UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TÍTULO:

Enterobacteriaceae resistentes a carbapenémicos aisladas en muestras de pacientes hospitalizados.

TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE LICENCIADO EN LABORATORIO CLÍNICO.

AUTOR:
DAVID ALEJANDRO GALLEGOS CRIOLLO

DIRECTOR:
LCDA. CARMEN ALEJANDRA ULLAURI GONZALEZ, MG.SC

Loja – Ecuador

2021

Certificación.

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de la elaboración del trabajo titulado: "ENTEROBACTERIACEAE RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS AISLADAS EN MUESTRAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS" de autoría del Sr. David Alejandro Gallegos Criollo, previo a la obtención del título de Licenciado en Laboratorio Clínico, ha sido desarrollada, corregida y orientada bajo mi dirección y en el marco del Reglamento del Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja vigente.

Loja, 25 de octubre, 2021

Atentamente,

CARMEN ALEJANDRA
ULLAURI GONZALEZ

Lcda. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

Autoría

Yo David Alejandro Gallegos Criollo con Cl. 1104806532 declaro ser autor del presente trabajo de tesis titulado "ENTEROBACTERIACEAE RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS AISLADAS EN MUESTRAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS", como requisito para obtener el título de Licenciado en Laboratorio Clínico; y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación del presente trabajo en el Repositorio Institucional de la Biblioteca Virtual.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, 21 de Enero del 2022.

Firmado electrónicamente por:
DAVID ALEJANDRO
GALLEGOS CRIOLLO

Firma: ……

Autor: David Alejandro Gallegos Criollo

Cedula: 1104806532

Correo electrónico: criollod08@gmail.com / david.gallegos@unl.edu.ec

Teléfono: 0960657327

Carta de autorización.

Yo, **David Alejandro Gallegos Criollo** declaro ser autor de la tesis titulada **"Enterobacteriaceae resistentes a carbapenémicos aisladas en muestras de pacientes hospitalizados"**, como requisito para optar al grado de Licenciado en Laboratorio Clínico; autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre al mundo la producción intelectual de la universidad, a través de su visibilidad del contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo de investigación en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Nacional de Loja.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero. Para constancia de esta autorización, en la Ciudad de Loja, a los 21 días del mes de Enero del 2022.

Firmado electrónicamente por:
DAVID ALEJANDRO
GALLEGOS CRIOLLO

……

Autor: David Alejandro Gallegos Criollo

Cédula de identidad: 1104806532 Correo electrónico: david.gallegos@unl.edu.ec

Teléfono: 0960657327.

Datos Complementarios:

Directora de Tesis: Lcda. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

Tribunal de grado:

Presidenta del tribunal: Lic. María del Cisne Loján.

Miembro del tribunal: Bq. María del Cisne Luzuriaga.

Miembro del tribunal: Lic. Iliana Alicia Delgado.

Dedicatoria

Dedico mi tesis primeramente a Dios, por darme la oportunidad de subir un peldaño más y siempre guiar mis pasos.

Dedico mi tesis a mi familia, a las personas más especiales de mi vida y que me han ayudado en todo momento; a mi madre y mis abuelos, por su esmero y esfuerzo por formarme con valores sólidos y con mucho cariño. A mis tíos, primos y amigos por apoyarme en todo momento.

Dedico mi tesis a esa persona especial que creyó en mí, me apoyo y motivo a lograrlo.

Dedico mi tesis a las personas que siempre creyeron en mí, me apoyaron y me brindaron oportunidades de demostrarles mis capacidades.

Agradecimiento.

Agradezco primeramente a Dios, por la oportunidad de terminar con éxito esta etapa de mi vida.

A mi familia, por estar apoyándome siempre y brindarme consejos para seguir adelante.

A mi madre y mis abuelos, en especial por brindarme siempre muy buenos valores y ser mi razón de seguir adelante.

A mi directora de tesis Lic. Carmen Ullauri, por su dedicación, ayuda con su conocimiento, guía durante el desarrollo de mi tesis, y por su confianza en mis capacidades.

A todos los docentes que me ayudaron en la formación académica durante el transcurso de la carrera.

Al Laboratorio Clínico del Hospital Isidro Ayora, y al personal que labora aquí, por su ayuda y colaboración en la recolección de datos.

A profesionales de Laboratorio Clínico, que me ayudaron, apoyaron y brindaron un consejo en durante este tiempo.

