*CTX-M, which in this study represents 28 % of all of *Escherichia coli*, while genes *bla*CTX-M1 + *bla*SHV+ *bla*TEM, 2 % of *Escherichia coli* and 4 % in *Klebsiella pneumoniae*.

**Keywords:** antimicrobial resistance, beta-lactamase, enterobacterales



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

**Institutional Repository:** <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

## Índice de contenido

|                                                    |    |
|----------------------------------------------------|----|
| <b>Resumen</b> .....                               | 2  |
| <b>Dedicatoria</b> .....                           | 9  |
| <b>Agradecimiento</b> .....                        | 10 |
| <b>Dedicatoria</b> .....                           | 11 |
| <b>Agradecimiento</b> .....                        | 12 |
| <b>Capítulo I</b> .....                            | 13 |
| 1.1 Introducción .....                             | 13 |
| 1.2 Planteamiento del problema .....               | 14 |
| 1.3 Justificación .....                            | 17 |
| <b>Capítulo II</b> .....                           | 19 |
| 2.1.1 Generalidades .....                          | 19 |
| 2.1.1.1 Sangre: .....                              | 20 |
| 2.1.1.2 Orina: .....                               | 20 |
| 2.1.1.3 Heces:.....                                | 20 |
| 2.1.1.4 Respiratorias:.....                        | 20 |
| 2.1.1.5 Tejidos: .....                             | 20 |
| 2.1.1.6 Secreción vaginal:.....                    | 21 |
| 2.1.1.7 Secreciones purulentas:.....               | 21 |
| 2.1.2 Bacterias .....                              | 21 |
| 2.1.3 Clasificación bacteriana .....               | 21 |
| 2.1.4 Antibióticos .....                           | 22 |
| 2.1.4.1 Betalactámicos.....                        | 23 |
| 2.1.4.2 Aminoglucósidos .....                      | 23 |
| 2.1.4.3 Quinolonas.....                            | 24 |
| 2.1.5 Resistencia bacteriana .....                 | 24 |
| 2.1.5.1 Tipos de resistencia .....                 | 24 |
| 2.1.6 Mecanismos de resistencia adquirida .....    | 25 |
| 2.1.6.1 Inactivación enzimática .....              | 25 |
| 2.1.6.2 Impermeabilidad.....                       | 25 |
| 2.1.6.3 Bombas de eflujo .....                     | 25 |
| 2.1.6.4 Modificación del sitio blanco.....         | 25 |
| 2.1.6.5 Transferencia horizontal de genes .....    | 25 |
| 2.1.7 Resistencia enzimática mediada por BLEE..... | 26 |

|                                                       |           |
|-------------------------------------------------------|-----------|
| 2.1.8 Clasificación .....                             | 27        |
| 2.1.8.1 $\beta$ -lactamasas cromosómicas .....        | 27        |
| 2.1.8.2 $\beta$ -lactamasas plasmídicas .....         | 28        |
| 2.1.9 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido ..... | 28        |
| 2.1.9.1 <i>bla</i> TEM .....                          | 28        |
| 2.1.9.2 <i>bla</i> SHV .....                          | 29        |
| 2.1.9.3 <i>bla</i> CTX-M .....                        | 29        |
| 2.1.10 Heterorresistencia.....                        | 29        |
| 2.1.10.1 Heterorresistencia a quinolonas .....        | 30        |
| 2.1.10.2 Heterorresistencia a aminoglucósidos.....    | 30        |
| 2.1.11 Detección fenotípica .....                     | 30        |
| 2.1.11.1 Difusión en disco:.....                      | 30        |
| 2.1.11.2 Dilución en caldo:.....                      | 31        |
| 2.1.11.3 Prueba de detección de betalactamasas:.....  | 31        |
| 2.1.12 Cultivo en MacConkey-ceftriaxona .....         | 31        |
| 2.1.13 Detección genotípica .....                     | 31        |
| 2.1.14 Epidemiología.....                             | 31        |
| <b>Capítulo III</b> .....                             | <b>34</b> |
| 3.1. Objetivos del estudio .....                      | 34        |
| 3.1.1. Objetivo general.....                          | 34        |
| 3.1.2. Objetivos específicos .....                    | 34        |
| <b>Capítulo IV</b> .....                              | <b>35</b> |
| 4.1 Metodología.....                                  | 35        |
| 4.1.1 Diseño del estudio.....                         | 35        |
| 4.2 Área de estudio .....                             | 35        |
| 4.3 Universo y muestra.....                           | 35        |
| 4.4 Criterios de inclusión y exclusión .....          | 35        |
| 4.4.1 Criterios de inclusión:.....                    | 35        |
| 4.4.2 Criterios de exclusión:.....                    | 35        |
| 4.5 Variables .....                                   | 36        |
| 4.6 Operacionalización de variables (Anexo A) .....   | 36        |
| 4.7 Métodos, técnicas e instrumentos.....             | 36        |
| 4.8 Procedimientos analíticos .....                   | 37        |
| 4.8.1 Criopreservación de cepas.....                  | 38        |
| 4.8.2 Viabilización de cepas.....                     | 39        |

|                                                                                                                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.8.3 Cultivo en MacConkey-ceftriaxona .....                                                                                                                                             | 39        |
| 4.8.4 Test de doble disco .....                                                                                                                                                          | 40        |
| 4.8.5 Extracción de material genético bacteriano .....                                                                                                                                   | 42        |
| 4.8.6 Cuantificación de ADN .....                                                                                                                                                        | 44        |
| 4.8.7 Pruebas moleculares .....                                                                                                                                                          | 44        |
| 4.8.8 Electroforesis .....                                                                                                                                                               | 47        |
| 4.8.9 Lectura e interpretación de la electroforesis .....                                                                                                                                | 48        |
| 4.9 Consideraciones bioéticas .....                                                                                                                                                      | 49        |
| <b>Capítulo V</b> .....                                                                                                                                                                  | <b>51</b> |
| 5. Resultados .....                                                                                                                                                                      | 51        |
| 5.1 Cumplimiento del estudio. ....                                                                                                                                                       | 51        |
| 5.2. Análisis de las características del grupo de estudio. ....                                                                                                                          | 51        |
| 5.2.1 Asociar género y especie bacterianas de los aislados de enterobacterias BLEE con tipo de muestra. ....                                                                             | 52        |
| 5.2.2 Evaluar mediante el test de doble disco la presencia de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. ....                                                        | 52        |
| 5.2.3 Identificar los genotipos de betalactamasas de espectro extendido <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> CTX-M1 mediante reacción en cadena de la polimerasa tradicional. .... | 53        |
| 5.2.4 Asociar los genes <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> CTX-M con resistencia a quinolonas y aminoglucosidos. ....                                                            | 54        |
| <b>Capítulo VI</b> .....                                                                                                                                                                 | <b>56</b> |
| 6.1 Discusión.....                                                                                                                                                                       | 56        |
| <b>Capítulo VII</b> .....                                                                                                                                                                | <b>60</b> |
| 7.1 Conclusiones.....                                                                                                                                                                    | 60        |
| 7.2 Recomendaciones.....                                                                                                                                                                 | 61        |
| <b>Referencias</b> .....                                                                                                                                                                 | <b>62</b> |
| <b>Anexos</b> .....                                                                                                                                                                      | <b>75</b> |
| Anexo A: Operacionalización de variables.....                                                                                                                                            | 75        |
| Anexo B: Instrumento de recolección .....                                                                                                                                                | 76        |
| Anexo C: Oficio de autorización.....                                                                                                                                                     | 77        |

**Índice de figuras**

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Siembra en medio de MacConkey .....                                    | 39 |
| <b>Figura 2.</b> Crecimiento en medio de MacConkey más ceftriaxona .....                | 40 |
| <b>Figura 3.</b> Colocación de discos con antibiótico .....                             | 41 |
| <b>Figura 4.</b> Test de doble disco positivos.....                                     | 42 |
| <b>Figura 5.</b> Interfaz del termociclador utilizado para PCR (programado SHV) .....   | 47 |
| <b>Figura 6.</b> Proceso para electroforesis.....                                       | 48 |
| <b>Figura 7.</b> Electroforesis en gel de agarosa (10 posillos) para gen blaCTX-M1..... | 49 |

**Índice de tablas**

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> Categorización de las bacterias analizadas. ....                                                                                                                       | 51 |
| <b>Tabla 2.</b> Distribución de género y especie de bacterias del orden. enterobacterales productoras de BLEE por tipo de muestra.....                                                 | 52 |
| <b>Tabla 3.</b> Distribución de género y especie de bacterias del orden enterobacterales por la detección fenotípica de BLEE y crecimiento en medio con antibiótico ceftriaxona. ....  | 52 |
| <b>Tabla 4.</b> Distribución de genes de resistencia BLEE por género y especie de bacterias del orden enterobacterales productoras de betalactamasas. ....                             | 53 |
| <b>Tabla 5.</b> Distribución de la resistencia y sensibilidad a las quinolonas por género y especie de bacterias del orden enterobacterales productoras de betalactamasas y sus genes. | 54 |
| <b>Tabla 6.</b> Distribución de la resistencia a los aminoglucosidos por género y especie de bacterias del orden enterobacterales productoras de betalactamasas y sus genes. ...       | 54 |



### **Dedicatoria**

A mí mismo por mantener la paciencia a lo largo de este periodo crucial de mi vida y resistir ante las adversidades. A Emilia, mi fiel compañera, por brindarme su apoyo inquebrantable durante este proceso. A Vane, por estar presente en cada paso de este viaje. Y, por supuesto, a mi querido Lucas, mi leal compañero canino, por su alegría y amor incondicional. Juntos, han hecho este trayecto más llevadero y memorable.

**Julián Andrés Abad García**

## Agradecimiento

Con sincero agradecimiento, me reconozco a mí mismo por creer en mis capacidades, tener paciencia y superar las adversidades que amenazaban con truncar esta meta. Un agradecimiento especial a mi actual pareja, Emilia, por brindarme cariño y compañía constante durante esta etapa académica. Agradezco a mis amigos, especialmente a MTZ, por su apoyo incondicional y ánimos en todo momento. Mis perros, en especial Lucas, han sido fuente de alegría y compañía invaluable. A Vane, por estar siempre presente.

Un especial y caluroso agradecimiento a mi familia, a mis padres Andrea García Y Juan Abad, por el apoyo y comprensión durante esta etapa y a mis hermanos Daniel y Emilio por acompañarme, apoyarme y hacer este camino más sencillo.

Agradezco a todos mis compañeros que me ayudaron a formarme tanto profesional como personalmente, especialmente a mi compañera Kenny, por toda la paciencia, compromiso y entusiasmo puesto sobre este trabajo.

Inmensa gratitud a nuestra tutora, la Mgs. Solmayra Agreda que con su paciencia y tiempo dedicado a este proyecto, siempre supo orientarnos y dirigirnos para lograr cada uno de los objetivos planeados.

Agradecidos con el Hospital Universitario del Río, y con la apertura brindada por parte de la Jefa de Laboratorio Clínico, la Lcda. Elizabeth Jiménez al permitirnos efectuar esta investigación.

Al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), por su contribución significativa de recursos para la realización de este estudio. A la vez agradecimientos sinceros a la Bqf. Carolina Satán por sus recomendaciones y gran colaboración en el proyecto.

Al Mgs. Jonathan Ortiz por su ayuda fundamental en el trayecto investigativo y su amplia generosidad al compartirnos sus conocimientos.

Y un especial agradecimiento a la Lcda. Gabriela Garcés que nos guió pacientemente con su experticia y sus saberes en gran parte del proceso.

**Julián Andrés Abad García**

**Dedicatoria**

A mis padres Manuel y Mónica quienes estuvieron en cada paso a lo largo de mi vida académica, confiaron en mis capacidades y fueron mi soporte en todo momento.

A mis abuelitos Martha y Segundo, que me alentaban con sus palabras y siempre tenían la certeza de que lo lograría. A papi Gerardo que a pesar de que no llegue a conocerlo hizo de mi padre un gran hombre, y en especial a mi mamita Esther que aunque no está sé que se hubiera sentido muy orgullosa de mí.

**Kenny Carolina Guijarro Cartuche**

## Agradecimiento

Principalmente, agradezco a Jehová Dios por haberme dado las fuerzas necesarias para cumplir esta meta. A mi padre por su apoyo incondicional, y haber estado presente permanentemente en todo este proceso, por jamás dejar de creer en mí y por mucho más. A mi madre que es un pilar fundamental en mi vida, y quien fue mi apoyo emocional cuando más lo necesitaba. Agradecida a los dos en conjunto por el amor y confianza que desde el inicio me brindaron, por sus consejos tan acertados, mismos que me permitieron tomar buenas decisiones a lo largo de este camino.

Agradezco a mis hermanos, especialmente a Ronald que siempre estuvo pendiente de mí ayudándome en todo lo que fuera necesario. A todos mis amigos que siempre me animaban y me motivaban a no rendirme. A Julián, mi compañero de tesis por el carácter de compromiso con el proyecto y el apoyo mutuo.

También agradecida con cada uno de los profesionales encontrados en mis pasos universitarios que me dejaron conocimientos y grandes enseñanzas para la vida profesional.

Inmensa gratitud a nuestra tutora, la Mgs. Solmayra Agreda que con su paciencia y tiempo dedicado a este proyecto, siempre supo orientarnos y dirigirnos para lograr cada uno de los objetivos planeados.

Agradecidos con el Hospital Universitario del Río, y con la apertura brindada por parte de la Jefa de Laboratorio Clínico, la Lcda. Elizabeth Jiménez al permitirnos efectuar esta investigación.

Al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), por su contribución significativa de recursos para la realización de este estudio. A la vez agradecimientos sinceros a la Bqf. Carolina Satán por sus recomendaciones y gran colaboración en el proyecto.

Al Mgs. Jonathan Ortiz por su ayuda fundamental en el trayecto investigativo y su amplia generosidad al compartirnos sus conocimientos.

Y un especial agradecimiento a la Lcda. Gabriela Garcés que nos guió pacientemente con su experticia y sus saberes en gran parte del proceso.

**Kenny Carolina Guijarro Cartuche**

## Capítulo I

### 1.1. Introducción

Los antibióticos son medicamentos esenciales empleados para combatir las infecciones bacterianas, el uso excesivo e inadecuado ha llevado a la aparición de bacterias resistentes que no pueden ser tratadas con los antibióticos de primera línea, obligando al personal de salud a usar fármacos de segunda, tercera línea. Esto ha dado lugar a un aumento de la morbimortalidad, prolongación de la duración de las enfermedades, incremento en los costos sanitarios y pérdida de eficacia de los tratamientos médicos (1 - 2).

Entre las bacterias que presentan resistencia a antibióticos, existe una preocupación específicamente del orden enterobacteriales. Estas se caracterizan por ser bacilos rectos Gram negativos, no esporulados, que se encuentran comúnmente en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, así como en ambientes naturales y pueden causar infecciones en humanos, en especial en aquellos con sistemas inmunológicos comprometidos. Algunos ejemplos incluyen *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella aerogenes*, entre otros (3 - 5).

Las bacterias pueden presentar resistencias a los antibióticos por varias vías, entre los mecanismos de resistencia que presentan las enterobacterias se encuentra la producción de enzimas, cierre de porinas, cambio del sitio blanco de acción, entre otras. La producción enzimática de las betalactamasas como las ampC, de espectro extendido (BLEE, por sus siglas en español) y carbapenemasas son las más frecuentes. Las ampC son enzimas que hidrolizan los antibióticos betalactámicos, como las cefalosporinas y las penicilinas, reduciendo la efectividad de estos medicamentos para tratar infecciones. Las BLEE son enzimas que bloquean la acción de antibióticos betalactámicos, como las cefalosporinas y las penicilinas. El primer informe de BLEE se remonta a la década de 1980, cuando se identificaron por primera vez en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*, en Alemania y Francia. Desde entonces, la prevalencia ha aumentado significativamente en todo el mundo, convirtiéndose en un importante problema de salud pública (3, 6 - 8).

Con los descubrimientos y avances en el campo genético y molecular, se planteó el identificar genes encargados de la codificación de las betalactamasas. El primer estudio genético sobre genes de resistencia bacteriana en BLEE se realizó en la década de 1990 por el Dr. Patrice Nordmann y sus colegas en el Hospital Bicêtre en Francia. Este estudio fue fundamental para comprender la base genética de la resistencia a los antibióticos en las bacterias productoras

de BLEE y para identificar los genes que codifican estas enzimas. Los investigadores utilizaron técnicas moleculares, como la clonación y la secuenciación de ADN, para identificar los genes de resistencia a los antibióticos en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*. Además, descubrieron que los genes de resistencia a los antibióticos se ubicaban en elementos genéticos móviles, como plásmidos y transposones, lo que permite propagarse entre diferentes bacterias y contribuir a la diseminación. Desde entonces se han realizado múltiples estudios para obtener mayor comprensión acerca de estos genes y cómo se propagan y así poder realizar prevención primaria y mejorar los tratamientos de infecciones causadas por estas bacterias (9 - 11).

Entre los genes de resistencia bacteriana se encuentran *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M. Los genes dos primeros fueron descubiertos en la década de 1960 y 1970, respectivamente, desde entonces se han encontrado en una amplia variedad de bacterias, entre ellas *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*. En tanto el gen *bla*CTX-M es relativamente nuevo, habiendo sido descubierto en la década de 1980 en una cepa de *Salmonella entérica* en Alemania. Desde entonces se ha propagado rápidamente en todo el mundo y se ha convertido en uno de los genes de resistencia bacteriana más importantes y extendidos en las enterobacterias (3, 12 - 15).

A continuación se propone el estudio relacionado a la determinación de genes codificantes de BLEES en aislados clínicos del Hospital del Río, 2023.

## 1.2. Planteamiento del problema

Una de las familias de antibióticos empleados con frecuencia en los tratamientos de las infecciones causadas por bacilos Gram negativos, son la familia de los betalactámicos, su uso se justifica debido a su baja toxicidad y amplio espectro, esto explica el creciente incremento de bacterias productoras de resistencia mediadas por procesos enzimáticos como son las BLEE, inicialmente sus reportes se presentaban a nivel hospitalario, mientras que en la actualidad la frecuencia ha ido aumentando a nivel comunitario. La producción de BLEE está codificada por genes como los *bla*CTX-M, *bla*SHV y *bla*TEM, entre otros, esto confieren resistencia a cefalosporinas de primera generación como cefazolina hasta de cuarta como el cefepime, situación que complica los tratamientos a nivel económico, en el aumento de la mortalidad y la dispersión de cepas resistentes. Lo que es ocasionado por la limitante en el

uso de antibióticos frente a BLEE, esto desemboca en la necesidad de ocupar incluso carbapenémicos que poseen mayor toxicidad, además precios más elevados y dificultad de disponibilidad (16, 17).