Índice

Carátula..... I

Certificación II

Autoría III

Carta de autorización IV

Dedicatoria V

Agradecimiento VI

1. Título 1
2. Resumen… 2
3. Introducción..... 3
4. Revisión de la literatura… 8

1. Bacterias 8

1.1. *Enterobacteriaceae* 8

1.1.1. Escherichia..... 9

1.1.2. Shigella 11

1.1.3. Salmonella 13

1.1.4. Enterobacter..... 15

1.1.5. Klebsiella 17

1.1.6. Serratia..... 18

1.1.7. Citrobacter 19

1.1.8. Proteus 20

1.1.9. Yersinia..... 22

1.1.10. Providencia 22

1.1.11. Morganella 23

2. Mecanismos de patogenicidad de las *Enterobacteriaceae* 24

3. Antibióticos activos para bacilos Gram negativos 25

3.1. Destructores de la pared celular 25

3.1.1. Betalactámicos 25

3.1.2. Polimixinas 28

3.2. Inhibidores de la biosíntesis de proteínas 28

3.2.1. Aminoglucósidos 28

3.2.2. Tetraciclinas 28

3.2.3. Macrólidos 29

3.3. Inhibidores de la replicación del ADN 29

3.3.1. Quinolonas 29

4. Métodos de determinación de susceptibilidad antimicrobiana 29

4.1. Métodos de difusión 29

4.2. Métodos de dilución 30

5. Resistencia bacteriana 31

6. Mecanismos de resistencia en Enterobacteriaceae 32

6.1. Mecanismos contra Betalactámicos 33

6.2. Mecanismos contra Aminoglucósidos 35

6.3. Mecanismos contra Carbapenémicos 37

7. Clasificación de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y Carbapenemasas 37

7.1. Betalactamasas de espectro extendido… 37

7.2. Carbapenemasas 38

8. Métodos de detección… 41

8.1. Métodos fenotípicos 42
8.1.1. Concentración mínima inhibitoria 42
8.1.2. Prueba de inactivación del carbapenémico 42
8.1.3. Test colorimétrico 43
8.2. Métodos genotípicos 43
8.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa convencional 43
8.2.2. FilmArray 44
8.2.3. MicroArrays 44
8.2.4. GeneXpert 44
5. Materiales y métodos 45
6. Resultados 49
7. Discusión 58
8. Conclusiones 61
9. Recomendaciones 62
10. Bibliografía 63
11. Anexos 73

1. Titulo.

"*Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos aisladas en muestras de pacientes hospitalizados"

2. Resumen

La familia *Enterobacteriaceae* forma parte de la microbiota del organismo compitiendo con otros microorganismos patógenos; actúan como oportunistas causando más de 50% de infecciones intrahospitalarias, tienen alta capacidad de adaptación ubicándose en el grupo de superbacterias con índices altos de multiresistencia, gracias a la común administración no controlada de medicamentos. El presente trabajo tuvo como objetivo conocer los genes productores de carbapenemasas en *Enterobacteriaceae* aisladas en muestras de pacientes hospitalizados en el Hospital Isidro Ayora, Loja; mediante un estudio descriptivo-transversal, se aislaron 32 Enterobacterales productoras de carbapenemasas. Los resultados obtenidos nos demuestran que *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, son las bacterias que predominan en infecciones en pacientes hospitalizados; *Klebsiella. pneumoniae* presenta mayores índices de resistencia; siendo así el gen productor de carbapenemasa que predomina en el área local el *bla*KPC.

Palabras clave: Enterobacterales, farmacorresistencia bacteriana, infección, hospitalizados, genes.

Summary

The *Enterobacteriaceae* family is part of the organism's microbiota, competing with other pathogenic microorganisms; they act as opportunists causing more than 50% of nosocomial infections, have a high capacity for adaptation, being located in the group of superbugs with high multi-resistance indices, due to the common administration of no controlled medication. The present work aimed to know the genes Carbapenemase Producers in *Enterobacteriaceae* Isolated from Patient Samples hospitalized at the Isidro Ayora Hospital, Loja; Through a descriptive-cross-sectional study, isolated 32 carbapenemase-producing Enterobacterals. The results obtained evidence that Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli are the predominant bacteria infections among hospitalized patients; Klebsiella. pneumoniae presents higher indices of resistance; Thus, the carbapenemase-producing gene that predominates in the local area is the blaKPC.

Key words: Enterobacterals, bacterial drug resistance, infection, hospitalized, genes.