En el estudio realizado por Pagani L y *col.*, denominado "Múltiple CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamasas in Nosocomial Isolates of Enterobacteriaceae from a Hospital in Northern Italy" desarrollado en Italia a partir de muestras biológicas durante los años 2010 al 2012, se encontró que la frecuencia de betalactamasas tipo *bla*CTX-M fue del 65 %, *bla*TEM-1 18% y *bla*SHV-12 12 %. Siendo *E. coli* el patógeno frecuente con 72 % en este estudio. Además, se identificaron otros tipos de genes de resistencia, incluyendo *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-3, *bla*CTX-M-15. La presencia de múltiples tipos de genes *bla*CTX-M sugiere la existencia de una diversidad genética significativa en los aislados clínicos que merece su estudio (18).

Por otro lado un estudio en Brasil entre 2012 - 2013, reveló que el 11% de patógenos aislados a partir de aislados clínicos de pacientes con ITU eran productores de BLEE, con los siguientes resultados, 58,3 % *E. coli* y 41,7 % *Klebsiella pneumoniae*, donde *bla*CTX - M representó el 85,7 %, *bla*TEM 5,6 %; *bla*SHV 8,3 %. En Oaxaca-México Galindo en su estudio a partir de muestras de orina de pacientes con ITUac, concluyó que el 31,3 % de los aislados de *E. coli* fueron productores de BLEE, donde el 95.6 % portaban el gen *bla*CTX-M, el 17.8 % *bla*TEM, el 17.8 % *bla*CTX - M+*bla*TEM y con 0 % el gen *bla*SHV (19, 20).

En la actualidad la frecuencia de BLEE sigue incrementando, en Latinoamérica asciende a más del 30 % la frecuencia de *E. coli* productora de BLEE, siendo el gen *bla*CTX-M el que predomina; esto reafirma un estudio realizado en Quito-Ecuador por Supliguicha y *col.*, sobre los "Factores de riesgo para la infección del tracto urinario por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido" el cuál concluye con las siguientes frecuencias de enterobacterias aisladas productoras de BLEE: *E. coli* con 84,9 %, *Klebsiella pneumoniae* 13,1 % y 2,0 % otras bacterias. Otro estudio realizado en la Amazonía de Perú por León y *col.*, denominado: "Caracterización molecular de enterobacterias multirresistentes en dos departamentos de la selva peruana" encontró que del total de genes productores de BLEE aislados a partir de 61 urocultivos, el 57,4 % eran productores de BLEE, siendo los genes *bla*CTX-M, *bla*TEM y *bla*SHV los más frecuentes con 41 %, 24,6 % y 16,4 % respectivamente

(19 - 22).

En la investigación efectuada en Ecuador, en Quito relacionada con “Caracterización molecular de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia Enterobacteriaceae”, de muestras obtenidas de un hospital de tercer nivel, mostró que la especie predominante en el estudio fue 86.4 % *E. coli* y 13.6 % *K. oxytoca*. Donde la frecuencia de los genes hallados fueron 50 % *bla*CTX-M y 18,18 % *bla*TEM. En la ciudad de Cuenca, Ecuador, existen estudios que reflejan incremento en la frecuencia en bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. Por ejemplo, en el estudio “Características microbiológicas de pacientes con urocultivos positivos del Hospital Universitario del Río, Ecuador” realizado por Agreda I., y col., durante el año 2018, se encontró que de los 395 urocultivos positivos 322 correspondían a enterobacterias y 19,9 % de estas eran cepas BLEE. El estudio titulado “Prevalencia de uropatógenos bacterianos y su resistencia antimicrobiana en pacientes con infección al tracto urinario durante el año 2019 en la ciudad de Cuenca” realizado por Orellana y col., mencionan el incremento de la frecuencia de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Presentando un aumento del 22,8 % en aislados de *E. coli* en relación a estudios previos y un aumento del 60 % en *Klebsiella pneumoniae*. Otro estudio titulado “Prevalencia de uropatógenos bacterianos y su resistencia antimicrobiana en pacientes con infección al tracto urinario durante el año 2019 en la ciudad de Cuenca” realizado por Orellana y col., mencionan el incremento de la frecuencia de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Presentando un aumento del 22,8 % en aislados de *E. coli* en relación a estudios previos y un aumento del 60% en *Klebsiella pneumoniae* (23 - 25).

En la actualidad no existen datos publicados que revelen los genes de BLEE en enterobacteriales circulantes en la ciudad de Cuenca, las publicaciones se limitan a pruebas fenotípicas que no se han confirmado con biología molecular. Por tal razón, se propone la siguiente pregunta de investigación ¿Cuáles son los genes circulantes de resistencia productores de betalactamasa de espectro extendido en aislados clínicos de bacterias del orden enterobacteriales del Hospital del Río en Cuenca 2023? (26).

Siendo esta investigación de suma importancia para la prevención y el control de la diseminación de la resistencia a los antibióticos en los entornos hospitalarios y comunitarios, y para el desarrollo de nuevas terapias y la identificación de nuevas dianas terapéuticas que puedan utilizarse para combatir las infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE (26).



### 1.3 Justificación

Según la OMS las bacterias resistentes a los antimicrobianos se ha convertido en un peligro en la salud pública y este hecho ya se está ponderando a nivel mundial, es así que cada vez los tratamientos con antibióticos son menos eficaces, como es el caso de los carbapenémicos en *K. pneumoniae* en varios países, los cuales no tienen efecto en infecciones en más de la mitad de los casos (1, 27).

Falconi y *col.*, en un estudio donde se evaluó muestras de pacientes hospitalizados, sus resultados arrojaron que el 50,6 % de bacteriemias fueron producidas por enterobacterias productoras de BLEE, 55,8% *E. coli* y 32,6% *K. pneumoniae*, con una mortalidad en estos pacientes fue 16,2% infectados con enterobacterias productoras de BLEE y 7,1% enterobacteria no productora de BLEE. Tomando como referencia estos datos se evidencia la alarmante situación global referente al riesgo de infecciones por bacterias productoras de BLEE. Por ello la realización de estudios vinculados a resistencia bacteriana, sobre todo de esta clase se convierte en un punto clave para escudriñar su amenaza en nuestra comunidad (1, 27).

En la actualidad poco se habla de las enterobacterias productoras de BLEE en el Ecuador, existen escasos datos científicos significativos que permitan correlacionar el estado general de este tipo de resistencia bacteriana con sus genes asociados en nuestra región, por ende el presente estudio busca categorizar, contribuyendo datos relevantes de importancia nacional. Esta investigación tiene como fin identificar los genes presentes en muestras biológicas definiendo su frecuencia, permitiendo asociar la etiología bacteriana (23 - 24, 27).

Al realizar esta investigación y determinar mediante biología molecular la frecuencia de los genes *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M en bacterias del orden enterobacterales, logramos asociar al género, especie bacteriana y al origen del cual proviene la muestra del aislado clínico; y de esta manera recabar información relevante de enterobacterias productoras de BLEE en Cuenca-Ecuador, información que permitirá conocer la epidemiología local útil para la salud pública.

Esta investigación responde a las líneas de investigación del Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP), al área de investigación: Infecciones comunes, de igual manera consta en

las prioridades en las líneas de investigación planteadas por la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca: Enfermedades infecciosas.

Este estudio contribuirá a la academia con información relacionada a genes de resistencia circulantes que se deben investigar y someter a vigilancia epidemiológica. También contribuirá a la sociedad ya que el conocer esta información permitirá adoptar medidas de prevención en lo relacionado al uso de antibióticos como la automedicación, esto disminuirá la diseminación de bacterias resistentes.

Los resultados obtenidos serán expuestos ante un tribunal seleccionado por la Dirección de la carrera de Laboratorio Clínico, así como también serán socializados con la Dirección Médica del Hospital Universitario del Río, finalmente serán publicados en la página de la biblioteca de la Universidad de Cuenca y la revista de la facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca.

Por todo esto, se abordará el tema de investigación "*Genes de resistencia productores de betalactamasa de espectro extendido en aislados clínicos de bacterias del orden enterobacterales del Hospital del Río, Cuenca 2023*", siendo un aporte en la indagación de la frecuencia de genes asociados a bacterias productoras de BLEE.

## Capítulo II

### 2.1 Marco teórico

#### 2.1.1 Generalidades

Desde que se descubrieron las bacterias en el siglo XVII, han sido reconocidas como una fuente de enfermedades. Las primeras terapias para tratar infecciones bacterianas se basaron en el uso de sustancias químicas tóxicas, como el mercurio y el arsénico, que tenían una amplia gama de efectos sobre el cuerpo humano y las bacterias (28).

A mediados del siglo XX, los antibióticos revolucionaron el tratamiento de las infecciones bacterianas y fueron considerados una panacea para las enfermedades infecciosas. Sin embargo, con el tiempo, las bacterias han evolucionado para desarrollar resistencia a estos medicamentos, lo que condujo a la aparición de infecciones resistentes a múltiples fármacos (MDR) y súper bacterias que representan una amenaza cada vez mayor para la salud pública (29 - 31).

Las bacterias son organismos unicelulares que se encuentran en una variedad de entornos, incluyendo la piel humana, los intestinos, el agua y el suelo. Aunque muchas bacterias son inofensivas o incluso beneficiosas, algunas pueden causar enfermedades en humanos y animales. Las bacterias se reproducen por división celular y tienen la capacidad de intercambiar material genético con otras bacterias, y adquirir genes que confieren resistencia a los antibióticos y otros compuestos (28 - 31).

Las enterobacterias son un grupo de bacterias gram negativas tales como: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* y otras especies. Estas bacterias son comunes en el tracto intestinal humano y de los animales, así como en el medio ambiente. Las enterobacterias pueden causar una variedad de infecciones en humanos, incluyendo infecciones del tracto urinario, respiratorias, de la piel, heridas y sepsis. Las especies más comunes en infecciones hospitalarias son *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*. (32 - 33).

Los principales sitios de infección por enterobacterias abarcan el tracto urinario, el sistema gastrointestinal, las vías respiratorias, la piel y los tejidos blandos, así como la corriente sanguínea. Para obtener muestras adecuadas en el laboratorio clínico y permitir un diagnóstico preciso, se siguen protocolos específicos de recolección y transporte: (34).

**2.1.1.1 Sangre:**

Se recomienda obtener múltiples hemocultivos a partir de diferentes sitios de punción para aumentar la sensibilidad de detección de enterobacterias. La recolección se realiza utilizando técnicas asépticas, con el fin de evitar la contaminación de la muestra (35 - 36).

**2.1.1.2 Orina:**

Se prefiere una recolección de muestra de medio chorro o mediante cateterismo para evitar la contaminación externa con la flora uretral. Se deben seguir las indicaciones precisas para la recolección y se recomienda evitar la interrupción del flujo de orina durante la recolección para minimizar la posibilidad de contaminación bacteriana (35 - 36).

**2.1.1.3 Heces:**

Se sugiere recolectar al menos 5 gramos de muestra fecal, preferiblemente antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano. Es importante utilizar recipientes estériles y mantener la muestra refrigerada durante el transporte para preservar la viabilidad de las enterobacterias presentes (35 - 36).

**2.1.1.4 Respiratorias:**

Como el lavado broncoalveolar, el aspirado traqueal o el esputo inducido, se obtienen siguiendo técnicas específicas. Estos métodos permiten obtener muestras representativas de las vías respiratorias inferiores y facilitan la detección de enterobacterias en casos de infecciones respiratorias (35 - 36).

**2.1.1.4.1 Lavado broncoalveolar (BAL):**

El lavado broncoalveolar es una muestra tomada por el personal médico mediante el fibrobroncoscopio, principalmente para estudio de enfermedades broncopulmonares; en el caso de las neumonías, la cual es una infección de las vías respiratorias inferiores, es muy usada para la identificación del microorganismo que causa esta afección, existen varios tipos, pero la neumonía bacteriana tiene a un enterobacterial como lo es *Klebsiella pneumoniae* como una de las principales causantes de esta infección asociada al uso de ventilación mecánica (37 - 38).

**2.1.1.5 Tejidos:**

Es esencial obtener muestras estériles mediante técnicas quirúrgicas adecuadas. Se debe seguir un protocolo riguroso para minimizar la contaminación durante la obtención y asegurar

la representatividad de la muestra (35 - 36).

#### **2.1.1.6 Secreción vaginal:**

Estas muestras son recolectadas para estudio de infecciones vaginales, entre ellas la vaginosis, en este tipo de muestra hay que tener en cuenta al evaluar el crecimiento bacteriano, la microbiota normal del aparato genital femenino y no confundirla con la patógena que generalmente son portadoras de resistencia bacteriana (39).

#### **2.1.1.7 Secreciones purulentas:**

Hace referencia a muestras provenientes de fluidos corporales aspirados o drenados de cualquier sitio corporal ya sea este profundo o superficial; los mismos que se caracterizan por su contenido purulento (40).

### **2.1.2 Bacterias**

Las bacterias son organismos unicelulares pertenecientes al dominio Bacteria, uno de los tres dominios principales de la vida junto con Archaea y Eukarya. A diferencia de las células eucariotas, las bacterias son procariontes, lo que significa que carecen de núcleo definido y de orgánulos membranosos internos. Su estructura celular básica consiste en una membrana plasmática que rodea el citoplasma, donde se encuentra el material genético, generalmente un solo cromosoma circular (41).

Se encuentran en una variedad de entornos, desde suelos y aguas hasta el interior del cuerpo humano. Su capacidad de adaptación les permite sobrevivir en condiciones extremas. Durante los años se han hecho múltiples cambios en la clasificación bacteriana, esto en base a los avances científicos y tecnológicos que han permitido una mejor división y subdivisión de las mismas (41).

### **2.1.3 Clasificación bacteriana**

Actualmente, tenemos la taxonomía procarionte que abarca clasificación, nomenclatura e identificación. Según esta jerarquía, la familia *Enterobacteriaceae* pertenece al orden Enterobacterales, dentro de la clase Gammaproteobacteria y la filum *Proteobacteria*. Contando con un aproximado de más de 210 especies y 53 géneros, entre ellas médicamente relevantes como la especie *Escherichia* y géneros como *Klebsiella* (42, 43).

#### 2.1.4 Antibióticos

Los antibióticos son moléculas sintéticas, semisintéticas o de origen natural sintetizadas por bacterias, virus u hongos; estos agentes farmacológicos poseen acción bactericida capaz de exterminar a las bacterias, o bacteriostática que frenan su crecimiento. La historia de los antibióticos abarca más de setenta años y ha sido fundamental en la lucha contra las infecciones bacterianas. Desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, los antibióticos han salvado millones de vidas y han sido utilizados en diversas aplicaciones médicas. Se puede dividir la historia de los antibióticos como: la historia pre-antibiótica, la era dorada de los antibióticos y la actualidad (44 - 47).

En la era pre-antibiótica, las enfermedades infecciosas, como la 'Peste', provocaron pandemias devastadoras, con millones de víctimas y conocimientos rudimentarios sobre microbios. El descubrimiento de organismos microscópicos por Antonie van Leeuwenhoek en 1676 sentó las bases. El trabajo crucial de Louis Pasteur y Robert Koch a fines del siglo XIX impulsó la microbiología y el desarrollo de antibióticos (46 - 47).

La era dorada del descubrimiento de antibióticos, de la década de 1940 a la de 1970, presencié el aislamiento de diversos antibióticos de bacterias del suelo, especialmente *Streptomyces* spp. Esta era, impulsada por investigadores como Selman Waksman, llevó a la identificación de importantes clases de antibióticos, como actinomicina, estreptomina y neomicina. El uso generalizado de estos antibióticos supuso avances significativos en los tratamientos médicos. Sin embargo, el uso excesivo y el rápido desarrollo de antibióticos en un corto período llevaron a la aparición de cepas resistentes. A pesar del descubrimiento de antibióticos como nitrofuranos, macrólidos, tetraciclinas y quinolonas, las décadas posteriores vieron una disminución en la identificación de nuevas clases de antibióticos (46 - 47).

La situación actual en el desarrollo de antibióticos es desafiante. Grandes compañías farmacéuticas, una vez activas en la investigación de antibióticos, han reducido o abandonado sus esfuerzos debido a desafíos financieros y regulatorios. La resistencia a los antibióticos, junto con la falta de clases de antibióticos innovadoras, ha contribuido a un estancamiento en la búsqueda de nuevos antibióticos. El escenario plantea preocupaciones sobre la disminución de la eficacia de los antibióticos existentes (46 - 47).

Los antibióticos ejercen su acción antibacteriana a través de diversos mecanismos que interfieren con procesos vitales en las bacterias. Estos mecanismos se clasifican

generalmente en cinco categorías: inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, inhibición de la biosíntesis de proteínas, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de vías metabólicas y alteración de la función de la membrana bacteriana. Según esta clasificación encontramos grupos de antimicrobianos como: aminoglucosidos, betalactámicos, anfenícolos, glucopeptidos, lincosamidas, macrólidos, nitroimidazoles, oxazolidinonas, quinolonas, rifamicinas, entre otros. En este estudio nos concentramos en tres: betalactámicos, aminoglucósidos y quinolonas (46 - 47).

#### **2.1.4.1 Betalactámicos**

Los betalactámicos, intervienen bloqueando la síntesis de la pared celular bacteriana. Estos antibióticos, que incluyen penicilina G, amoxicilina y cefalosporina C, actúan acilando la transpeptidasa, una enzima clave en la formación de peptidoglicano. Este bloqueo interrumpe la última etapa de la síntesis del peptidoglicano, componente esencial de la pared celular, llevando a la pérdida de viabilidad y lisis bacteriana (47).

Sin embargo, las bacterias han desarrollado estrategias para resistir la acción de los betalactámicos. La resistencia a estos antibióticos a menudo se logra mediante la producción de enzimas llamadas betalactamasas, las cuales hidrolizan el anillo betalactámico de los antibióticos, inactivándolos. Esta resistencia puede ser de origen natural o adquirida a través de la transferencia de genes que codifican para betalactamasas. Además, algunas bacterias han desarrollado modificaciones en las proteínas de unión a la penicilina (PBPs), las cuales son el blanco de los betalactámicos, disminuyendo así la afinidad del antibiótico por su sitio de acción y reduciendo su eficacia (47).