3. Introducción.

Enterobacteriaceae es una familia bacteriana de las más diversas y causantes universales de más del 50% de las infecciones en hospitales, así mismo la tasa de portadores se incrementa notablemente en los pacientes hospitalizados y las mayores tasas de colonización se relacionan principalmente con el uso inadecuado de antibióticos. (Ocampos Ugarte & Takahasi Alvarez, 2015)

La mayoría de *Enterobacteriaceae* forman parte de la microbiota intestinal, ayudando en la absorción de nutrientes y defendiendo el espacio del ataque de microorganismos ajenos al lugar; a diferencia de otras que son altamente patógenas pudiendo causar infecciones de vías urinarias leves o infecciones complicadas como sepsis; el tratamiento y erradicación dependerá de factores como la zona de infección, la presencia de mecanismos de resistencia, presencia de vía central u otros dispositivos, estado inmunitario del paciente, enfermedades crónicas, estancias hospitalarias prolongadas y el uso previo de antibióticos particularmente cefalosporinas de amplio espectro. (Jawetz, Melnick, 2013; Rojo et al., 2018)

La resistencia bacteriana es un fenómeno progresivo caracterizado por una respuesta disminuida de los grupos de antibióticos ya sea de forma parcial o total contra los microorganismos, causado por el uso indiscriminado de los mismos además de la presión evolutiva de los patógenos. Dicha resistencia puede ser intrínseca o propia del microrganismo cuando posee mecanismos propios determinados genéticamente que no tienen dependencia con las dosis de antibióticos suministradas; pero también tenemos la resistencia adquirida ya sea por mutaciones en el ADN, o por adquisición de genes a través de trasposones, integrones o plásmidos, en los cuales la administración incontrolada de antibióticos tiene gran repercusión, ocasionando transformaciones como por ejemplo: la de una Betalactamasa en Betalactamasa de espectro extendido, etc. dicha resistencia es considerada una crisis preocupante a nivel mundial; que va en

estado creciente, por tal razón quedan pocas opciones terapéuticas para múltiples infecciones sin que estas adquieran pronta resistencia a la mayoría de antibióticos; asociándose a altas tasas de morbilidad y mortalidad, limitaciones en las opciones terapéuticas e incremento en los costos por terapias alternativas y estadía hospitalaria por largos periodos. (Alós, 2015; Toledo Barrigas, 2015)

La Organización Mundial de la Salud (2017) indica: “La resistencia a los antibióticos es hoy en día una de las mayores amenazas para la salud mundial, seguridad alimentaria y desarrollo”; por otro lado, la Organización Panamericana de la Salud (2017) también señala “La resistencia a los antimicrobianos pone en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento de una serie cada vez mayor de infecciones por virus, bacterias, hongos y parásitos”

Un estudio realizado en un Hospital Universitario de Piura, Perú demostró que el 2.16% de frecuencia de infecciones esta causado por *Enterobacteriaceae* productoras de betalactamasas tipo AmpC y un 14.39 % por betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) con mayor prevalencia en *K. pneumoniae* seguido de *E. coli.* (Dedios Periche, 2018)

Por otro lado, un estudio realizado durante el año 2017 en un Hospital de la cuidad de Latacunga, Ecuador, indicó la presencia de *E. coli* aislada de muestras de orina donde el 15 % de estas corresponde a cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido y 5 % a cepas con betalactamasas tipo AmpC. (Álvarez, 2017)

Un estudio más cercano dirigido a analizar los mecanismos de resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos en un Hospital de la cuidad de Loja durante el período julio-noviembre 2013, dio como resultado la presencia del 26,4% de cepas productoras de BLEE; y el 11,2% mostró resistencia a carbapenémicos, y de las cuales el 1,6% corresponden a cepas productoras de carbapenemasas; dichos resultados denotan una alta prevalencia de cepas productoras de BLEE a

nivel intrahospitalario y ambulatorio, mientras que los productores de carbapenemasas se presentaron únicamente a nivel intrahospitalario. (Toledo Barrigas, 2015)

Los genes que codifican carbapenemasas, usualmente se encuentran en plásmidos o en otros elementos genéticos móviles; dicha movilidad ha permitido su mayor diseminación en enterobacterias como: *E. coli, Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Serratia*, y especies de *Salmonella*; siendo demostrado en diversos aislamientos donde se hallan patógenos multirresistentes, extremadamente resistentes o panresistentes. (Meletis, 2016)

Un estudio de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias de hospitales de Perú, durante el periodo 2013-2017, han confirmado la presencia de carbapenemasas en: *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis. Providencia rettgeri, Providencia stuartii, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Citrobacter freundii*, portando los genes de resistencia blaKPC (31,3 %), blaNDM (67,5 %), y blaIMP (1,2 %). (Sacsaquispe-Contreras & Bailón-Calderón, 2018)

Por otra parte el Ministerio de Salud Pública del Ecuador en el Plan Nacional para la Prevención y Control de la Resistencia Antimicrobiana; informó que los primeros aislamientos de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos (CRE) datan de 2010, donde se registró el primer reporte de *Klebsiella* productora de carbapenemasas, posteriormente se notificaron casos en hospitales de Quito, Azogues, Guayaquil y Cuenca; siendo hasta el año 2012 identificados 22 géneros de bacterias con enzimas tipo KPC; ya para el 2015 en el Hospital Luis Vernaza de Guayaquil se aisló *Providencia rettgeri* NDM-1, pero KPC seguía siendo hasta ahí la carbapenemasa más frecuentemente identificada distribuida en *K. pneumoniae, E. coli, K. oxytoca, Serratia marcescens, Citrobacter freundii, Enterobacter cloacae y Proteus mirabilis*. Hasta que en 2018 a través del Centro Nacional de enlace se notificó el hallazgo de *Raoutella ornithinolytica*

productora de OXA-48 siendo el primer reporte de la enzima en una bacteria considerada ambiental hasta ese momento aislada a nivel hospitalario. (Ministerio de Salud Publica, 2018)

Gracias a la resistencia a carbapenémicos, día tras día quedan menos opciones terapéuticas y uno de los compuestos usados como última alternativa contra microorganismos multirresistentes es colistín, una polimixina en desuso por su alta toxicidad; pero ha resurgido como medicamento de última línea; aunque también existen otras opciones de terapia con antibióticos combinados como por ejemplo ceftazidime/avibactam y ceftolozano/tazobactam, pero que en nuestro país no son de uso común por su gran costo y dificultad de conseguirlos. (Ugarte Silva et al., 2018)

Ante este escenario se propuso el siguiente estudio: identificar las bacterias que causan infecciones en pacientes hospitalizados y describir los genes que producen las *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos aisladas en dichos pacientes en un hospital de segundo nivel de complejidad. Dichos resultados buscaron aportar con datos apegados a la realidad local como aporte científico y que motive no solo la prescripción del tratamiento adecuado, sino, el establecimiento de medidas que promuevan el uso racional de antibióticos.

4. Revisión de la literatura.

1. Bacterias.

Son organismos procariontes unicelulares de tamaño relativamente pequeño que se encuentran en casi todas las partes de la tierra debido a las adaptaciones que tiene y pueden adquirir; poseen un ADN circular en la mayoría de especies con un solo cromosoma, que se acomoda en el espacio intracelular, ya que carecen de núcleo definido; en su mayoría poseen pared celular compuesta de peptidoglucano aunque existen excepciones (micoplasmas), muchas de estas también disponen de flagelos en diferentes ubicaciones con funciones específicas. Su clasificación puede darse por la forma en las que se presentan ya sean esferas (cocos), barras (bacilos), filamentos curvados (vibrios) y helicoidales (espirilos o espiroquetas); por su acomodación; por su tinción en gram negativas, gram positivas y acido alcohol resistentes; y por sus factores de crecimiento como temperatura, nutrientes y ambiente. (Jawetz, Melnick, 2013; Murray et al., 2017)

1.1. Enterobacteriaceae.

Son una familia extensa y variada de bacilos Gram negativos, en su mayoría son anaerobios o aerobios facultativos, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja con más de 150 antígenos somáticos termolábiles o lipopolisacáridos, más de 100 antígenos K o capsulares termolábiles, y más de 50 antígenos H o flagelares; además de producir diversas toxinas y otros factores de virulencia, algunos son móviles con flagelos peritricos y otros no. (Jawetz, Melnick, 2013; Murray et al., 2017)

Dentro de esta familia tenemos varios géneros como son *Escherichia, Shigella, Salmonella, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Proteus* y otros más, que habitan principalmente en el intestino tanto de humanos como de aminales; algunos de estos microorganismos forman parte de la microbiota normal y rara vez producen enfermedad como es el caso de *Escherichia coli*; pero por el contrario hay otros altamente patógenos como *Salmonella* o *Shigella*. (Jawetz, Melnick, 2013)

Según Murray, las enterobacterias más frecuentes con mayor importancia clínica son; *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Citrobacter freundii, Citrobacter koserí, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Morganella morganii, Proteus mirabilis, Proteus vulgarís, Salmonella entérica, Serratia marcescens, Shigella sonnei, Shigella flexneri, Yersinia pestis, Yersinia enterocolitica y Yersinia pseudotuberculosis.* (Jawetz, Melnick, 2013; Murray et al., 2017)

1.1.1. Género Escherichia.

Dentro de este género se agrupan cinco especies; de las cuales *E. hermannii y E. vulneris* ocasionan infecciones de heridas, aunque su papel patógeno ha sido muy discutido desde años atrás; se ha confirmado el rol patógeno de esta última en heridas; *E. fergusonnii* se relaciona con ciertas patologías entéricas; *E. blattae* se considera como ajena al hombre; siendo *E. coli* la de mayor importancia clínica para el humano, ya que forma parte de la microbiota normal del intestino pudiendo causar síndromes diarreicos e incluso infecciones extraintestinales. (C. Pérez et al., 2018)