#### **2.1.4.2 Aminoglucósidos**

Grupo de antibióticos constituidos de sustancias policationicas, su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis proteica bacteriana, en donde actúan sobre la subunidad ribosomal 30S, en donde actúan sobre la subunidad ribosomal 30S, desalojan los iones de  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$  de lipopolisacáridos adyacentes, resultando en una inhibición proteica completa o proteínas resultantes defectuosas. En conjunto esto afecta a la estructura de la membrana externa, además de alterar su permeabilidad. En cuanto a su espectro de acción abarcan a bacilos gram negativos y algunos cocos gram positivos comunes. Dentro de este grupo la plazomicina, se caracteriza por ser resistente a enzimas modificadoras de aminoglucósidos,

además tiene acción contra *P. aeruginosa* resistente, enterobacterias carbapenem resistentes, *E. coli* y *Klebsiella spp.* BLEE (44, 47).

### 2.1.4.3 Quinolonas

Son antibióticos de origen sintético, que poseen acción bactericida como resultado de la inhibición selectiva de ADN-girasa bacteriana, ya que impiden la acción de la topoisomerasa II y IV, y como resultado se ve afectado el plegamiento de la doble hélice del ADN. Las quinolonas pueden ser de espectro reducido (ácido nalidíxico) que exhiben actividad contra enterobacterias, tales como *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* y *Enterobacter spp.*; y de amplio espectro (fluoroquinolonas) demostrando actividad contra bacilos y cocos gram negativos sensibles, además de enterobacterias y cocos gram positivos comunes. Sin embargo en la actualidad este grupo de antibióticos ha demostrado ser ineficaz contra la creciente presencia de bacterias resistentes, específicamente dentro de las gram negativas, como enterobacterias productoras de BLEE y *P. aeruginosa* resistente (44, 47).

### 2.1.5 Resistencia bacteriana

Las enterobacterias son conocidas por su capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos, especialmente a los antibióticos betalactámicos como las penicilinas y las cefalosporinas. La resistencia a los antibióticos en las enterobacterias se debe a la producción de enzimas llamadas betalactamasas, que inactivan los antibióticos betalactámicos (32 - 33, 46).

La resistencia bacteriana es la capacidad de las bacterias para resistir los efectos de los antibióticos y otros compuestos antimicrobianos. Esto puede ocurrir naturalmente, a través de la selección natural, o puede ser inducido por el uso excesivo o inapropiado de antibióticos. La resistencia bacteriana puede ser causada por una variedad de mecanismos, incluyendo la inactivación de los antibióticos por enzimas bacterianas, la modificación del objetivo del antibiótico, la reducción de la entrada del antibiótico en la bacteria y la expulsión del antibiótico fuera de la bacteria (30 - 33, 46 - 47).

#### 2.1.5.1 Tipos de resistencia

La resistencia bacteriana puede ser de dos tipos, natural y adquirida; la primera es constitutiva de determinado grupo bacteriano y poseen genes propios responsables de esa resistencia,



mientras que la resistencia adquirida se produce por mutaciones en el genoma bacteriano, alteraciones en cromosomas y transmisión de material genético extracromosómico (48).

## **2.1.6 Mecanismos de resistencia adquirida**

### **2.1.6.1 Inactivación enzimática**

Este proceso implica la acción de enzimas específicas que modifican o degradan los antibióticos, haciéndolos ineficaces contra las bacterias. Por ejemplo, las betalactamasas tienen la capacidad de romper el anillo  $\beta$ -lactámico presente en los antibióticos betalactámicos, desactivándolos. Asimismo, las enzimas modificadoras de aminoglucósidos modifican la composición química de estos antibióticos, disminuyendo su afinidad por el ARNr 16S y evitando su funcionamiento adecuado (47, 49).

### **2.1.6.2 Impermeabilidad**

Se refiere a la capacidad de las bacterias para reducir la entrada de antibióticos en su interior, disminuyendo así la efectividad de estos fármacos. En el caso de bacterias Gram-negativas, la estructura de doble membrana que poseen, compuesta por una membrana interna y una membrana externa separadas por el espacio periplásmico, contribuye a una barrera más robusta que dificulta el acceso de muchos antibióticos a su objetivo intracelular. Además, esta membrana posee porinas que son proteínas presentes en la membrana externa de bacterias Gram-negativas que generan canales para el ingreso selectivo de moléculas, alteraciones en la estructura o expresión de estas pueden reducir aún más la permeabilidad (47, 49).

### **2.1.6.3 Bombas de E-flujo**

Son proteínas de membrana responsables de la expulsión desde el interior hacia el exterior de la bacteria de moléculas tóxicas, lo que incide directamente en la eficacia de los antibióticos al promover su desplazamiento fuera del microorganismo (48).

### **2.1.6.4 Modificación del sitio blanco**

Algunas bacterias tienen la capacidad de modificar la molécula blanco, sitio específico de la unión del antibiótico para llevar a cabo su acción. Como consecuencia la afinidad del antibiótico hacia el sitio de unión se ve disminuido o incluso desaparece (48).

### **2.1.6.5 Transferencia horizontal de genes**

Es uno de los mecanismos muy significativos de la expansión de genes de resistencia bacteriana, debido a que se pueden transmitir a otros tipos de especies bacterianas distintas

a las que originalmente se caracterizan dichas resistencias, es así que un microorganismo es capaz de adquirir varias resistencias a los antimicrobianos sin previamente haber sufrido una exposición a estos. Este proceso se lleva a cabo mediante conjugación, mientras que los responsables de la migración de los fragmentos genómicos son: (48).

#### 2.1.6.5.1 Bacteriófagos

Son material genético encapsulado por proteínas que se integran directamente al genoma celular bacteriano, que alteran el mismo (48).

#### 2.1.6.5.2 Plásmidos

Constituyen fragmentos de material genético libre circular en el interior de la célula bacteriana aislado de su genoma, es así que un mismo microorganismo puede contener de 1 a 200 plásmidos, por tal razón es uno de los principales vectores asociados a la resistencia bacteriana, mediante la transmisión de genes asociados a bacterias clínicamente patógenas; uno de los ejemplos más relevantes son *K. pneumoniae* con plásmido pOXA-48 portadora de carbapenemasa *bla*OXA-48 y *E. coli* con plásmido IncFII portadores de *bla*CTX-M productora de BLEE (48 - 50).

#### 2.1.6.5.3 Transposones

También llamados “genes saltarines”, son fragmentos de material genético móvil capaz de reintegrarse a sitios nuevos dentro y fuera del mismo genoma, además estos pueden ser transportados por plásmidos (48, 50).

### 2.1.7 Resistencia enzimática mediada por BLEE

Las bacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) son un tipo de bacteria que produce una enzima llamada betalactamasa, que es capaz de inactivar los antibióticos betalactámicos, como las penicilinas y las cefalosporinas. Los genes que codifican las BLEE se encuentran típicamente en plásmidos, que son pequeñas moléculas de ADN que se pueden transferir entre bacterias. La resistencia a los antibióticos en las BLEE se debe a la producción de enzimas que modifican químicamente los antibióticos betalactámicos, lo que los hace ineficaces contra las bacterias. Los genes que codifican estas enzimas se han encontrado en una variedad de bacterias, incluyendo *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Salmonella spp* (46, 49 - 50).

### 2.1.8 Clasificación

Actualmente se utilizan 2 sistemas para la clasificación de betalactamasas. Por un lado tenemos la propuesta por Amber y Bush, en 1989, también llamada clasificación molecular que divide en 4 grupos de interés A, B, C y D, basándose en las propiedades enzimáticas de esta familia y su secuencia de aminoácidos; y por otra parte tenemos el sistema de clasificación funcional que toma en cuenta más aspectos (51 - 53).

La clasificación de Amber, una piedra angular en este campo, demarca dos clases fundamentales, A y D, con discernimientos intrínsecos. En la Clase A, se destacan los subtipos SHV (a excepción de SHV-1), Enzimas tipo TEM (exceptuando TEM-1 y TEM-2), Enzimas tipo CTX-M, y Enzimas BLEE menores como PER, GES, VER. En paralelo, la Clase D engloba las enzimas OXA de espectro extendido (OXA-11, OXA-13, OXA-15, OXA-18) (51 - 53).

La propuesta de esta clasificación constituye un avance significativo, estratificando las betalactamasas en cuatro clases en función del peso molecular, espectro y homología en secuencias de aminoácidos. La Clase A, compuesta por enzimas serinas con actividad preferentemente penicilinasas, contrasta con la Clase B, que alberga metaloenzimas con afinidad cefalosporinasas. La Clase C se distingue por cefalosporinasas cromosómicas en bacterias Gram negativo, mientras que la Clase D abarca enzimas serinas que hidrolizan oxaciclina (51 - 53).

El aporte trascendental de Bush-Jacoby y Medeiros amplía esta clasificación, incorporando criterios adicionales como la codificación plasmídica o cromosómica, el espectro de hidrólisis, y la respuesta al clavulánico (CA), cloxacilina (CLOX), sulbactam (SUL), aztreonam (AZ), y ceftazidima. Esta categorización refinada integra no solo elementos bioquímicos, sino también genéticos y funcionales, revelando capas más profundas de complejidad en la dinámica de las betalactamasas (51 - 53).

- Las bacterias productoras de betalactamasas constituyen su resistencia desde un nivel cromosómico y plásmidicos (54).

#### 2.1.8.1 $\beta$ -lactamasas cromosómicas

En general las enterobacterias productoras de betalactamasas poseen un cromosoma que

dispone un gen encargado de la síntesis de estas enzimas, se ha evidenciado la estrecha relación entre la especie bacteriana y un tipo específico de betalactamasa (46, 54).

En especies de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. vulgaris*, *C. diversus* y *Yersinia enterocolitica* la  $\beta$ -lactamasa cromosómica que les otorgan la resistencia es de clase A. Dentro de las enterobacterias son características las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas del grupo C, ejemplo de ello está: *E. cloacae*, *k. aerogenes*, *S. marcescens*, *C. freundii* y *M. morgani*. Otras bacterias que en su estructura cromosómica codifican para la producción de enzimas betalactamasas son *E. coli* y *Shigella*, estas son de clase C. Por todo esto, la resistencia natural de las enterobacterias a los  $\beta$ -lactámicos está sujeta a la clase y cantidad de enzima que sintetiza (55, 56).

### 2.1.8.2 $\beta$ -lactamasas plasmídicas

Las bacterias pueden ser portadoras de genes de  $\beta$ -lactamasas a través de los plásmidos, que sirven como vectores transmitiendo así los genes de resistencia, los mismos que alteran la sensibilidad a este grupo de antibióticos. La expresión de las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas puede ser variable, es así que puede aumentar o disminuir la producción de enzimas que hidrolizan los betalactámicos, esto dependiendo de la ubicación del locus que le otorga la resistencia, o varias copias de este gen, es por eso que se habla de que la resistencia por medio de plásmidos en este caso es de tipo constitutiva (55, 56).

### 2.1.9 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

#### 2.1.9.1 *bla*TEM

El primer gen investigado en relación a BLEE fue la *bla*TEM-1, la misma que se encontró en *E. coli*, TEM hace referencia al nombre del paciente del que lo aislaron, Temoniera. Este gen se encuentra presente con más frecuencia en las enterobacterias productoras de BLEE. Se ha aislado también en géneros de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Serratia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*. Se ha examinado que bacterias que poseen varios genes para la producción de betalactamasa, de dos o tres tipos de estos, el gen *bla*TEM-1 generalmente en la mayoría de ocasiones está presente. Además se ha evidenciado hiperproducciones de *bla*TEM-1 lo que provoca la sensibilidad a la amoxicilina ácido clavulánico (57).

### 2.1.9.2 *bla*SHV

SHV, siglas que representan un sulfhidrilo variable, componente bioquímico de este tipo de BLEE. Este gen ha sido hallado sobre todo en el género de *Klebsiella*, siendo esta portadora natural de *bla*SHV-1. *bla*SHV-1 puede inducir la hiperproducción de tanto en *E. coli* y *K.pneumoniae*, mientras que también se ha observado que la hiperproducción de la *bla*SHV-1 hace que disminuya la sensibilidad a ceftazidima y amoxicilina ácido clavulánico (57).

### 2.1.9.3 *bla*CTX-M

El gen *bla*CTX-M perteneciente a la clase A, tienen actividad de sustrato hacia la cefotaxima y son sensibles a la inhibición por inhibidores de betalactamasas. Su homología genética entre los demás genes como *bla*TEM, *bla*SHV u OXA es menor. Este gen es el más frecuente en bacterias productoras de betalactamasas (BLEE), dando así su característica de resistencia a los betalactámicos (58 - 61).

### 2.1.10 Heterorresistencia

Al hablar de heterorresistencia se hace referencia a subpoblaciones de microorganismos que poseen más de 1 fenotipo de resistencia antimicrobiana dada ya sea por plásmidos o cromosomas, se pueden encontrar heterorresistencia monoclonal (un mismo clon de la cepa puede presentar resistencias) y policlonal (diferentes clones bacterianos, uno sensible y otro resistente o cepas con diferentes resistencias). La heterorresistencia se da como consecuencia de tratamientos antimicrobianos previos, este patrón se observa a menudo en bacterias patógenas. La heterorresistencia también puede ser estable o inestable, esto dependerá de la ausencia del antibiótico, dando así como resultado una cepa que previamente era resistente a cierto antimicrobiano ya no lo es, por ende ya no se expresará la resistencia. En este caso la producción de BLEE acompañada de otro tipo de resistencias. Debido a esta característica los tratamientos con antibióticos fracasan en múltiples ocasiones; dentro de las enterobacteriales las más comunes en portar heterorresistencia son *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Salmonella entérica* provocando así infecciones recurrentes. Es esencial la evaluación de heterorresistencia ya que esta dificulta y obstaculiza la identificación de la resistencia antimicrobiana a estudiar, no dejando así relucir sus características fenotípicas. Nicoloff y colaboradores, en un estudio en 2019 relacionaron la heterorresistencia en enterobacteriales Gram negativas, estudiaron 4 especies bacterianas distintas, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* y *S. typhimurium* las cuales los enfrentaron a 28 antibióticos distintos, al final del estudio se concluyó que 27,4% de las combinaciones expuestas presentaron heterorresistencia (62 - 63).

### 2.1.10.1 Heterorresistencia a quinolonas

La resistencia a las quinolonas se origina por la sustitución de aminoácidos en la proteína diana, por el ADN girasa. Los cambios que le dan la resistencia a los microorganismos están asociados a las regiones estrechas 2 de las subunidades de la girasa denominadas GyrA y GyrB, a las cuales se las llama “regiones determinantes de la resistencia a las quinolonas”. A causa de esta característica pueden hidrolizar a las quinolonas y ser resistentes a ellas a diferentes concentraciones (63 - 64).

### 2.1.10.2 Heterorresistencia a aminoglucósidos

La heterorresistencia a los aminoglucósidos se encuentra definida por la codificación de aminoglucósidos acetiltransferasas (aac) por los genes AMEs plasmídicos, lo que le otorga la resistencia a la familia antibiótica de los aminoglucósidos como: amikacina, gentamicina, tobramicina, entre otros; los mismos que son hidrolizados por la síntesis de la enzima aac. En este caso se ha evidenciado que los mutantes resistentes inestables en poblaciones heterorresistentes de enterobacteriales como *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Salmonella entérica* subespecie enterica serovariante *Typhimurium* surgen por mutaciones en genes que codifican para proteínas encargadas del transporte de electrones tales como los citocromos u oxidasas. En ausencia del antibiótico se presentó una ralentización del crecimiento bacteriano (62, 65).

### 2.1.11 Detección fenotípica

El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) es una organización que establece estándares para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Para detectar la resistencia en las enterobacterias, el CLSI recomienda realizar las siguientes pruebas: (66).

#### 2.1.11.1 Difusión en disco:

El método de difusión en disco, desarrollado por Kirby y Bauer, es una técnica estandarizada crucial para determinar la resistencia bacteriana a los antimicrobianos. En este método, un disco de papel de filtro de 6 mm impregnado con una concentración conocida de un compuesto antimicrobiano se coloca en una placa de agar Mueller-Hinton inoculada con un microorganismo ya identificado. Una vez hecho esto, el crecimiento bacteriano y la difusión del compuesto antimicrobiano ocurren simultáneamente. El crecimiento alrededor del disco se produce cuando las bacterias pueden vencer los efectos inhibitorios del antibiótico

empleado (67).

#### **2.1.11.2 Dilución en caldo:**

Esta prueba implica la dilución de diferentes concentraciones de un antibiótico en caldo y la incubación de la cepa bacteriana en la solución. Se observa el crecimiento o la inhibición del crecimiento bacteriano para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico (66).

#### **2.1.11.3 Prueba de detección de betalactamasas:**

Esta prueba utiliza diferentes sustratos de betalactamasas para detectar la presencia de estas enzimas en una cepa bacteriana (66).

#### **2.1.12 Cultivo en MacConkey-ceftriaxona**

Método fenotípico que permite la recuperación de Enterobacterales productoras de BLEE en el medio de cultivo de macConkey, se evidencia su crecimiento debido a que este tipo de bacterias son capaces de hidrolizar las cefalosporinas, razón por la cual que una bacteria productora de BLEE siempre tendrá un resultado positivo, lo que nos permite conocer su fenotipo antimicrobiano; para la realización de esta prueba es indispensable basarse en las MIC de cada una de las bacterias las cuales se encuentran estandarizadas en el CLSI, en el grupo de las Enterobacterales se debe emplear una concentración de 4ug/ml (66, 68).

#### **2.1.13 Detección genotípica**

La detección genotípica de BLEE, se lleva a cabo mediante la amplificación de material genético bacteriano por medio de la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) y su secuenciación, con el fin de evidenciar la expresión de genes que codifican la resistencia de BLEE. Por este método de biología molecular se logra exponer la presencia de genes tales como: *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M (68 - 70).

#### **2.1.14 Epidemiología**

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) han experimentado una diseminación global,

y diversos estudios respaldan un crecimiento continuo de estas en los últimos años. Su presencia en distintos nichos proporciona múltiples oportunidades para la transmisión de estas enzimas, que se han convertido en una preocupación significativa en la salud pública. En los Países Bajos, por ejemplo, la proporción de bacterias productoras de BLEE entre aquellas que causan infecciones invasivas aumentó a alrededor del 7 % en 2015 y se ha mantenido estable desde entonces. En África estudios realizados tanto en personas, animales o medioambiente, han demostrado una alta diseminación de BLEE (71 - 73).

La epidemiología de las BLEE ha experimentado notables transformaciones en las últimas décadas, marcando un cambio sustancial en el panorama de la resistencia bacteriana. Inicialmente, las enzimas *bla*TEM y *bla*SHV se erigieron como protagonistas predominantes a nivel mundial. Sin embargo, a principios de los años 2000, se evidenció un cambio trascendental con la proliferación destacada de las BLEE del tipo *bla*CTX-M en diversas regiones geográficas, especialmente en Europa, Latinoamérica y Asia. Este cambio en la distribución de las BLEE no sólo ha alterado la dinámica de las infecciones, sino que también ha generado desafíos significativos en cuanto al diagnóstico preciso, el tratamiento efectivo y el control de la resistencia antimicrobiana. En Estados Unidos, esta transición se evidenció en estudios que reportaron la aparición de aislamientos que producían *bla*CTX-M en hospitales, con una posterior prevalencia en el 80% de los hospitales participantes. El incremento de las infecciones por BLEE en EE. UU., con un aumento del 53% entre 2012 y 2017, se atribuyó principalmente a un alza en los casos de inicio en la comunidad (73 - 74).

En Ecuador, la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE ha aumentado en los últimos años, especialmente en entornos hospitalarios y comunitarios. En el estudio realizado en 2018 en un hospital en Quito se encontró que el 47 % de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas eran productoras de BLEE. Además, se ha encontrado una alta frecuencia de estas bacterias en pacientes hospitalizados y en unidades de cuidados intensivos, lo que sugiere una propagación significativa de estas bacterias en los entornos hospitalarios. En cuanto a la distribución de genes, si bien en Ecuador no se han realizado suficientes estudios, si se ha encontrado distribución de *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M, *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M siendo el más frecuentemente hallado *bla*CTX-M. Estos hallazgos son preocupantes y destacan la necesidad de medidas efectivas de control y prevención para reducir la propagación de estas bacterias y minimizar su impacto en la salud pública (75 - 78).

Las infecciones por enterobacterias son una preocupación importante para la salud pública a nivel mundial debido a su capacidad para causar infecciones resistentes a múltiples



antibióticos. Las enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) han aumentado en frecuencia y se han convertido en una preocupación particular debido a su capacidad para inactivar muchos de los antibióticos disponibles. Estudios epidemiológicos han mostrado una alta prevalencia de cepas de enterobacterias BLEE en hospitales y comunidades en Latinoamérica, lo que sugiere la necesidad de medidas de control y prevención para reducir la propagación de estas bacterias (79 - 80).

Es esencial implementar estrategias de prevención y control para combatir la diseminación de enterobacterias BLEE. Esto incluye la identificación temprana de casos, la implementación de medidas de control de infecciones en los entornos hospitalarios y comunitarios, el uso apropiado de los antibióticos y la higiene de manos. Es importante mencionar que el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ha establecido criterios para la interpretación de los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, incluyendo las pruebas de detección de BLEE. Según estos criterios, se considera que una cepa de bacteria es productora de BLEE si muestra resistencia a los antibióticos de la familia de las cefalosporinas de tercera generación. La implementación de estas pruebas en el diagnóstico de infecciones por enterobacterias BLEE es crucial para el tratamiento efectivo de estas infecciones y para prevenir su propagación (79 - 80).

## Capítulo III

### 3.1. Objetivos del estudio

#### 3.1.1. Objetivo general

Caracterizar los genes de resistencia productores de betalactamasa de espectro extendido en aislados clínicos de bacterias del orden enterobacterial del Hospital del Río, Cuenca 2023

#### 3.1.2. Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido, mediante el test de doble disco.
2. Identificar los genotipos de betalactamasas de espectro extendido *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M1 mediante reacción en cadena de la polimerasa tradicional.
3. Asociar los genes *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M1 con las variables de estudio.

## Capítulo IV

### 4.1 Metodología

#### 4.1.1 Diseño del estudio

El diseño de este estudio fue descriptivo y transversal.

#### 4.2 Área de estudio

La investigación se realizó a partir cepas bacterianas congeladas con datos anonimizados y recodificados de los aislados clínicos del cepario del Laboratorio Microbiológico del Hospital Universitario del Río de los meses Enero - Junio 2023 de bacterias del orden enterobacterales productoras de betalactamasas de espectro extendido.

Lugar: Hospital Universitario del Río - Universidad de Cuenca

Dirección: Avenida 24 de Mayo y Autopista Azogues- Cuenca

#### 4.3 Universo y muestra

El universo y muestra estuvo conformado por las 50 cepas bacterianas procedentes de aislados clínicos, durante los meses: enero a julio 2023 del orden enterobacterales productores de BLEE.

#### 4.4 Criterios de inclusión y exclusión

##### 4.4.1 Criterios de inclusión:

- Aislados clínicos que pertenecieron al orden de Enterobacterales.
- Bacterias que presentaron resistencias a cefalosporinas de 1, 2 y 3 generación.
- Aislados clínicos con reportes de antibiogramas para quinolonas, trimetoprima sulfametoxazol.
- Todas las cepas bacterianas positivas para BLEE obtenidas en el equipo Vitek 2 compact de bioMérieux.

##### 4.4.2 Criterios de exclusión:

- Bacterias que fueron sensibles a los betalactámicos como cefalosporinas de primera generación.

#### 4.5 Variables

- Bacteria del orden enterobacterales productora de *BLEE*.
- Bacterias:
  - Género bacteriano: nombre de bacterias
  - *Escherichia sp*
  - *Salmonella sp*
  - *Klebsiella sp*
- Tipo de muestra:
  - Secreciones de piel y tejidos
  - Orina
  - Sangre
  - Heces
- Genes: gen *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M:
  - Positivo
  - Negativo
- Test de doble disco:
  - Positivo: > 5 mm
  - Negativo: < 5 mm
- Cultivo MacConkey-ceftriaxona:
  - Crecimiento
  - Sin Crecimiento
- Heterorresistencia quinolonas
  - Resistencia a quinolonas
  - Sensible a quinolonas
- Heterorresistencia aminoglucósidos.
  - Resistencia a aminoglucósidos
  - Sensible a aminoglucósidos

#### 4.6 Operacionalización de variables (ANEXO A)

#### 4.7 Métodos, técnicas e instrumentos

- **Métodos**

El método utilizado se basó en la viabilización de cepas bacterianas del orden enterobacterales de aislados clínicos que fueron examinados por el personal del laboratorio

de microbiología del Hospital Universitario del Río, durante los meses: enero a julio 2023, para su posterior procesamiento de pruebas fenotípicas (test de doble disco), siembra en medios de ceftriaxona MacConkey y PCR para investigación de genes *bla*CTX, *bla*SHV, *bla*TEM1.

- **Técnicas**

Los datos se obtuvieron en reportes de identificación y antibiograma del equipo VITEK 2 compact, en el laboratorio de microbiología resultados del test de doble disco e información sobre el tipo de muestra y resultados de la electroforesis en el laboratorio de Biología Molecular. Los datos recogidos fueron inscritos en Microsoft Excel 2013, mientras que el análisis y vinculación de variables se empleó software estadístico Statistical Package for the Social Science (SPSS) versión 2.2, los cuales fueron manifestados en tablas de frecuencia.

- **Instrumentos**

Se empleó formularios para recolectar los datos del área de microbiología del Hospital Universitario del Río (**ANEXO B**)

- **Autorización:** Se solicitó el permiso al Director de Docencia e investigación del Hospital del Río.
- **Capacitación:** Los estudiantes fueron capacitados por el Docente Lic. Solmayra Agreda, en lo referente a pruebas fenotípicas, genotípicas, redacción del documento y revisión de artículos científicos actualizados.
- **Supervisión:** El proyecto de investigación fue supervisado por el tutor Lic.Solmayra Agreda, Docente de bacteriología de la carrera de Laboratorio Clínico.
- **Plan de tabulación y análisis:** Para la tabulación y análisis de los resultados se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statics 25 versión libre y para la edición de gráficos y tablas estadísticas que reflejen los resultados obtenidos se usó Microsoft Excel. Las variables cualitativas se representan mediante tablas simples y cruzadas.

#### 4.8 Procedimientos analíticos

Los procedimientos para la presente investigación se realizaron siguiendo el siguiente flujograma.

- 4.8.1 Criopreservación de cepas.
- 4.8.2 Viabilización de cepas.
- 4.8.3 Siembra en medio de cultivo MacConkey-ceftriaxona.
- 4.8.4 Test de Doble disco.
- 4.8.5 Extracción de material genético bacteriano.
- 4.8.6 Cuantificación de ADN.
- 4.8.7 Reacción en cadena de la polimerasa.
- 4.8.8 Electroforesis.
- 4.8.9 Lectura e interpretación de la electroforesis.

Inicialmente se realizó la revisión de los reportes del equipo VITEK 2 compact donde nos alertaba de una BLEE, posterior a esto se siguieron los siguientes pasos:

#### **4.8.1 Criopreservación de cepas**

**Antecedentes:** procedimiento diseñado para la preservación de cepas bacterianas a una temperatura de - 20 °C para su posterior estudio; esta técnica permite que se conserven las características fenotípicas y genotípicas de estos microorganismos por hasta 12 meses. Se lleva a cabo a partir de un medio de cultivo primario de máximo 48 horas de crecimiento, del cual se toma cepas aisladas para asegurar su pureza, se siguieron los siguientes pasos: (81).

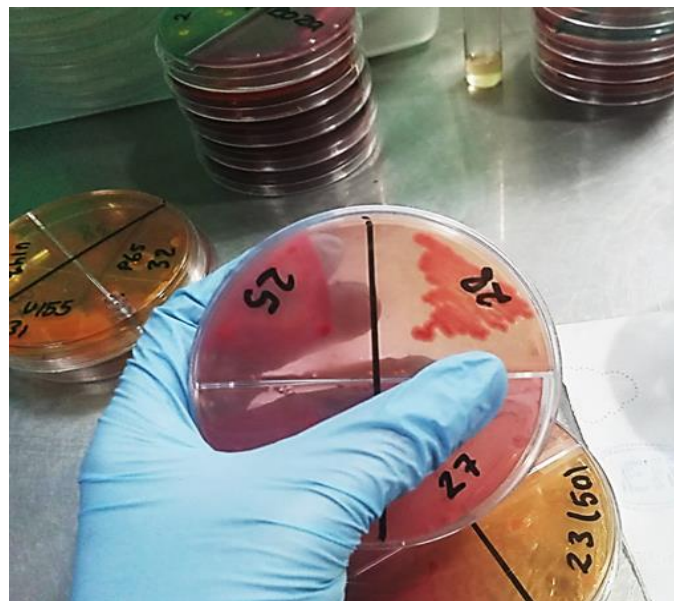
1. Preparación y esterilización del material: cubrir con papel periódico (despacho) las puntas y 2 tubos eppendorf (1.5 mL), por cepa que se desea preservar, esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, colocar el aceite mineral a LUV durante 10 minutos para su esterilización.
2. Preparar 3 ml de agar infusión cerebro corazón (BHI) estéril por cepa a preservar siguiendo las instrucciones del inserto de HIMEDIA.
3. Dentro de la cabina de flujo laminar, con la ayuda de una pipeta automática trasvasar el medio en tubos eppendorf de 1.5 ml y almacenarlos en un congelador a -18°C.
4. Descongelar el medio de BHI por al menos 1 hora en la estufa a 37 °C.
5. Con una asa en argolla desechable de 0,001 ul y en un ambiente estéril tomar 3 colonias de la cepa aislada del medio de MCK y dispensar en el medio de BHI, realizando movimientos circulares con la finalidad de que se desprenda las colonias en el medio.

6. Incubar en una estufa a 37°C durante 24 horas.
7. Agregar con una pipeta automática 100 ul de aceite mineral en la superficie del medio.
8. Sellar cada tubo Eppendorf con parafina.
9. Almacenar los tubos Eppendorf debidamente rotulados en un congelador a una temperatura de -20°C (82).

#### 4.8.2 Viabilización de cepas

**Antecedente:** método que evidencia la capacidad que posee un microorganismo para multiplicarse conservando sus características fenotípicas y genotípicas.

- a. Descongelar las cepas por 2 horas en la estufa.
- b. Tomar una alícuota (asada) de las cepas y sembrar por agotamiento con asa en argolla en un medio de MacConkey.
- c. Incubar de 24 a 48 horas.
- d. Sembrar para observar la pureza de la colonia (81).



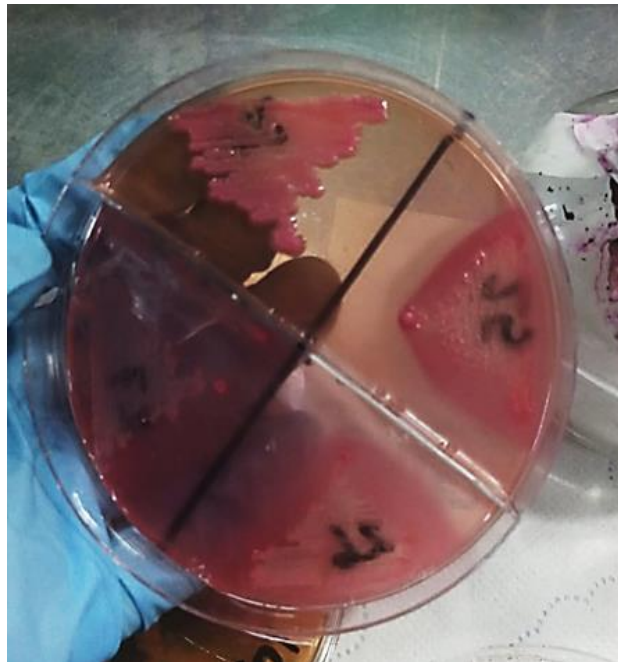
**Figura 1.** Siembra en medio de MacConkey

#### 4.8.3 Cultivo en MacConkey-ceftriaxona

**Antecedentes:** Prueba que tiene como finalidad la recuperación de enterobacterias

productoras de BLEE, basada en las concentraciones dadas por el CLSI 2023 para enterobacteriales con ceftriaxona (66, 68).

1. Añadir el antibiótico de ceftriaxona al medio de MacConkey en una concentración de 4  $\mu\text{g/ml}$  a una temperatura de 40 - 45  $^{\circ}\text{C}$ .
2. Sembrar por aislamiento con asa estéril en punta en el medio de cultivo.
3. Incubar por 24 h a 35 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
4. Observar el crecimiento en el medio de cultivo.



**Figura 2.** Crecimiento en medio de MacConkey más ceftriaxona

#### 4.8.4 Test de doble disco

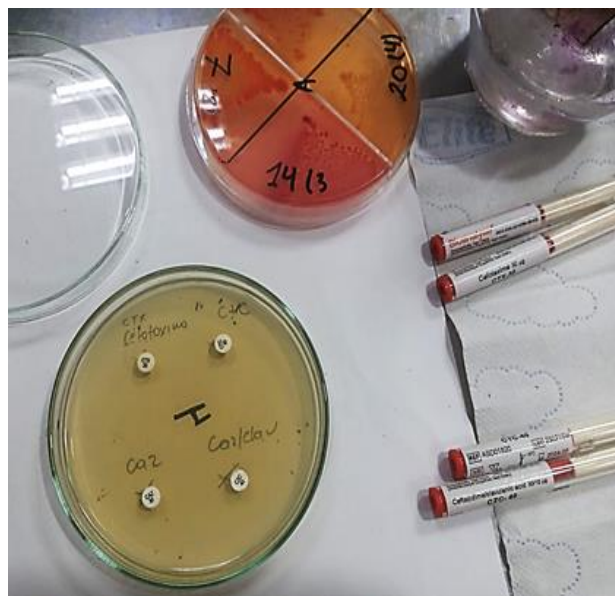
**Antecedentes:** análisis fenotípico de BLEE, dado por el CLSI, consiste en la colocación de discos de cefalosporinas de tercera generación y sus inhibidores de ceftazidima - clavulanato (30  $\mu\text{g}/10 \mu\text{g}$ ), cefotaxima - clavulanato (30  $\mu\text{g}/10 \mu\text{g}$ ); y discos de cefotaxima 30 $\mu\text{g}$  y ceftazidima 30 $\mu\text{g}$  (66, 83).

1. Preparar el medio de Mueller Hinton con 4.5 gr agar por cada 100 ml de agua destilada según la casa comercial (HIMEDIA), autoclavar a 121 $^{\circ}\text{C}$  por 20 min, trasvasar a placas petri y exponer a luz UV por 10 minutos .
2. Realizar control de calidad de esterilidad y grosor del medio (4 mm) mediante incubación y uso de regletas.



3. Realizar el inóculo bacteriano (0.5 MCF), con ayuda del turbidímetro DensiCHEK-plus de 0.5 a 0.63 que supone a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL
4. Con un hisopo estéril se realiza la siembra masiva (en rejilla) con el inóculo bacteriano en el medio de Muller Hinton.
5. Se espera 10 minutos, luego se dispensa un disco de ceftazidima/clavulanato y cefotaxima-clavulanato en el medio y al otro extremo a una distancia de 20 mm se sitúa un disco de ceftazidima (30µg) o uno de cefotaxima (30µg), enfrentándose así a su inhibidor. Incubar de 16 - 20 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
6. La lectura se realiza del halo y el aumento  $\geq 5\text{mm}$  en el diámetro de los halos de inhibición entre los discos de los antibióticos experimentados en combinación con clavulanato o solos, será indicador para producción de BLEE (66, 83).

A partir de las cepas que tuvieron crecimiento bacteriano en agar MacConkey ceftriaxona y test de doble disco positivo, se procedió a realizar la detección molecular de los genes BLEE (81).



**Figura 3.** Colocación de discos con antibiótico



**Figura 4.** Test de doble disco positivos

#### 4.8.5 Extracción de material genético bacteriano

**Antecedentes:** La extracción automatizada de ácidos nucleicos se lleva a cabo en el equipo Maelstrom 4800, empleando el método de las perlas magnéticas, basado en la hibridación complementaria entre el ácido nucleico y las perlas. Este método se fundamenta en la carga negativa de los ácidos nucleicos debido a los grupos fosfato en su estructura, lo que permite su captura mediante moléculas cargadas positivamente (84 - 85).