E. coli se ha estudiado de tal manera que actualmente es la forma de vida libre más perfectamente comprendida sobre la tierra; es una bacteria que crece fácil en medios de peptona enriquecidos con sangre, en medios diferenciales y su cultivo in vitro no es difícil; suele ser móvil en su mayoría, y gran parte de sus serotipos fermentan lactosa y son capaces de producir indol a partir de triptófano; las patologías a las cuales está asociada son: infecciones del sistema urinario; infecciones respiratorias; infecciones del sistema nervioso central; septicemia; y síndromes diarreicos, haciendo referencia a esta última patología existen diversos tipos de *E. coli* diarreogénicas, las cuales son *E. coli enteropatógena* (ECEP); *E. coli enterotoxígena* (ECET); *E. coli enteroinvasiva* (ECEI); *E. coli enteroagregativa* (ECEA) *E. coli adherencia difusa* (DAEC) y *E. coli enterohemorrágica* (ECEH) o productora de toxina shiga (STEC). (Ríos-Muñiz et al., 2019; Vázquez et al., 2014)

Este microorganismo es la causa más frecuente de infección de las vías urinarias; y se ha denominado E. coli uropatógena, las que afectan a la vejiga o al riñón en un hospedador sano poseen un pequeño número de antígenos O y producen hemolisinas que son citotóxicas y facilitan la colonización e invasión a los tejidos para su posterior infección; otras cepas que producen pielonefritis expresan el antígeno K y elaboran fimbrias P que se unen al antígeno del grupo sanguíneo. (Jawetz, Melnick, 2013)

Las cepas de E. coli uropatógena representan aproximadamente el 80% de las infecciones urinarias no complicadas, el 95% de las infecciones adquiridas en la comunidad y el 50% de las infecciones adquiridas en los hospitales; a pesar de esto sigue siendo el patógeno más frecuente en las infecciones urinarias complicadas; este microorganismo puede extenderse desde el tracto urinario al torrente sanguíneo para posteriormente causar bacteriemia. (Kot, 2019)

Las cepas de E. coli causantes de infecciones intestinales y síndromes diarreicos; poseen factores de virulencia similares entre sí y otros muy variados; EPEC para adherirse a las células de la mucosa del intestino; necesita fimbrias formadoras de pilis codificada por un plásmido, y el islote de patogenia del locus cromosómico de borramiento del enterocito que induce la adherencia estrecha; ETEC posee pilis conocidos como antígenos del factor de colonización que son específicos de seres humanos e inducen la adherencia células epiteliales del intestino, algunas de estas cepas producen una enterotoxina termolábil que está relacionada con la toxina del cólera y otras producen la enterotoxina termoestable STa que activa a la guanilil ciclasa en las células epiteliales entéricas y estimula la secreción de líquido; la STEC se denominan así por las toxinas citotóxicas que producen y hay por lo menos dos formas antigénicas de la toxina; toxina similar a Shiga 1 y toxina similar a Shiga 2; por último de los más de 150 serotipos de STEC, el O157:H7 es la más común y el que se identifica con mayor facilidad en las muestras de seres humanos. (Gomes et al., 2016; Yacarini-Martínez et al., 2019)

E. coli tiene un mecanismo de resistencia AmpC intrínseco no inducible que en ausencia del antimicrobiano la cantidad de enzima producida es baja, por lo que no confiere resistencia clínica a excepciones a algunas penicilinas, pero en presencia del fármaco se produce una inducción del gen blaAmpC y la cantidad aumenta considerablemente, también puede sobreexpresarse como consecuencia de mutaciones del promotor o del atenuador del gen confiriendo resistencia a amino, carboxi, y ureidopenicilinas, las asociaciones con inhibidores, cefalosporinas de primera generación, cefamicinas y en función del nivel de hiperproducción, también pueden afectar a cefalosporinas de tercera generacion y monobactámicos, mientras que las C4G y los carbapenémicos se mantienen activos; está también se vincula con la transmisión de resistencia a los antibióticos tanto en la comunidad como en los hospitales. (Jawetz, Melnick, 2013; Navarro et al., 2010)

En el caso de la resistencia debido a alteraciones de las porinas, las bombas de expulsión causan regularmente un bajo nivel de resistencia y pueden expresarse de forma intrínseca, y suelen asociarse a la expresión de otros mecanismos de resistencia contribuyendo a una resistencia clínicamente relevante; aquí toma importancia la bomba de expulsión de *E. coli* bomba (AcrB), la PFM (AcrA) y el canal de membrana (TolC) que también poseen otras enterobacterias. (Martínez-Martínez, 2016)