Las perlas magnéticas presentan una afinidad destacada con las moléculas de ácidos nucleicos y al mismo tiempo, no retienen magnetismo una vez que el campo magnético ha sido eliminado. Esta característica evita su aglutinamiento, asegurando una fácil suspensión de las partículas y una extracción uniforme de ácidos nucleicos (84 - 85).

El proceso automatizado en el equipo Maelstrom 4800 sigue los siguientes pasos:

- Lisis celular: Se añade una solución de lisis que rompe la pared celular y la membrana de las bacterias, liberando su contenido en el medio. Las soluciones de lisis comúnmente utilizadas incluyen soluciones de SDS, cloruro de sodio, Tritón X-100, EDTA, entre otras (86 - 87).

- Tratamiento con enzimas: Se incorporan proteasas y ribonucleasas a la muestra para degradar las proteínas y el ARN presentes en la solución de lisis, protegiendo así el ADN (86 - 87).
- Separación del ADN: Se añaden las perlas magnéticas a la muestra, se incuba y se atraen por un imán para separarlas de los otros componentes de la solución (84).
- Lavado: La muestra se lava con etanol y luego con agua destilada para eliminar los restos y otros contaminantes. El sobrenadante se desecha sin desechar las perlas (87 - 88).
- Elución: Una vez que solo quedan las perlas magnéticas unidas por magnetismo al ADN, se agrega una solución acuosa de pH básico que neutraliza el pH de las perlas, liberando así el ADN retenido en estas. Esto resulta en un eluido listo para almacenamiento y posterior uso (87 - 88).

La casa comercial de TAN Bead plantea el procedimiento para la extracción de ácidos nucleicos: (89)

1. Con cuidado, retira el papel de aluminio de la placa automática.
2. Agregue 300 µl de suero o suspensión PBS y 10 µl de proteinasa K en la columna #1 / #7 de la placa automática.
3. Nota: La relación de volumen de la mezcla y el tampón de lisis es de aproximadamente 300 µl: 600 µl. Si se cambia, podría afectar el rendimiento.
4. Monte las puntas de centrifugación en Maelstrom 8.
5. Coloque la placa automática en el soporte de la placa de Autostage. Asegúrese de que la esquina faltante de la base mire hacia la parte inferior izquierda.
6. Seleccione un programa "665-1 / 7". Los parámetros se indican en la siguiente sección.
7. Cuando finalice el programa, retire con cuidado la placa automática.
8. Utilice una micropipeta para transferir el ácido nucleico purificado de la columna #6 / #12 a un tubo limpio.
9. Deseche la placa automática usada y las puntas de centrifugación en el contenedor de recuperación de residuos (89).

#### 4.8.6 Cuantificación de ADN

**Antecedentes:** La cuantificación automatizada del ADN se lleva a cabo mediante el equipo Nanodrop 2000, un Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible que se basa en la espectrofotometría. Este método se sustenta en el principio de que los ácidos nucleicos presentan una absorción significativa a 260 nm. La cantidad mínima de ADN aceptada para PCR fue >50 ng/ml (90).

1. Se trabajará dentro de la cámara de bioseguridad tipo 2, con el material previamente estéril.
2. Para las muestras en tubos eppendorf de 200 ul se debe añadir 3 ul del DNA ya extraído con 3 ul de agua grado molecular.
3. Para la preparación del blanco solo se necesitará 1.8 ul de agua grado molecular.
4. Centrifugar 15 segundos en microcentrífuga a 2500 rpm
5. En el equipo Nanodrop 2000 se configuró en la opción de dsDNA a 260 nm con lectura en ng/ml.
6. Con una pipeta automática tomar 1,6 ul de cada eppendorf para disponer en la zona de lectura.
7. Encerar con el blanco de agua, y proseguir con las muestras, recordar que después de cada leída se deberá limpiar cuidadosamente con una toalla de papel la superficie óptica superior donde se coloca la muestra, para evitar así errores en la lectura.
8. Una vez cuantificado el DNA se trabajará con un rango >50 ng/ml, mientras que las muestras con menor cantidad de DNA, se podrán volver a sembrar a partir de la cepa criopreservada y se extraerá el material genético con un número mayor de colonias (90).

#### 4.8.7 Pruebas moleculares

##### 4.8.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa

**Antecedentes:** Según National Human Genome Research Institute (NIH) la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una técnica ampliamente utilizada en biología molecular para amplificar fragmentos específicos de ADN. Consta de tres fases principales: la desnaturalización, la hibridación y la extensión (84).

En la fase de desnaturalización, se calienta la muestra a una temperatura elevada, generalmente entre 94°C y 98°C, para separar las dos hebras de ADN. Este proceso se realiza mediante la ruptura de los enlaces de hidrógeno que mantienen unidas las hebras

complementarias del ADN (85 - 87).

En la fase hibridación, la temperatura se reduce a un rango que depende de la secuencia de los cebadores utilizados en la reacción, típicamente entre 50°C y 65°C. Los cebadores son oligonucleótidos cortos que se unen específicamente a las secuencias complementarias del ADN que se desea amplificar. En esta etapa, los cebadores se unen a sus correspondientes secuencias en las hebras de ADN separadas (85 - 87).

En la fase de extensión, se aumenta a una temperatura óptima para la actividad de la polimerasa, que suele ser de alrededor de 72°C. La polimerasa de ADN, un enzima que utiliza los cebadores como molde, se une a las hebras de ADN y extiende la cadena de ADN en dirección 5' a 3'. Este proceso se repite en cada ciclo de PCR, lo que resulta en la amplificación exponencial del fragmento de ADN deseado (85 - 87).

Estas tres fases se repiten en cada ciclo de PCR, lo que resulta en la amplificación exponencial del fragmento de ADN deseado. El número de ciclos requeridos para lograr la amplificación deseada, depende de varios factores, como: la cantidad y calidad de la muestra de ADN, la longitud del fragmento de ADN que se desea amplificar y la sensibilidad de la técnica de detección utilizada (85 - 87).

Para esto se lleva a cabo la preparación de la master mix, que contiene el ADN extraído y cuantificado. Las proporciones que se utilizaron en la preparación para una sola muestra a analizar fueron las siguientes, incluyendo controles positivos basados en la utilización de primers de genes *bla*SHV, *bla*CTX-M1, *bla*TEM y negativos en el que se empleó agua grado molecular (89).

- Taq polimerasa: 10 ul
  - Cebador Forward: 0,4 ul
  - Cebador Reverse: 0,4 ul
  - Agua de grado molecular: 7,2 ul
  - ADN: 2 ul
1. Calcular cuánto volumen total de master mix se necesita para las muestras a procesar multiplicando el número de muestras por el volúmen final (20ul) y por 1.1, que se usa para tomar en cuenta el error de pipeteo para que no sea insuficiente la master mix.
  2. Esterilización de material por autoclave: eppendorfs, puntas, envueltas en papel despacho

por 15 minutos. Esterilizar 10 minutos por uv, los materiales ocupados anteriormente más pipetas, rotulador y gradilla para eppendorf.

3. Pre Incubar a 25°C los reactivos.
4. Preparar master mix en una cabina tipo 2 de bioseguridad y rotular cada eppendorf de acuerdo al número de muestra correspondiente.
5. Centrifugar 15 segundos en microcentrífuga a 2500 rpm (89).

Una vez realizado, se colocan las muestras en el termociclador en el cual se selecciona el programa de ciclos y temperaturas específicos para cada gen. Las temperaturas de hibridación fueron obtenidas mediante la herramienta virtual PRIMER-BLAST y fueron las siguientes:

#### ***bla*SHV**

- Desnaturalización: 94 °C
- Hibridación: 56 °C
- Extensión: 72 °C

#### ***bla*CTX-M1**

- Desnaturalización: 94 °C
- Hibridación: 61 °C
- Extensión: 72 °C

#### ***bla*TEM**

- Desnaturalización: 94 °C
- Hibridación: 51 °C
- Extensión: 72 °C



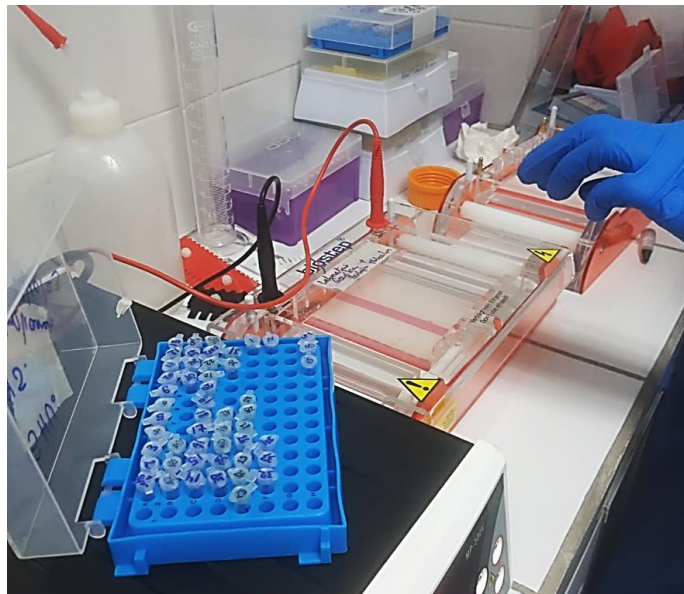
**Figura 5.** Interfaz del termociclador utilizado para PCR (programado SHV)

#### 4.8.8 Electroforesis

**Antecedentes:** Método empleado para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas según su tamaño y carga eléctrica. De acuerdo a estas características migran por el gel de agarosa situándose en la zona inferior las de menor tamaño y en la superior las de mayor tamaño molecular debido a su peso (91).

1. Previamente se debe diluir el TAE 1X, primero mezclar 20 ml de este con 980 ml de agua destilada tipo III en una probeta de 1000 ml, luego trasvasar a un balón de aforo de 1000 ml con el fin de corregir el volumen.
2. Preparar el gel de agarosa con 100 ml de buffer TAE con 1 gr de agar en un matraz, llevar al microondas hasta disolver completamente durante 5 minutos en intervalos de 1.5 minutos hasta que se haya disuelto por completo el agar, la mezcla deberá ser transparente.
3. Dejar enfriar por 15 minutos, sin que se solidifique el gel.
4. Añadir 5 ul de intercalante ADN SYBR Safe.
5. Ubicar los soportes laterales y la peinilla en la cubeta de electroforesis, esta contiene el molde para cada pocillo dependiendo de cuántas muestras se analizarán puede variar el número de pocillos 10,15 o 20; y disponer el gel en él.
6. Recubrir la preparación con papel aluminio y esperar 15 minutos hasta que solidifique, luego retirar los soportes y la peinilla.

7. Cubrir en su totalidad el gel, colocado dentro de la cámara, con TAE y conectarla a una fuente de poder.
8. Colocar con una pipeta automática 5 ul de muestra en cada pocillo del gel, de derecha a izquierda se dispensaron: marcador de peso molecular, muestras a investigar, control negativo y control positivo.
9. Iniciar el proceso de migración en oscuridad por 1 hora, 200v.
10. Desconectar el equipo y visualizar en el transiluminador UV en completa oscuridad (91).



**Figura 6.** Proceso para electroforesis

#### 4.8.9 Lectura e interpretación de la electroforesis

**Antecedentes:** El transiluminador es un equipo capaz de emitir luz UV, que se emplea para visualizar segmentos de ácidos nucleicos; es así que evidencia la separación molecular mediante la fluorescencia emitida por dichas moléculas (91).

1. Colocar centralmente el gel de agarosa en la zona de lectura del transiluminador.
2. Utilizar medidas de protección como gafas y bajar la pantalla sobrepuesta en el equipo.
3. Prender la luz UV, aquí se lograra observar el marcador de peso molecular, mientras que solo el control positivo y las muestras que presenten dicho segmento molecular investigado expresaran fluorescencia.
4. Tomar fotografías como evidencias debidamente identificadas (91).





**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa (10 posillos) para gen *bla*CTX-M1

#### 4.9 Consideraciones bioéticas

##### Aspectos éticos

Los datos recolectados de los registros del laboratorio de microbiología fueron utilizados con total confidencialidad, dando uso únicamente para la investigación, no incluyendo datos personales de los pacientes que involucren su privacidad, tal como lo señala el Acuerdo Ministerial 5216 en el Capítulo III: CONFIDENCIALIDAD EN LOS DOCUMENTOS CON INFORMACIÓN DE SALUD, en su Art. 7.- “El uso de los documentos que contienen información de salud no se podrá autorizar para fines diferentes a los concernientes a la atención de los/las usuarios/as, evaluación de la calidad de los servicios, análisis estadístico, investigación y docencia. Toda persona que intervenga en su elaboración o que tenga acceso a su contenido, está obligada a guardar la confidencialidad respecto de la información constante en los documentos antes mencionados”. Así como también en el Art. 12.- “En el caso de historias clínicas cuyo uso haya sido autorizado por el/la usuario/a respectivo para fines de investigación o docencia, la identidad del/a usuario/a deberá ser protegida, sin que pueda ser revelada por ningún concepto. El custodio de dichas historias deberá llevar un

registro de las entregas de las mismas con los siguientes datos: nombres del receptor, entidad en la que trabaja, razón del uso, firma y fecha de la entrega”.

La información fue recolectada a partir de una base de datos secundaria, donde no constaban los datos personales ni historias clínicas de los pacientes, no existe la posibilidad de acceder a la información del investigado que se aisló este microorganismo. A partir de esta información se completó los instrumentos con los números de cepas bacterianas etiquetando desde 001, esta base de datos fue archivada protegida con contraseña que incluirá 8 caracteres alfa numéricos, a la cual sólo tuvieron acceso los investigadores.

**Riesgos del estudio.-** no existió riesgos para la población ya que no se trabajó con muestras biológicas ni pacientes, ni para estudiantes debido a que trabajo cumpliendo las normas de bioseguridad y utilizó los Equipos de protección personal.

**Beneficios del estudio.-** el conocer los genes de resistencia circulantes en bacterias del orden enterobacterial permitió adoptar medidas de prevención disminuyendo la diseminación de este tipo de bacterias en la población.

**Conflicto de intereses.-** los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Capítulo V

## 5. Resultados

## 5.1 Cumplimiento del estudio.

Este estudio se realizó empleando aislados de cepas productoras de betalactamasas del orden enterobacteriales en el Hospital Universitario del Río de la ciudad de Cuenca, durante el periodo Enero - Junio 2023.

## 5.2. Análisis de las características del grupo de estudio.

Tabla 1. Categorización de las bacterias analizadas.

| Variables                            | Escala                                            | Nº        | %          |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------|------------|
| <b>Bacterias aisladas</b>            | <i>E. coli</i>                                    | 40        | 80         |
|                                      | <i>Klebsiella pneumoniae</i>                      | 6         | 12         |
|                                      | <i>Salmonella complex</i>                         | 1         | 2          |
|                                      | <i>Klebsiella aerogenes</i>                       | 1         | 2          |
|                                      | <i>Proteus mirabilis</i>                          | 2         | 4          |
|                                      | <b>Total</b>                                      | <b>50</b> | <b>100</b> |
| <b>Muestras</b>                      | Orina                                             | 46        | 92         |
|                                      | Secreciones purulentas                            | 2         | 4          |
|                                      | Secreciones vaginales                             | 1         | 2          |
|                                      | BAL                                               | 1         | 2          |
|                                      | <b>Total</b>                                      | <b>50</b> | <b>100</b> |
| <b>Genes encontrados</b>             | <i>bla</i> CTX-M1                                 | 14        | 28         |
|                                      | <i>bla</i> SHV                                    | 0         | 0          |
|                                      | <i>bla</i> TEM                                    | 8         | 16         |
|                                      | <i>bla</i> CTX-M1+ <i>bla</i> SHV                 | 1         | 2          |
|                                      | <i>bla</i> CTX-M1+ <i>bla</i> TEM                 | 11        | 22         |
|                                      | <i>bla</i> SHV + <i>bla</i> TEM                   | 2         | 4          |
|                                      | <i>bla</i> CTX-M1+ <i>bla</i> SHV+ <i>bla</i> TEM | 3         | 6          |
|                                      | Inespecificas                                     | 11        | 22         |
|                                      | <b>Total</b>                                      | <b>50</b> | <b>100</b> |
| <b>Resistencia a quinolonas</b>      | Resistente                                        | 14        | 28         |
|                                      | Sensible                                          | 36        | 72         |
|                                      | <b>Total</b>                                      | <b>50</b> | <b>100</b> |
| <b>Resistencia a aminoglucosidos</b> | Resistente                                        | 2         | 4          |
|                                      | Sensible                                          | 48        | 96         |
|                                      | <b>Total</b>                                      | <b>50</b> | <b>100</b> |

**Fuente:** Formulario de datos obtenidos del cepario del laboratorio microbiológico del Hospital del Río.

**Autores:** Julián Andrés Abad García - Kenny Carolina Guijarro Cartuche

De las 50 bacterias productoras de BLEE, 40 (80 %) fue *E. coli*, mientras que el gen que predominó fue *bla*CTX-M1 14 (28 %) siendo la muestra de orina la más representativa con 46 (92 %).

**5.2.1** Asociar género y especie bacterianas de los aislados de enterobacterias BLEE con tipo de muestra.

**Tabla 2.** Distribución de género y especie de bacterias del orden enterobacterales productoras de BLEE por tipo de muestra.

| Género y especie bacteriana  | Tipo de muestra |                |             |          | Nº          |
|------------------------------|-----------------|----------------|-------------|----------|-------------|
|                              | Orina           | Sx. purulentas | Sx. vaginal | BAL      |             |
| <i>E. coli</i>               | 37<br>74 %      | 2<br>4 %       | 1<br>2 %    | 0        | 40<br>80 %  |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 6<br>12 %       | 0              | 0           | 0        | 6<br>12 %   |
| <i>Salmonella complex</i>    | 1<br>2 %        | 0              | 0           | 0        | 1<br>2 %    |
| <i>Klebsiella aerogenes</i>  | 1<br>2 %        | 0              | 0           | 0        | 1<br>2 %    |
| <i>Proteus mirabilis</i>     | 1<br>2 %        | 0              | 0           | 1<br>2 % | 2<br>4 %    |
| <b>Total</b>                 | 46<br>92 %      | 2<br>4 %       | 1<br>2 %    | 1<br>2 % | 50<br>100 % |

**Fuente:** Formulario de datos obtenidos del cepario del laboratorio microbiológico del Hospital del Río.

**Autores:** Julián Andrés Abad García - Kenny Carolina Guijarro Cartuche

De las 50 cepas aisladas, predominó *E. coli* en orina con 37 (74 %), *Klebsiella pneumoniae* estuvo representada por 6 aislamientos (12 %), mientras que *Salmonella complex* por 1 caso (2 %) y *Klebsiella aerogenes* 1 aislamiento (2 %).

**5.2.2** Evaluar mediante el test de doble disco la presencia de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido.

**Tabla 3.** Distribución de género y especie de bacterias del orden enterobacterales por la detección fenotípica de BLEE y crecimiento en medio con antibiótico ceftriaxona.

| Género y especie             | Prueba de doble disco |          | Crecimiento en medio de MacConkey-<br>ceftriaxona (4 ug/mL) |          |
|------------------------------|-----------------------|----------|-------------------------------------------------------------|----------|
|                              | Positivo              | Negativo | Positivo                                                    | Negativo |
| <i>E. coli</i>               | 40<br>80 %            | 0        | 40<br>80 %                                                  | 0        |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 6<br>12 %             | 0        | 6<br>12 %                                                   | 0        |
| <i>Salmonella complex</i>    | 1<br>2 %              | 0        | 1<br>2 %                                                    | 0        |
| <i>Klebsiella aerogenes</i>  | 1<br>2 %              | 0        | 1<br>2 %                                                    | 0        |
| <i>Proteus mirabilis</i>     | 2<br>4 %              | 0        | 2<br>4 %                                                    | 0        |
| <b>Total</b>                 | 50<br>100 %           | 0        | 50<br>100 %                                                 | 0        |

**Fuente:** Formulario de datos obtenidos del cepario del laboratorio microbiológico del Hospital del Río.

**Autores:** Julián Andrés Abad García - Kenny Carolina Guijarro Cartuche

El 100 % de las bacterias analizadas presentaron más de 5 mm en el test de doble disco con cefotaxima, cefotaxime/clavulanato y ceftazidime y ceftazidime/clavulanato y crecieron en el medio de cultivo de MacConkey más ceftriaxona (4 ug/mL).

**5.2.3** Identificar los genotipos de betalactamasas de espectro extendido *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M1 mediante reacción en cadena de la polimerasa tradicional.

**Tabla 4.** Distribución de genes de resistencia BLEE por género y especie de bacterias del orden enterobacteriales productoras de betalactamasas.

| Género y especie                                     | <i>E. coli</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Salmonella complex</i> | <i>Klebsiella aerogenes</i> | <i>Proteus mirabilis</i> | TOTAL       |
|------------------------------------------------------|----------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------|
| <b><i>bla</i>CTX-M</b>                               | 14<br>28 %     | 0                            | 0                         | 0                           | 0                        | 14<br>28 %  |
| <b><i>bla</i>SHV</b>                                 | 0              | 0                            | 0                         | 0                           | 0                        | 0           |
| <b><i>bla</i>TEM</b>                                 | 5<br>10 %      | 1<br>2 %                     | 0                         | 0                           | 2<br>4 %                 | 8<br>16 %   |
| <b><i>bla</i>CTX-M+<i>bla</i>SHV</b>                 | 0              | 1<br>2 %                     | 0                         | 0                           | 0                        | 1<br>2 %    |
| <b><i>bla</i>CTX-M+<i>bla</i>TEM</b>                 | 10<br>20 %     | 0                            | 0                         | 1<br>2 %                    | 0                        | 11<br>22 %  |
| <b><i>bla</i>SHV + <i>bla</i>TEM</b>                 | 0              | 2<br>4 %                     | 0                         | 0                           | 0                        | 2<br>4 %    |
| <b><i>bla</i>CTX-M+ <i>bla</i>SHV+ <i>bla</i>TEM</b> | 1<br>2 %       | 2<br>4 %                     | 0                         | 0                           | 0                        | 3<br>6 %    |
| <b>Inespecíficas</b>                                 | 10<br>20 %     | 0                            | 1<br>2 %                  | 0                           | 0                        | 11<br>22 %  |
| <b>TOTAL</b>                                         | 40<br>80 %     | 6<br>12 %                    | 1<br>2 %                  | 1<br>2 %                    | 2<br>4 %                 | 50<br>100 % |

Fuente: Formulario de datos obtenidos del cepario del laboratorio microbiológico del Hospital del Río.

Autores: Julián Andrés Abad García - Kenny Carolina Guijarro Cartuche

El gen que predominó fue *bla*CTX-M1 en *E. coli* que corresponde a 14 (28 %), mientras que se detectaron la presencia de 3 genes *bla*CTX-M1 + *bla*SHV + *bla*TEM en 1 aislamiento (2 %) en *E. coli* y un 2 aislamientos (4 %) en *Klebsiella pneumoniae*.

**5.2.4** Asociar los genes *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M con resistencia a quinolonas y aminoglucosidos.

**Tabla 5.** Distribución de la resistencia y sensibilidad a las quinolonas por género y especie de bacterias del orden enterobacterales productoras de betalactamasas y sus genes.

| Género y especie                                  | <i>E.coli</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Salmonella complex</i> | <i>Klebsiella aerogenes</i> | <i>Proteus mirabilis</i> | TOTAL       |
|---------------------------------------------------|---------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------|
| <i>bla</i> CTX-M1                                 | 12<br>24 %    | 0                            | 0                         | 0                           | 0                        | 12<br>24 %  |
| <i>bla</i> SHV                                    | 0             | 0                            | 0                         | 0                           | 0                        | 0           |
| <i>bla</i> TEM                                    | 3<br>6 %      | 0                            | 0                         | 0                           | 1<br>2 %                 | 4<br>8 %    |
| <i>bla</i> CTX-M1+ <i>bla</i> SHV                 | 0             | 1<br>2 %                     | 0                         | 0                           | 0                        | 1<br>2 %    |
| <i>bla</i> CTX-M1+ <i>bla</i> TEM                 | 7<br>14 %     | 0                            | 0                         | 0                           | 0                        | 7<br>14 %   |
| <i>bla</i> SHV + <i>bla</i> TEM                   | 0             | 1<br>2 %                     | 0                         | 0                           | 0                        | 1<br>2 %    |
| <i>bla</i> CTX-M1+ <i>bla</i> SHV+ <i>bla</i> TEM | 0             | 2<br>4 %                     | 0                         | 0                           | 0                        | 2<br>4 %    |
| Inespecíficas                                     | 8<br>16 %     | 0                            | 1<br>2 %                  | 0                           | 0                        | 9<br>18 %   |
| Sensibles a quinolonas                            | 11<br>22 %    | 2<br>4 %                     | 0                         | 1<br>2 %                    | 0                        | 14<br>28 %  |
| <b>TOTAL</b>                                      | 41<br>82 %    | 6<br>12 %                    | 1<br>2 %                  | 1<br>2 %                    | 1<br>2 %                 | 50<br>100 % |

**Fuente:** Formulario de datos obtenidos del cepario del laboratorio microbiológico del Hospital del Río.

**Autores:** Julián Andrés Abad García - Kenny Carolina Guijarro Cartuche.

De las 50 bacterias pertenecientes al orden enterobacterales que mostraron resistencia a las quinolonas, en *E. coli* se presentaron 12 casos (24 %) con el gen CTX-M, *Klebsiella pneumoniae* portadora de genes *bla*CTX-M+ *bla*SHV+ *bla*TEM con 2 (4 %) y *Salmonella complex*.

**Tabla 6.** Distribución de la resistencia a los aminoglucosidos por género y especie de bacterias del orden enterobacterales productoras de betalactamasas y sus genes.

| Género y especie                  | <i>E. coli</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Salmonella complex</i> | <i>Klebsiella aerogenes</i> | <i>Proteus mirabilis</i> | TOTAL       |
|-----------------------------------|----------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------|
| <i>bla</i> CTX-M1                 | 0              | 0                            | 0                         | 0                           | 0                        | 0           |
| <i>bla</i> SHV                    | 0              | 0                            | 0                         | 0                           | 0                        | 0           |
| <i>bla</i> TEM                    | 0              | 0                            | 0                         | 0                           | 0                        | 0           |
| <i>bla</i> CTX-M1+ <i>bla</i> TEM | 1<br>2 %       | 0                            | 0                         | 0                           | 0                        | 1<br>2 %    |
| Inespecíficas                     | 0              | 0                            | 1<br>2 %                  | 0                           | 0                        | 1<br>2 %    |
| Sensibles a aminoglucosidos       | 39<br>78 %     | 6<br>12 %                    | 0                         | 1<br>2 %                    | 2<br>4 %                 | 48<br>96 %  |
| <b>TOTAL</b>                      | 40<br>80 %     | 6<br>12 %                    | 1<br>2 %                  | 1<br>2 %                    | 2<br>4 %                 | 50<br>100 % |

**Fuente:** Formulario de datos obtenidos del cepario del laboratorio microbiológico del Hospital del Río.

**Autores:** Julián Andrés Abad García - Kenny Carolina Guijarro Cartuche

De las 50 bacterias del orden enterobacterales aisladas que mostraron resistencia a los aminoglucósidos, *E.coli* portadora de genes *bla*CTX-M1+*bla*TEM 1 (2 %) y *Salmonella complex* 1 (2 %) sin presencia de genes BLEE fueron las únicas en presentarla.

## Capítulo VI

### 6.1 Discusión

En la actualidad, la producción de enzimas como las betalactamasas por parte de bacterias del orden enterobacteriales representa una problemática en la salud a nivel público y privado debido a que encarecen los diferentes servicios por la prolongación de estancia hospitalaria, uso de antibióticos con altos costes, entre otros. El presente estudio se desarrolló a partir de 50 cepas pertenecientes al orden Enterobacterales, previamente identificadas como positivas mediante métodos fenotípicos para la presencia de BLEE mediante el equipo VITEK II Compact, utilizado para el análisis de aislados clínicos del Hospital del Río en la ciudad de Cuenca. El propósito principal de este estudio fue identificar los genes de resistencia presentes en bacterias productoras de BLEE durante el periodo comprendido entre enero y junio de 2023. La confirmación de la producción enzimática se realizó de acuerdo con el protocolo del CLSI 2023, utilizando pruebas de doble disco y el crecimiento en medio de MacConkey con ceftriaxona a una concentración de 4 ug/mL. Posterior a esto se llevó a cabo la técnica de PCR convencional para la identificación de los genes de resistencia específicos.

En el estudio realizado por Oumar O. et al., titulado "Fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospital and community settings in Chad," llevado a cabo en Chad, África Central, durante el periodo de enero a marzo de 2017, se reporta que de los 89 aislados positivos para BLEE, *E. coli* fue la cepa frecuente representando el 71.9 % de los casos, seguido por *K. pneumoniae* con 17.97 %. Asimismo, en la investigación llevada a cabo por Adane Bitew y Estifanos Tsige en el laboratorio médico avanzado de Arsho durante los años 2016 a 2018, titulada "High Prevalence of Multidrug-Resistant and Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: A Cross-Sectional Study at Arsho Advanced Medical Laboratory, Addis Ababa, Ethiopia," se encontró que, de los 118 aislados de BLEE analizados, el 75.42 % correspondía a *E. coli*. Datos que concuerdan con esta investigación, en la que se identificó como la principal bacteria productora de BLEE a *E. coli* con el 80 % (40 / 50) de aislados. Esto se puede atribuir a la alta frecuencia de infecciones cuyo agente causal es *E. coli* a nivel mundial (92 - 95).

En la investigación desarrollada por F. Robin et al., titulada "Inventory of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in France as Assessed by a Multicenter Study," realizada en 2017 en diversos hospitales de Francia, se observó que gran parte de los aislados de BLEE se obtuvieron a partir de muestras de orina, alcanzando un 66 %. Esta



tendencia coincide con los hallazgos del estudio de Kuma Diriba, titulado "The magnitude of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from clinical samples in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis," donde las muestras de orina representaron el 46.5 % de los casos de BLEE. El presente estudio refleja similitud, debido a que de los 50 casos analizados 46 (92 %) se encontraron cepas productoras de BLEE en infecciones del tracto urinario. Esto se debe probablemente a que *E. coli* constituye una parte integral de la microbiota intestinal. Su proximidad anatómica entre el sistema excretor y el sistema urinario facilita la posibilidad de infecciones (96 - 101).

En el estudio de Stohr et al., sobre la determinación de genes de resistencia BLEE mediados por plásmidos en aislados clínicos en Países Bajos, se informó que los genes plasmídicos predominantes fueron *bla*CTX-M en un 32 %, *bla*SHV en un 18 %, y *bla*TEM en un 6 %. En la investigación de Tamma et al., en 2019, que aborda la diversidad epidemiológica molecular de cepas de enterobacterias en Estados Unidos, se evidenció que el 82.4 % de las cepas eran productoras de BLEE. Los genes detectados fueron *bla*CTX-M 86.7 %, *bla*TEM 2.6 %, y *bla*SHV 38.8 %. En el estudio llevado a cabo en la Amazonía de Perú por León et al., titulado "Caracterización molecular de enterobacterias multirresistentes en dos departamentos de la selva peruana", se encontró que del total de genes productores de BLEE aislados de 61 urocultivos, el 57.4 % eran productores de BLEE. Los genes prevalentes fueron *bla*CTX-M en un 41 %, *bla*TEM en un 24.6 %, y *bla*SHV en un 16.4 %. En Quito, Coral et al., en la investigación de "Caracterización molecular de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia Enterobacteriaceae" se identificó que del total de los aislados predominó *E. coli* 86.36 %, los cuales fueron productores de betalactamasas, donde el gen común fue *bla*CTX-M 11 (50 %) y *bla*TEM 4 (18 %). En relación con nuestra investigación, además se observó que el gen que predominó fue *bla*CTX-M1 (14) 28 % en su totalidad correspondientes a aislados de *E. coli*, seguido de la detección conjunta de *bla*CTX-M1 + *bla*TEM en (11) 22 %, 10 aislados de *E. coli* 20 % y 1 aislado de *Klebsiella aerogenes* 2 %. Además se detectó la presencia de tres genes (*bla*CTX-M1 + *bla*SHV + *bla*TEM) en un 6 % de los aislados, 1 aislamiento (2 %) en *E. coli* y 2 aislamientos (4 %) en *Klebsiella pneumoniae*; estos datos ratifican la frecuencia de *E. coli* productora de BLEE a nivel global. Estos estudios respaldan que el gen frecuente de circulación sigue siendo CTX-M, además revelan que las bacterias productoras de BLEE también pueden presentar la característica de poseer varios genes de resistencia. Este fenómeno se debe a la transferencia genética mediada por plásmidos (transformación, transducción y conjugación) que permiten que un microorganismo pueda adquirir otros genes de resistencia consecuentes para la adaptación bacteriana (19, 24, 101 - 106).

En la investigación de FarajzadehSheikh *et al.*, sobre la "Frecuencia de genes de resistencia a quinolonas entre cepas de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido aisladas de infecciones del tracto urinario", se identificó resistencia a quinolonas en el 59.88 %, de las cuales el 58 % eran productoras de BLEE. En la investigación llevada a cabo en Irán, titulada "Coexistencia de genes de resistencia a aminoglucósidos en aislados de *Klebsiella pneumoniae* productores de *bla*CTX-M en la provincia de Bushehr, Irán", Latifi *et al.*, identificaron que el 68.08 % de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* contenían el gen *bla*CTX-M y coexistían con genes de resistencia a aminoglucósidos, a pesar de que nuestro estudio se centró exclusivamente solo en la detección de genes asociados a producción de BLEE y no genes causantes de resistencia a los aminoglucósidos se evidenció la heterorresistencia en cepas como *E. coli* y *Salmonella complex*. La presencia de genes codificantes para BLEE y de enzimas modificadores de aminoglucósidos y quinolonas se encuentra mediado por plásmidos, constituyendo así un factor que contribuye a la heterorresistencia (106 - 107).

En cuanto al uso de antibióticos en medios de cultivos diferenciales y selectivos, Jacob *et al.*, en su estudio "Optimizing a Screening Protocol for Potential Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase *Escherichia coli* on MacConkey Agar for Use in a Global Surveillance Program", la confirmación de *E. coli* BLEE se logró en agar MacConkey con una concentración de 4  $\mu$ g/ml de cefotaxima, evidenciando que el 53.3 % de los aislados de *E. coli* expresaron fenotípicamente la producción de betalactamasas, lo que demuestra la utilidad de emplear este método para la caracterización de BLEE. En nuestra investigación, optamos por emplear ceftriaxona dado que también es una cefalosporina de tercera generación, aunque el uso del medio MacConkey más ceftriaxona no está estandarizado en el CLSI, obtuvimos resultados favorables en nuestro estudio, ya que el 100 % (50 cepas) mostraron crecimiento en este medio (66, 68, 108).

La aplicación del test de doble disco es un método estandarizado por el CLSI y constituye parte integral de las técnicas fenotípicas para la detección de BLEE. En nuestro estudio, se confirmó que continúa siendo fundamental para la identificación de BLEE, debido a que el 100 % de las cepas testeadas dieron positivo (66).

La detección temprana de BLEE, mediante el uso del medio macConkey más ceftriaxona representa una herramienta importante, de fácil acceso, así mismo las pruebas dadas por el CLSI tal como el test de doble disco, concede un cribado ágil y rápido, mientras que el

establecer la confirmación de genes circulantes de BLEE se vuelve fundamental ya que nos permite conocer la epidemiología molecular de dicha resistencia.

## Capítulo VII

### 7.1 Conclusiones

- La bacteria *E. coli* sigue siendo la principal bacteria del orden enterobacterial productora de betalactamasa de espectro extendido con el 80 %.
- El gen identificado como responsable de la producción de BLEE fue *bla*CTX-M1, representando el 28 %.
- Las bacterias pueden ser portadoras de hasta tres genes de BLEE.
- Las pruebas fenotípicas, como el test de doble disco para la detección de BLEE, estandarizadas según las directrices del CLSI 2023, junto con la identificación automatizada a través de VITEK II Compact, siguen demostrando su eficacia como herramientas de tamizaje en la detección de BLEE.
- La utilización de medios de cultivo selectivos diferenciales, como el MacConkey más ceftriaxona se presenta como una alternativa para realizar diagnósticos tempranos de BLEE en áreas con alta endemicidad.
- Existen bacterias productoras de BLEE que presentan heterorresistencia con las quinolonas y aminoglucósidos.