1.1.2. Género Shigella

Son bacilos gram negativos no móviles, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, las cuatro especies del género que provocan manifestaciones clínicas de shigelosis, como diarrea acuosa hasta diarrea exudativa fulminante, son *S. dysenteriae, S. flexneri, S. boydii* y *S. sonnei;* todas fermentan glucosa, con excepción de *S. sonnei*; y la imposibilidad para fermentar lactosa ayuda a distinguirlas en los medios diferenciales; además que forman ácido a partir de hidratos de carbono pero pocas veces producen gas. (Jawetz, Melnick, 2013; Prats & Mirelis, 2012)

Se divide en varias especies dentro de las cuales están S. dysenteriae perteneciente al serogrupo A, y que tiene 15 serotipos, S. flexneri del serogrupo B y formada por 19 serotipos, S. boydii del grupo C, con 20 serotipos y finalmente S. sonnei serogrupo D, con tan solo 1 serotipo; esta división en múltiples serotipos depende del antígeno O y las diferencias bioquímicas de cada una. (Mattock & Blocker, 2017)

La enfermedad más grave resulta de la infección causada por las especies *S. dysenteriae*; se considera a *S. flexneri* menos virulenta, mientras que *S. boydii* y *S sonnei*, generalmente originan episodios autolimitados de diarrea; la transmisión de estas bacterias se produce principalmente por ruta fecal-oral directa, o indirecta en lugares con una higiene deficiente y su aislamiento es predominante en los países en vías de desarrollo.(Villacrés et al., 2017)

Son muy sensibles a fluctuaciones de temperatura y a condiciones ambientales desfavorables; sin embargo, son tolerantes a pH bajos, por lo que pueden soportar la acidez del estómago y luego colonizar el tracto digestivo; esta propiedad, sumada a que son infectivas a bajas dosis, contribuye a su patogenicidad. (Niyogi, 2005)

La patogenicidad está asociada a su habilidad de invadir y colonizar el epitelio intestinal evadiendo las defensas del hospedador, mediante factores de virulencia IpaH (invasión plasmid antigen H), la inhibición de la coagulación inducida por trombina que provoca la eliminación de sangre en las heces, e IAL (invasión-associated locus) que promueve la internalización e invasión del tejido blanco gracias a la producción de adhesinas e invasinas y permite la diseminación intercelular de la bacteria y el traslado de diversos factores de virulencia; también forma poros a través de la membrana de las células del epitelio intestinal, permitiendo la penetración de la bacteria al citoplasma del enterocito. (Mattock & Blocker, 2017; Villacrés et al., 2017)

S. dysenteriae además produce la toxina Shiga que difunde extracelularmente hasta células blanco específicas; posee efectos citotóxicos, inhibiendo la síntesis proteica y llevando a la muerte

de células intestinales, células epiteliales del glomérulo y del túbulo renal y las células de la microcirculación del sistema nervioso central; causa de esta manera síndrome urémico hemolítico (SUH) y convulsiones.(Cristina Naranjo, 2018)

Shigella posee una betalactamasa cromosómica no inducible de clase C (AmpC) similar a la de *E. coli* que en su forma salvaje se expresa a niveles muy bajos, por lo que no confiere resistencia clínica, a excepción de cuando se halla hiperproducida que otorga resistencia a varias penicilinas (amino, carboxi, ureido), y varias cefalosporinas de acuerdo al grado de producción, manteniéndose activos algunas cefalosporinas de tercera generacion, todas las cefalosporinas de cuarta generacion y los carbapenémicos; al igual que *Salmonella* este microorganismo son clínicamente resistentes a cefalosporinas de primera y segunda generacion. (Navarro et al., 2010)

En Latinoamérica, *Shigella* es responsable del 8 al 12 % de los episodios de diarrea y del 50 % de los casos de diarrea disentérica que requiere hospitalización; convirtiéndose así es una patología endémica en esta zona y de la cual se han descrito varios brotes. (Cristina Naranjo, 2018)

1.1.3. Género Salmonella.

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y al igual que otros miembros son bacilos anaerobios facultativos, no formadores de esporas, son fermentadoras de glucosa, pero casi nunca fermentan lactosa ni sacarosa; forman ácido y a veces gas a partir de glucosa y manosa; reducen nitratos y no producen oxidasa; la mayor parte de las cepas de son móviles con flagelos peritricos; se multiplican fácilmente en medios simples, y algunas suelen producir H2S. (Delgado Fernández, 2015; Jawetz, Melnick, 2013)

Salmonella sobrevive al congelamiento en agua por periodos prolongados; además de ser resistente a varias sustancias químicas como: verde brillante, tetrationato de sodio, desoxicolato de sodio, etc.; que inhiben otras bacterias entéricas, y que son incluidos en medios que ayudan aislar e identificar este microrganismo. (Jawetz, Melnick, 2013)

Los miembros de este género en un principio se clasificaron con base en la epidemiología, los hospedadores, las reacciones bioquímicas y las estructuras de los antígenos O, H y Vi; y los nombres como *Salmonella typh*i, *Salmonella typhimurium* fueron escritos como si fuesen género y especie; y aunque esta nomenclatura esta generalizada se utiliza de forma incorrecta. (Jawetz, Melnick, 2013; Quirós Cárdenas, 2016)

Los estudios de hibridación de DNA-DNA han demostrado que hay siete grupos evolutivos; y hoy en la actualidad, el género se divide en dos especies, cada una de las cuales contiene múltiples subespecies y serotipos; los dos especies son *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica*, esta última que contiene las siguientes subespecies, *entérica* (subespecie I); *salamae* (subespecie II); *arizonae* (subespecie IIIa); *diarizonae* (subespecie IIIb); *houtenae* (subespecie IV) e *indica* (subespecie VI), siendo así casi todas las infecciones de seres humanos causadas por cepas de la subespecie I, que se designa como *Salmonella entérica* subespecie *entérica*, la cual contiene varios serotipos y es aquí donde se hace probable el uso de la nomenclatura ampliamente aceptada para la clasificación que sería: *S. entérica* subespecie entérica serotipo *typhimurium*, que puede abreviarse a *Salmonella typhimurium.* (Quirós Cárdenas, 2016)

Cuatro serotipos pueden identificarse en el laboratorio clínico mediante análisis bioquímicos y serológicos; estos serotipos son: *Salmonella Paratyphi A*, *Salmonella Paratyphi B*, *Salmonella Choleraesuis* y *Salmonella Typhi*. (Jawetz, Melnick, 2013)

Las *Salmonellas* son transmitidas de los animales y los productos animales hacia el ser humano, donde producen enteritis, infección sistémica y fiebre entérica, sin embargo, la mayor parte son especialmente patógenas en los animales que constituyen el reservorio para la infección humana: pollos, cerdos, roedores, ganado vacuno, mascotas, y muchos otros. (Besser, 2018)

Salmonella no es portadora de una betalactamasa cromosómica, como otras *Enterobacteriaceae* como *E. coli*, pero al igual que *Shigella* es clínicamente resistente a

cefalosporinas de primera y segunda generacion; por otro lado, las mutaciones en la ADN girasa, son muy comunes en muchas bacterias de esta familia, y es aquí cuando se aconseja reportar como resistencia a fluoroquinolonas en el caso de observarse que exista resistencia a ácido nalidíxico en *Salmonella.* (Navarro et al., 2010)

1.1.4. Género Enterobacter.

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae,* incluye bacilos gramnegativos anaerobios facultativos, móviles por medio de flagelos peritricos, fermentan lactosa, pueden contener cápsulas que producen colonias mucoides, están ampliamente distribuidos en la naturaleza, encontrándolos en el suelo, agua y como parte de la microbiota de animales, insectos y tracto gastrointestinal humano; incluye varias especies dentro de las cuales se define el complejo Enterobacter cloacae; la relación dentro de este complejo se establece a partir de la hibridación ADN-ADN de genomas completos, pruebas bioquímicas y por la secuenciación. (Davin-Regli et al., 2019; Jawetz, Melnick, 2013; Murray et al., 2017)

Estos microorganismos son causa de una amplia gama de infecciones hospitalarias como neumonía, infecciones urinarias, infecciones de heridas, de dispositivos, y septicemia siendo la segunda *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenémicos (CRE) más común en los Estados Unidos, contribuye cada vez más a la propagación de infecciones resistentes a carbapenémicos, en particular, el complejo *Enterobacter cloacae* los cuales son patógenos nosocomiales más comunes. (Davin-Regli et al., 2019)

Hasta la fecha, 22 especies se han encontrado en el género Enterobacter, entre estas siete se agrupan dentro del complejo **Enterobacter cloacae:** E. cloacae, E. asburiae, E. hormaechei, E. kobei, E. ludwigii, E. mori y E. nimipressuralis; el resto son E. amnigenus, E. arachidis, E. carcinogenus, E. cowanii, E. dissolvans, E. gergoviae, E. helveticus, E. oryzae, E. pulveris, E. pyrinus, E. radicincitans, E. soli, E. taylorae y E. turicensis; esta clasificación se basa en el

intercambio de características fenotípicas y fundamentalmente genotípicas, determinadas por hibridaciones de ADN-ADN de genoma completo, de hecho, E. cloacae comparte al menos un 60% de similitud en su genoma con los otros seis miembros de su grupo. (Davin-Regli et al., 2019)