## 7.2 Recomendaciones

- Estandarizar diferentes pruebas para la extracción de material genético a costos accesibles y no automatizados.
- Ejecutar investigaciones con una muestra mayor de aislados clínicos bacterianos, incrementando así más datos concluyentes.
- Realizar campañas de concientización al personal de salud sobre el uso de programas de optimización de antimicrobianos (PROA) a nivel hospitalario con el fin de evitar el uso inadecuado de antibióticos de amplio espectro.
- Investigar otros genes BLEE como CTX-M 15, PER, VEB-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, CME-1, GES/IBS.
- Limitar el uso a medios preparados de MacCokey ceftriaxona con una antigüedad máxima de una semana.

### Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antibióticos [internet]. 2023. [Revisado 06 de Mayo del 2021]. Recuperado de: <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>>
2. Urquiza G, Arce J, Alanoca G. Resistencia bacteriana por beta lactamasas de espectro extendido: un problema creciente. Rev. Méd. La Paz [Internet]. 2018 [citado 2023 Mayo 06] ; 24( 2 ): 77-83. Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-89582018000200012&lng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-89582018000200012&lng=es).
3. Oliver A, Cantón R. Enterobacterias productoras de b-lactamasas plasmídicas de espectro extendido. SEIMC [Internet] 2012 [citado 2023 Mayo 06] Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Blees.pdf>
4. Servicio Galego de Saúde. Enterobacterias productoras de carbapenemasas. Galicia. [Internet] 2020 [citado 2023 Mayo 06] Disponible en: <https://www.sergas.es/Saude-publica/Enterobacterias-productoras-de-carbapenemasas?idioma=es#:~:text=Las%20enterobacterias%20son%20una%20familia,situaci%C3%B3n%20que%20se%20denomina%20colonizaci%C3%B3n>
5. Lopardo H, Predari S, Vay C. Manual de microbiología clínica de la asociación argentina de microbiología: Bacterias de Importancia Clínica. Parte 1. Enterobacterias. [Internet] Buenos Aires, Argentina 2016 [citado 2023 Mayo 06] 1(1). Disponible en: <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>
6. Pérez D. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Inf Ter Sist Nac Salud [Internet] Madrid 1998 [citado 2023 Mayo 06] 22 (3): 57-67. Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
7. Giono S, Santos J, Morfín M, Torres F, Alcántar M. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. Gac. Méd. Méx [Internet]. 2020 Abr [citado 2023 Mayo 06] ; 156( 2 ): 172-180. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0016-38132020000200172&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132020000200172&lng=es). Epub 26-Mayo-2021. <https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>.
8. García C, Castillo M, Salazar R. Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gramnegativas. Revista Cubana de Salud Pública. 2014;40(1): Disponible en: <https://www.scielosp.org/pdf/rcsp/2014.v40n1/129-135>
9. Levy S, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat Med. 2004 Dec;10(12 Suppl):S122-9. doi: 10.1038/nm1145. PMID:

- 15577930.
10. Garza U, Silva J, Martínez E. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud pública Méx* [Internet]. 2009 Ene [citado 2023 Mayo 06] ; 51( Suppl 3 ): s439-s446. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342009000900009&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000900009&lng=es).
  11. Celis Y, Rubio V, Camacho M. Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. *Rev. Colomb. Biote.* [Internet] 2017 Dic [citado 2023 Mayo 06] 19(2) 105 - 117 Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v19n2/0123-3475-biote-19-02-00105.pdf>
  12. Guzmán L Militza, Rodríguez Eliosmar, Antón C Karen, Silva Suyin, Navarro Jhonilys, Lastra Lorianys et al . Genes blaTEM, blaSHV y blaCTX-M en enterobacterias productoras de b-lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria. *Invest. clín* [Internet]. 2013 Sep [citado 2023 Mayo 08] ; 54( 3 ): 235-245. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0535-51332013000300002&lng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332013000300002&lng=es).
  13. Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ.* 1998 Sep 5;317(7159):657-60. doi: 10.1136/bmj.317.7159.657. PMID: 9727999; PMCID: PMC1113838.
  14. Levy, S., Marshall, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10 (Suppl 12), S122–S129 (2004). <https://doi.org/10.1038/nm1145>
  15. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A Review of SHV Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Front Microbiol.* 2016 Sep 5;7:1374. doi: 10.3389/fmicb.2016.01374. PMID: 27656166; PMCID: PMC5011133.
  16. Perozo A, Castellano M, Ginestre M, Harris B. Caracterización Molecular y Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en Cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* Aisladas en las Unidades de Cuidados Intensivos de un Hospital Universitario. *Kasmera* [Internet]. 2007 [citado el 8 de mayo de 2023];35(2):91–106. Disponible en: [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0075-52222007000200002#:~:text=La%20producci%C3%B3n%20de%20Betalactamasas%20de,a%20los%20antibi%C3%B3ticos%20%C3%9F%2Dlact%C3%A1micos](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222007000200002#:~:text=La%20producci%C3%B3n%20de%20Betalactamasas%20de,a%20los%20antibi%C3%B3ticos%20%C3%9F%2Dlact%C3%A1micos)
  17. Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC Antimicrob Resist.* 2021 Jul 16;3(3):dlab092. doi: 10.1093/jacamr/dlab092. PMID: 34286272; PMCID:

- PMC8284625.
18. Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea M, Giacobone E, et al. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol*. 2003 Sep;41(9):4264-9. doi: 10.1128/JCM.41.9.4264-4269.2003. PMID: 12958255; PMCID: PMC193787.
  19. León D, Fajardo A, Yareta J, Burgos A, Peralta C, et al. Caracterización molecular de enterobacterias multirresistentes en dos departamentos de la selva peruana. *Biomedica* [Internet]. 2021[citado el 8 de mayo de 2023]:180–7. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v41s2/2590-7379-bio-41-s2-180.pdf>
  20. Galindo M. Caracterización molecular y patrón de susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en infección del tracto urinario adquirida en la comunidad. *Rev Chilena Infectol* [Internet]. 2018 [citado el 8 de mayo de 2023];35(1). Disponible en: <https://www.revinf.cl/index.php/revinf/article/view/19>
  21. Loor J, Párraga C, Lucas E. Betalactamasas de espectro extendido en bacilos Gram negativos: caracterización y prevalencia por tipo de infección. *Revisión Sistemática Kasma*. 2021;49(Supl-1):e49S136019 doi: 10.5281/zenodo.5529681
  22. Supliguicha M, Supliguicha P, Ortega V, Pacurucu C, Lema J, et al. Factores de riesgo para la infección del tracto urinario por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* [Internet]. 2017;36(5):201-205. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55954942008>
  23. Orellana S, Rengifo C, Gómez C, Robles M, Villalva A, et al. Características microbiológicas de pacientes con urocultivos positivos del Hospital Universitario del Río, Ecuador. 2021[Internet]. 2021[citado el 8 de mayo de 2023]; Disponible en: [https://www.revistaavft.com/images/revistas/2021/avft\\_5\\_2021/9\\_caracteristicas\\_microbiologicas\\_pacientes.pdf](https://www.revistaavft.com/images/revistas/2021/avft_5_2021/9_caracteristicas_microbiologicas_pacientes.pdf)
  24. Coral D, Yauri F, Alcocer I. 2021. Caracterización molecular de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia Enterobacteriaceae. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 42(1): 63-77. doi: 10.26807/remcb.v42i1.886
  25. Orellana M, Silva P, Iñiguez D, Mora M, Toral C. Prevalencia de uropatógenos bacterianos y su resistencia antimicrobiana en pacientes con infección al tracto urinario durante el año 2019 en la ciudad de Cuenca. *ATENEO*, 24(1), 15-29. Disponible en: <https://colegiomedicosazuay.ec/ojs/index.php/ateneo/article/view/207>



26. Herrera García M, Arévalo Valdez C, Velásquez Porta T. Detección de los genes de  $\beta$ -lactamasas blaTEM, blaSHV y blaCTX-M en aislamientos de Escherichia coli comunitarios. Rev Cient [Internet]. 2019 [citado el 8 de mayo de 2023];28(2):41–53. Disponible en: <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/50/50602013/html/index.html>
27. Falconí A, Nolasco M, Bedoya A, Amaro C, Málaga G. Frecuencia y factores de riesgo para bacteriemia por enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido en pacientes de un hospital público de Lima, Perú. Rev. perú. med. exp. salud pública [Internet]. 2018 Ene [citado 2023 Mayo 08] ; 35( 1 ): 62-67. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342018000100010&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342018000100010&lng=es).
28. Castillo I. Las bacterias, estudio y cambios a lo largo de la historia. Rev. Dig. Uni. UNAM. [Internet] 1 de mayo de 2016, [citado 2023 Mayo 06] Vol. 17, Núm. 5. Disponible en Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.17/num5/art38/index.html> ISSN: 1607-6079.
29. Sierra E, León M. Terapia antibacteriana: origen y evolución en el tiempo. Rev.Med.Electrón. [Internet]. 2019 Oct [citado 2023 Mayo 06] ; 41( 5 ): 1300-1308. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1684-18242019000501300&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242019000501300&lng=es). Epub 31-Oct-2019.
30. González J, Maguiña C, González F. La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. Acta méd. Peru [Internet]. 2019 Abr [citado 2023 Mayo 06] ; 36( 2 ): 145-151. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1728-59172019000200011&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172019000200011&lng=es).
31. Oromí J. Resistencia bacteriana a los antibióticos. Medicina Integral [Internet] Diciembre 2000 [citado 2023 Mayo 06] 36 (10): 367-370 Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-losantibioticos-10022180>
32. Kenneth R, and Ray G. "Enterobacterias." Sherris. Microbiología médica, 6e Eds. McGraw Hill, 2017, <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2169&sectionid=162984036>.
33. Pérez P, Galán F, Gutierrez D, Guerrero I. Infecciones por enterobacterias. Medicine [Internet] Mayo 2014 [Citado 2023 Mayo 06] 11 (56): 3276-3282 Disponible en: <https://www.medicineonline.es/es-infecciones-por-enterobacterias-articulo-S0304541214707681?referer=seccion>
34. Rodríguez F, Vera A, Nogales N, Muñoz A. Infecciones por enterobacterias

- productoras de betalactamasas de espectro extendido tras cirugía cardíaca: su impacto en la mortalidad. Rev Col de Card. [Internet] Julio-Agosto 2016 [citado 2023 Mayo 06] 23 (4): 321-326 Disponible en: [https://www.elsevier.es/es-revista-revista-colombiana-cardiologia-203-articulo-infecciones-por-enterobacterias-productoras-betalactamasas-S0120563315002259#:~:text=Las%20localizaciones%20m%C3%A1s%20frecuentes%20fueron,\(42%2C6%25\).](https://www.elsevier.es/es-revista-revista-colombiana-cardiologia-203-articulo-infecciones-por-enterobacterias-productoras-betalactamasas-S0120563315002259#:~:text=Las%20localizaciones%20m%C3%A1s%20frecuentes%20fueron,(42%2C6%25).)
35. Caridad B. et al. Manual de Recogida, transporte y conservación de muestras. Servicio de Microbiología [Internet] 2022 [citado 2023 Mayo 06] 6ta ed. Disponible en: [https://www.chospab.es/area\\_medica/microbiologia/docTomaMuestras/1\\_Manual\\_recogida\\_transporte\\_conservacion\\_muestras\\_microbiologia.pdf](https://www.chospab.es/area_medica/microbiologia/docTomaMuestras/1_Manual_recogida_transporte_conservacion_muestras_microbiologia.pdf)
  36. Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología. SEIMC [Internet] 2003 [citado 2023 Mayo 06] Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>
  37. Broncoscopia con lavado broncoalveolar [Internet]. Medlineplus.gov. [citado el 28 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/broncoscopia-con-lavado-broncoalveolar/>
  38. Martínez C. NEUMONÍAS: CONCEPTO, CLASIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL [Internet]. Neumomadrid.org. [citado el 28 de diciembre de 2023]. Disponible en: [https://www.neumomadrid.org/wp-content/uploads/monogix\\_1.\\_neumonias-concepto.pdf](https://www.neumomadrid.org/wp-content/uploads/monogix_1._neumonias-concepto.pdf)
  39. Abreu R, López M, Truffin T, Morera D, Ramos R. Diagnóstico de infecciones genitales bajas no virales en pacientes procedentes de la Consulta de Ginecología infantojuvenil [Internet]. Sld.cu. [citado el 29 de diciembre de 2023]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/amdc/v17n1/2709-7927-amdc-17-01-73.pdf>
  40. Cabezas L, Caiata L, Gutiérrez C, Outeda M, et al. Manual de recolección, procesamiento e interpretación de cultivos en muestras clínicas obtenidas para estudio bacteriológico [Internet]. Redemc.net. [citado el 28 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://redemc.net/campus/wp-content/uploads/2018/03/ATB-01-Seija-Manual-muestras-ES-PUB.pdf>
  41. Hungate, RE, Halvorson, HO, Hutchison, K, Orrego, C. 2023. Bacteria. In: AccessScience. McGraw Hill. doi:10.1036/1097-8542.068100. [accessed 2024 Jan 04]. <https://www.accessscience.com/content/article/a068100>
  42. Jenkins C, Rentenaar R, Landraud L, Brisse S. 180 - Enterobacteriaceae, Infect. Dis.

- 2017; 4ed: 1565-1578.e2 DOI: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00180-5
43. De Vos P, Thompson F, Thompson C, Swings J (2017) A Flavor of Prokaryotic Taxonomy: Systematics Revisited. In: Microbial Resources. Elsevier, pp 29–
  44. Bisso-Andrade A. Fundamentos básicos de la terapia antimicrobiana Rev Soc Peru Med Interna. 2018;31(1):10-23.
  45. González Mendoza J, Maguiña Vargas C, González Ponce FM. La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. Acta Med Peru. 2019;36(2):145-51
  46. Ruiz Diana Rosa Fernández, Enríquez Maira Quirós, Pérez Olga Lidia Cuevas. Los antibióticos y su impacto en la sociedad. Medisur [Internet]. 2021 Jun [citado 2024 Ene 03] ; 19( 3 ): 477-491. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-897X2021000300477&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2021000300477&lng=es)
  47. Uddin T, et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. J. Infect. Public Health (2021); 14(12): 1750-1766. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
  48. IDMA Perú . LA TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES EL PELIGRO OCULTO DE LA INGENIERÍA GENÉTICA [Internet]. Instituto de Desarrollo y Medio Ambiente. 2022 [citado el 2 de enero de 2024]. Disponible en: <https://idmaperu.org/la-transferencia-horizontal-de-genes-el-peligro-oculto-de-la-ingenieria-genetica/>
  49. Treviño N, Molina N. Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana. UNLP 2022. Disponible en: [https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/136280/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/136280/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
  50. Bernabé C. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MECANISMOS DE ADAPTACIÓN PLASMÍDICA A NUEVAS FAMILIAS BACTERIANAS. [Internet]. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. 2019 [citado el 2 de enero de 2024]. Disponible en: <https://docta.ucm.es/rest/api/core/bitstreams/c5bdcd6f-4b35-42fa-9a1e-417b20cb41d7/content>
  51. Varela, Manuel F., Jerusha Stephen, Manjusha Lekshmi, Manisha Ojha, Nicholas Wenzel, Leslie M. Sanford, Alberto J. Hernandez, Ammini Parvathi, and Sanath H. Kumar. ¿. "Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents" Antibiotics 10, no. 5: 593. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050593>
  52. Astocondor L. Betalactamasas: La evolución del problema. Rev. Per. de Inv. en Salud. [Internet] Noviembre 2028. [Citado 2023 Mayo 06] 2(2): 42-49. Disponible en: <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/100/100308007/html/>

53. Robles J, Ocaña M, Madero P, Ruíz E, Garza E, et al. Resistencia antibiótica y agentes beta-lactamasa de espectro extendido en las infecciones del tracto urinario: un problema grave en el norte de Mexico. Rev Mex de Urología [Internet] Marzo-abril 2020 [Citado 2023 Mayo 06] 80 (2): 1-12. Disponible en: <https://revistamexicanadeurologia.org.mx/index.php/rmu/article/view/619/845>
54. Urquizo G, Arce J, Alanoca G. Resistencia bacteriana por beta lactamasas de espectro extendido: un problema creciente. Rev. Méd. La Paz [Internet]. 2018 [citado 2023 Mayo 07] ; 24( 2 ): 77-83. Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-89582018000200012&lng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-89582018000200012&lng=es).
55. García H, Científica R. Detección de los genes de  $\beta$ -lactamasas bla TEM , bla SHV y bla CTX-M en aislamientos de Escherichia coli comunitarios Detection of  $\beta$ -lactamase genes bla TEM , bla SHV and bla CTX-M in community isolates of Escherichia coli [Internet]. Amelica.org. [citado el 7 de mayo de 2023]. Disponible en: <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/50/50602013/50602013.pdf>
56. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. J Intensive Care. 2020 Jan 28;8:13. doi: 10.1186/s40560-020-0429-6. PMID: 32015881; PMCID: PMC6988205.
57. Logan K, Rispens R, Medernach L, Domitrovic N, Hujer M, et al. A Multicentered Study of the Clinical and Molecular Epidemiology of TEM- and SHV-type Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Enterobacterales Infections in Children. Pediatr Infect Dis J. 2021 Jan;40(1):39-43. doi: 10.1097/INF.0000000000002916. PMID: 33021591; PMCID: PMC7721995.
58. Mansor M, Ali K, Safaa A, Akeel B, Almulla A. Molecular Detection of *blaSHV-1a* Gene in *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Urinary Tract Infections, Najaf, Iraq. Arch Razi Inst. 2022 Jun 30;77(3):1181-1184. doi: 10.22092/ARI.2022.357617.2070. PMID: 36618308; PMCID: PMC9759235.
59. Eskandari-Nasab M, Moghadampour M, Tahmasebi M. Prevalence of *blaCTX-M* Gene among Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in Iran: A Meta-Analysis. Iran J Med Sci. 2018 Jul;43(4):347-354. PMID: 30046202; PMCID: PMC6055219.
60. Yoon J, Choi J, Kim D, Won D, Choi R. Amplification of the Chromosomal *blaCTX-M-14* Gene in Escherichia coli Expanding the Spectrum of Resistance under Antimicrobial Pressure. Microbiol Spectr. 2022 Jun 29;10(3):e0031922. doi: 10.1128/spectrum.00319-22. Epub 2022 Apr 25. PMID: 35467393; PMCID:

- PMC9241692.
61. Ghenea E, Zlatian M, Cristea M, Ungureanu A, Mititelu R, et al. TEM,CTX-M,SHV Genes in ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Samples in a County Clinical Emergency Hospital Romania-Predominance of CTX-M-15. *Antibiotics* (Basel). 2022 Apr 10;11(4):503. doi: 10.3390/antibiotics11040503. PMID: 35453254; PMCID: PMC9028254.
  62. Gamberale A, Bartoletti B, Cruz V, Matteo M, Latini C, Paul R, et al. UN DESAFÍO TERAPÉUTICO: LA HETERORRESISTENCIA EN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS [Internet]. *Medicinabuenosaires.com*. [citado el 29 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol83-23/n5/799.pdf>
  63. Singh A, Zhao X, Drlica K. Fluoroquinolone heteroresistance, antimicrobial tolerance, and lethality enhancement. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Sep 29;12:938032. doi: 10.3389/fcimb.2022.938032. PMID: 36250047; PMCID: PMC9559723.
  64. Portillo I. Heterorresistencia a fosfomicina en *Escherichia coli*: bases moleculares y efecto en su potencial terapéutico [Tesis Doctoral] Sevilla: Universidad de Sevilla.
  65. Stojowska-Swędryńska K, Łupkowska A, Kuczyńska-Wiśnik D, Laskowska E. Antibiotic Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 31;23(1):449. doi: 10.3390/ijms23010449. PMID: 35008891; PMCID: PMC8745652.
  66. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
  67. Hudzicki J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol [Internet]. *Asm.org*. [citado el 2 de enero de 2024]. Disponible en: <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>
  68. Tamma PD, Humphries RM. PRO: Testing for ESBL production is necessary for ceftriaxone-non-susceptible Enterobacterales: perfect should not be the enemy of progress. *JAC Antimicrob Resist*. 2021 May 7;3(2):dlab019. doi: 10.1093/jacamr/dlab019. PMID: 33987537; PMCID: PMC8103002.
  69. Galvis F, Moreno L. Caracterización molecular y detección de genes blaCTX-M grupos 1 y 9 en *Klebsiella pneumoniae* resistentes a ceftazidima, en un hospital de San José de Cúcuta, Colombia. *Rev. chil. infectol*. [Internet]. 2019 Jun [citado 2023 Mayo 07] ; 36( 3 ): 304-311. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182019000300304&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182019000300304&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000300304>.

70. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care*. 2020 Jan 28;8:13. doi: 10.1186/s40560-020-0429-6. PMID: 32015881; PMCID: PMC6988205
71. Van den Bunt G., et al.. Prevalence, risk factors and genetic characterisation of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E and CPE): a community-based cross-sectional study, the Netherlands, 2014 to 2016. *Euro Surveill*. 2019;24(41):pii=1800594. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.41.1800594>
72. Ouchar O., et al. Epidemiology and prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in humans, animals and the environment in West and Central Africa. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2021. 57(1)- DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106203>
73. Castanheira M, Simner P, Bradford P., Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection, *JAC-Antimicrobial Resistance*, September 2021; 3(3) DOI: <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>
74. Bush K, Bradford P. Epidemiology of  $\beta$ -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, Febrero 2020. 33(2) DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00047-19>
75. Merchán J, Gerardo J. Mecanismos de resistencia en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*. *Vive Rev. Salud [Internet]*. 2021 Dic [citado 2023 Mayo 06]; 4(12): 9-22. Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2664-32432021000300009&lng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2664-32432021000300009&lng=es). <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i12.105>.
76. Parrales A, Castro T, Castro A, Merchán K. Presencia de *klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) y betalactamasa de espectro extendido (BLEE) en pacientes hospitalizados. Una actualización *Rev. UTA [Internet]* Agosto 2022 [citado 2023 Mayo 06]; 7(4) Disponible en: <https://revistas.uta.edu.ec/erevista/index.php/enfi/article/download/1869/2265>
77. Zurita J, Solís M, Ortega D, Barba P, Paz A y Sevillano G. High prevalence of B2-ST131 clonal group among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from bloodstream infections in Quito, Ecuador. *J Glob Antimicrob Resist* 19:216–221. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.04.019>
78. Mendieta V, Gallegos J, Peña S. Frecuencia de (BLEE) (AmpC) y CARBAPENEMASAS en muestras de urocultivo, en cepas de *Escherichia Coli* de origen comunitario. *Vive Rev. Salud [Internet]*. 2021 Ago [citado 2024 Ene 05]; 4(

- 11 ): 275-284. Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2664-32432021000200275&lng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2664-32432021000200275&lng=es). <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i11.101>.
79. Cabrera C, Gómez R, Zuñiga A, Corral R, López B, et al. Epidemiology of nosocomial bacteria resistant to antimicrobials. Colombia Médica [Internet] Enero.Marzo 2011 [Citado 2023 Mayo 06] 42 (1): 117-125. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v42n1/v42n1a15.pdf>
80. Pineda L, Tzoc E, Rivera M, Herrera L, Moncada M. Caracterización clínico y epidemiológica en pacientes con infección por Enterobacteriaceae productoras de B lactamasas de espectro extendido (BLEE), Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras, Año 2013. Rev. Cien. y Tec. [Internet] Junio 2017 [Citado 2023 May 06] ; 2(20) Disponible en: <https://epidemiologia.unah.edu.hn/assets/Publicaciones-Dra-Maria-Felix/2017-enterobacterias-BLEE.pdf>
81. Flores V, Espinel C. Crioconservación de cepas bacterianas. Instituto del Mar de Perú [Internet]. Gob.pe. 2019; [citado el 2023 Mayo 06]. Disponible en: <https://rnia.produce.gob.pe/wp-content/uploads/2019/09/Protocolo-de-crioconservaci%C3%B3n-de-cepas-bacterianas.pdf>
82. Gómez J, Pérez O. Estandarización de un método para la conservación de cepas del laboratorio de microbiología de la Escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira. 2018 [citado el 29 de diciembre de 2023]; Disponible en: [https://www.semanticscholar.org/paper/79af7bec12e17f6a73cbbef1c98c6fbf9a9881e\\_c](https://www.semanticscholar.org/paper/79af7bec12e17f6a73cbbef1c98c6fbf9a9881e_c)
83. Aruhomukama D. Review of phenotypic assays for detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases: a microbiology laboratory bench guide. Afr Health Sci. 2020 Sep;20(3):1090-1108. doi: 10.4314/ahs.v20i3.11. PMID: 33402954; PMCID: PMC7751514.
84. National Human Genome Research Institute (NIH). Polymerase chain reaction (PCR) fact sheet [Internet]. Genome.gov. NHGRI; 2019 [citado el 2023 Mayo 06]. Disponible en: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet>
85. Jimenez B, Fuentes M, Sabanza M, López M, Miguel A, Ciprian G. Diagnóstico y tipos de PCR. Revisión bibliográfica. Rev. San. de Inves. [Internet] 2021 [citado 2023 Mayo 06] Disponible en: <https://revistasanitariadeinvestigacion.com/diagnostico-y-tipos-de-pcr-revision-bibliografica/>
86. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de

- la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Rev. Tec. en salud. [Internet] Mayo-Agosto 2013 [citado 2023 Mayo 06] 2 (2): 70-78. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2013/ir132d.pdf>
87. National Human Genome Research Institute (NIH). Sidransky E. Hybridization [Internet]. Genome.gov. [citado el 2023 May 06]. Disponible en: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/hybridization>
88. Coll P, Coque M, Domínguez M, Vázquez J, Vila J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. SEIMC [Internet] 2005 [citado 2023 Mayo 06] Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>
89. Taiwan Advanced Nanotech Inc. Inserto de muestra para:Nucleic Acid Extraction Kit. TANBead. 18 de Octubre de 2021. Versión 6.
90. Mancera P. Vallhebron.com. [citado el 5 de enero de 2024]. Disponible en: <https://vhir.vallhebron.com/sites/default/files/2022-06/UAT-quantificacio-fluorometrica-acids-nucleics.pdf>
91. Electroforesis [Internet]. Genome.gov. [citado el 28 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Electroforesis>
92. Ouchar O, et all. Fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospital and community settings in Chad. Antimicrob Resist Infect Control. 2019 Oct 31;8:169.doi: 10.1186/s13756-019-0626-z. PMID: 31695911; PMCID: PMC6824111.
93. Bitew A, Tsigie E. High Prevalence of Multidrug-Resistant and Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: A Cross-Sectional Study at Arsho Advanced Medical Laboratory, Addis Ababa, Ethiopia. J Trop Med. 2020 Apr 30;2020:6167234. doi: 10.1155/2020/6167234. PMID: 32411256; PMCID: PMC7210541.
94. Alarcon G, Allauca M, Tapia L, Bastidas T. Infección urinaria por Escherichia Coli multi resistente. RECIMUNDO. 2020 Ene; 4 (1): 99-107. doi: 10.26820/recimundo/4.(1).enero.2020.99-107
95. Salame L, et all. Epidemiología de las bacteriemias por Escherichia coli en dos hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. An Med (Mex) 2018; 63 (2): 91-95.
96. Robin F, Beyrouthy R, Bonacorsi S, Aissa N, Bret L, et al., .Inventory of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in France as Assessed by a Multicenter Study. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Feb 23;61(3):e01911-16. doi: 10.1128/AAC.01911-16. PMID: 27956424; PMCID: PMC5328551..



97. Diriba K, Awulachew E, Gemele A, Anja A. The magnitude of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from clinical samples in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *Access Microbiol.* 2021 Jan 28;3(3):000195. doi: 10.1099/acmi.0.000195. PMID: 34151151; PMCID: PMC8209701.
98. Bush L. Infecciones por *Escherichia coli*. MSD 2022. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-ec/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-gramnegativas/infecciones-por-haemophilus-influenzae>
99. Magruder M, Sholi AN, Gong C, Zhang L, et al. Gut uropathogen abundance is a risk factor for development of bacteriuria and urinary tract infection. *Nat Commun.* 2019. 10(5521).
100. Paalanne N, Huso A, Salo J, Pieviläinen O, Tejesvi M, et al., Intestinal microbiome as a risk factor for urinary tract infections in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018. 37: 1881-1891
101. Stohr J, Kluytmans B, Wedema R, et al., . Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes and plasmid replicons in *Enterobacteriaceae* using PlasmidSPAdes assembly of short-read sequence data. *Microb Genom.* 2020 Jul;6(7):mgen000400. doi: 10.1099/mgen.0.000400. Epub 2020 Jun 26. PMID: 32589571; PMCID: PMC7478632.
102. Tamma PD, Sharara SL, Pana ZD, Amoah J, Fisher SL, Tekle T, Doi Y, Simner PJ. Molecular Epidemiology of Ceftriaxone Non-Susceptible Enterobacteriales Isolates in an Academic Medical Center in the United States. *Open Forum Infect Dis.* 2019 Aug 11;6(8):ofz353. doi: 10.1093/ofid/ofz353. PMID: 31401649; PMCID: PMC6736082.
103. Bastidas C, Romero D, Valdez V, Morales R, Montalvo A et al., Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* in South America: A Systematic Review with a One Health Perspective. *Infect Drug Resist.* 2022 Sep 30;15:5759-5779. doi: 10.2147/IDR.S371845. PMID: 36204394; PMCID: PMC9531622.
104. Suarez C, Monteghirfo M, Gonzales E. Determinación de perfiles plasmídicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido aisladas en urocultivos. *An Fac med.* 2018;79(1):35-43 DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v79i1.14590>
105. Hillman T. Plasmid carriage and the natural complexity of bacterial populations contributes to plasmid persistence. *Iberoam J Med [Internet].* 2022 [citado 2023 Dic 28] ; 4( 3 ): 143-156. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2695-50752022000300004&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2695-50752022000300004&lng=es). Epub 04-Dic-2023. <https://dx.doi.org/10.53986/ibjm.2022.0024>.

106. FarajzadehSheikh A, Veisi H, Shahin M, Getso M, Farahani A. Frequency of quinolone resistance genes among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections. Trop Med Health. 2019 Mar 4;47:19. doi: 10.1186/s41182-019-0147-8. PMID: 30872947; PMCID: PMC6399935.
106. Latifi B, Tajbakhsh S, Ahadi L, Yousefi F. Coexistence of aminoglycoside resistance genes in CTX-M-producing isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Bushehr province, Iran. Iran J Microbiol. 2021 Apr;13(2):161-170. doi: 10.18502/ijm.v13i2.5975. PMID: 34540150; PMCID: PMC8408026.
108. Jacob E, Keelara S, Aidara-Kane A, Alvarez J, Fedorka-Cray P. Optimizing a Screening Protocol for Potential Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase *Escherichia coli* on MacConkey Agar for Use in a Global Surveillance Program. J Clin Microbiol. 2020 Aug 24;58(9):e01039-19. doi: 10.1128/JCM.01039-19. PMID: 32434784; PMCID: PMC7448649.

## Anexos

## Anexo A: Operacionalización de variables

| Variable                                  | Definición                                                                                                                            | Dimensión                                                                      | Indicador                                               | Escala                                                                                                     |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Género bacteriano</b>                  | Conjunto de especies que poseen características específicas                                                                           | Cultivo                                                                        | Formulario de recolección de datos                      | <i>Escherichia sp</i><br><i>Salmonella sp</i><br><i>Klebsiella sp</i>                                      |
| <b>Tipo de muestra</b>                    | Porción limitada de distinta sustancia que proviene de un organismo                                                                   | Líquido biológico                                                              | Formulario de recolección de datos                      | Orina<br>Sangre<br>Heces<br>Secreciones de piel y tejidos                                                  |
| <b>Genes BLEE</b>                         | Locus específico que otorga resistencia <i>Blee</i>                                                                                   | Presencia o ausencia del gen <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> SHV y <i>bla</i> CTX-M | Expresión del gen                                       | Presencia o ausencia del gen:<br><i>bla</i> TEM,<br><i>bla</i> SHV y <i>bla</i> CTX-M                      |
| <b>Test de doble disco</b>                | Prueba fenotípica indicadora de producción de BLEE                                                                                    | Presencia o ausencia del halo de inhibición                                    | Diferencia entre el diámetro de los halos de inhibición | Positivo: ≥ 5mm<br>Negativo: < 5mm                                                                         |
| <b>Cultivo MacConkey-ceftriaxona</b>      | Cultivo de agar MacConkey con antibiótico que evidencia la presencia de bacteria productora de BLEE que hidrolizan las cefalosporinas | Cultivo                                                                        | Crecimiento bacteriano en el medio de MacConkey         | Positivo: Presencia de crecimiento bacteriano<br>Negativo: ausencia de crecimiento bacteriano              |
| <b>Heterorresistencia quinolonas</b>      | Microorganismo capaz de hidrolizar a las quinolonas y además presenta producción de BLEE                                              | Antibiograma                                                                   | Formulario de recolección de datos                      | Positivo: resistencia a ciprofloxacina, norfloxacina<br>Negativo: sensible a ciprofloxacina y norfloxacina |
| <b>Heterorresistencia aminoglucósidos</b> | Microorganismo capaz de hidrolizar a los aminoglucósidos y además presenta producción de BLEE                                         | Antibiograma                                                                   | Formulario de recolección de datos                      | Positivo: resistencia a amikacina,<br>Negativo: sensible a amikacina                                       |

**Anexo B:** Instrumento de recolección

“Genes de resistencia en bacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido, en aislados clínicos del Hospital del Río, Cuenca 2023”

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

|                                                                                     |                                                  |                          |                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| <b>DATOS</b>                                                                        |                                                  |                          |                                   |
| <b>Género bacteriano:</b>                                                           |                                                  |                          |                                   |
| <b>Tipo de muestra</b>                                                              |                                                  |                          |                                   |
| Orina de micción media <input type="checkbox"/>                                     | Exudado de piel <input type="checkbox"/>         |                          |                                   |
| Orina por punción suprapúbica <input type="checkbox"/>                              | Líquido peritoneal <input type="checkbox"/>      |                          |                                   |
| Heces <input type="checkbox"/>                                                      | Lavado bronquioalveolar <input type="checkbox"/> |                          |                                   |
| Sangre <input type="checkbox"/>                                                     | Otro:-----                                       |                          |                                   |
| <b>Pruebas fenotípicas de resistencia bacteriana</b>                                |                                                  |                          |                                   |
| <b>Test de doble disco:</b>                                                         | Positivo                                         | <input type="checkbox"/> | Negativo <input type="checkbox"/> |
| <b>Cultivo MacConkey-ceftriaxona:</b>                                               | Positivo                                         | <input type="checkbox"/> | Negativo <input type="checkbox"/> |
| <b>Heterorresistencia quinolonas:</b>                                               | Positivo                                         | <input type="checkbox"/> | Negativo <input type="checkbox"/> |
| <b>Heterorresistencia aminoglucósidos:</b>                                          | Positivo                                         | <input type="checkbox"/> | Negativo <input type="checkbox"/> |
| <b>Pruebas genotípicas de resistencia bacteriana:</b>                               |                                                  |                          |                                   |
| <i>bla</i> CTX: positivo ___ negativo ___ <i>bla</i> TEM: positivo ___ negativo ___ |                                                  |                          |                                   |
| <i>bla</i> SHV: positivo ___ negativo ___                                           |                                                  |                          |                                   |

**Anexo C: Oficio de autorización**

OFICIO AL DIRECTOR DEL HOSPITAL DEL RÍO

Cuenca, 11 de mayo de 2023

Dr. Óscar Miguel Chango

DIRECTOR DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DEL RÍO

Presente

De nuestra consideración:

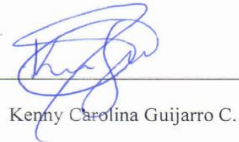
Luego de un cordial y atento saludo, Yo Kenny Carolina Guijarro Cartuche, Yo Julián Andrés Abad García, estudiantes de la **Universidad de Cuenca, Carrera de Laboratorio clínico**, mediante el presente solicitamos a usted como Director del Hospital Universitario del Río, la carta de interés de la institución a fin de continuar con el trámite de núcleo cuenca aprobación para desarrollar el proyecto de investigación con el tema: **GENES DE RESISTENCIA EN BACTERIAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO, EN AISLADOS CLÍNICOS DEL HOSPITAL DEL RÍO, CUENCA 2023**, bajo la tutoría en la institución de la Lcda. Solmayra Agreda.

Por la favorable y agradecida acogida a la presente, anticipamos nuestro agradecimiento.

Atentamente



Julián Andrés Abad G.



Kenny Carolina Guijarro C.