El complejo *E. cloacae*, complejo *E. sakazakii*, y E. hormaechei representan las especies más comúnmente aisladas en infecciones clínicas, principalmente en pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados, debido a la adaptación a los antimicrobianos y su comportamiento como patógenos oportunistas; este género es miembro del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa y especies de Enterobacter*), que se describen como la principal causa de infecciones nosocomiales resistentes. (Davin-Regli et al., 2019)

La mayor parte de las cepas posee una β-lactamasa cromosómica denominada AmpC que las vuelve intrínsecamente resistentes a la ampicilina y a las cefalosporinas de primera y segunda generaciones; muchas mutantes suelen producir en exceso β-lactamasa que confiere resistencia a las cefalosporinas de tercera generación; esta no se inhibe por ácido clavulánico ni por otros inhibidores similares, es muy poco activa frente a cefalosporinas de cuarta generación (cefepima) y frente a carbapenémicos, pero cuando en el mismo microorganismo la presencia del enzima se acompaña de pérdida de porinas, también puede presentarse resistencia a estos compuestos; y al igual que *K. pneumoniae*, algunas cepas intrahospitalarias tienen plásmidos que las hacen resistentes a múltiples fármacos. (Davin-Regli et al., 2019; Navarro et al., 2010)

Esta resistencia puede ayudar a una identificación entre las bacterias ya que *Enterobacter* y *C. freundii* son resistentes a cefoxitina y presentan sensibilidad disminuida a cefuroxima, mientras que *M. morganii, Providencia* y *Serratia*, son resistentes a cefuroxima y moderadamente resistentes a cefoxitina. (Navarro et al., 2010)

1.1.5. Género Klebsiella.

Son bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, inmóviles y con capsula de polisacáridos, son catalasa positivos y oxidasa negativos, lisina descarboxilasa positiva, fermentadores de lactosa y fijadores de nitrógenos; en este género se han descrito 77 antígenos capsulares K, y 8 antígenos O distintos en las especies de *Klebsiella* y que son utilizados para la serotipificación más precisa de las especies del género. (Jawetz, Melnick, 2013)

La clasificación se basa en las características de patogenicidad, las reacciones de pruebas bioquímicas, la epidemiologia, serotipificación y pruebas de hibridación de ADN; con base a esto el género está formado por *K. pneumoniae* con tres subespecies *Kp. subsp. pneumoniae*, *Kp. subsp. ozaenae* y *Kp. subsp. rhinoscleromatis;* también por *K. oxytoca* la cual se divide en 7 filogrupos Ko1, Ko2, Ko3, Ko4, Ko6, Ko7, Ko8; *K. varicola* que consta de 2 subespecies, subsp. *varicola* y subsp. *tropicalensis*, además tenemos a *K. quasipneumoniae, K. granulomatis* y *K. michiganensis.* (March-Rosselló, 2017; Patricia et al., 2021)

K. aerogenes, que antes se encontraba clasificada taxonómicamente como *E. aerogenes* la misma que, si presenta diferencias fenotípicas con el género *Klebsiella* que son; la motilidad, la presencia de ornitina descarboxilasa y la falta de actividad ureasa en *E. aerogenes*; sin embargo, el análisis de la secuencia del genoma completo confirmó que la especie más cercana a *E. aerogenes* era *K. pneumoniae*, así tanto CLSI como EUCAST han incluido esta modificación en sus documentos, que ahora mencionan *E. aerogenes* como *K. aerogenes.* (Davin-Regli et al., 2019)

Todas las especies son capaces de causar algún tipo de infección en el ser humano; como neumonías bacterianas, infecciones urinarias y bacteriemia con lesiones focales en pacientes inmunocomprometidos u hospitalizados, también se han aislado en otros trastornos inflamatorios, encontrándose así entre las 10 bacterias más patógenas causantes de infecciones intrahospitalarias, sin embargo, las especies de mayor importancia clínica por el número de infecciones que causan

y su resistencia intrínseca a muchos antibióticos, son *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*, siendo esta segunda la que se encuentra incluida en el grupo ESKAPE. (Davin-Regli et al., 2019; Patricia et al., 2021)

K. pneumoniae es resistente a la ampicilina por medio de la presencia de la β lactamasa de clase A SHV-1 o relacionadas, codificadas en el cromosoma de la bacteria, que cuando se produce en grandes cantidades puede observarse una resistencia de bajo nivel a ceftazidima; y en *K. oxytoca* se trata de la K1 que si se hiperproduce se comporta como una betalactamasa de espectro extendido. (Navarro et al., 2010)

1.1.6. Género Serratia.

Son bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, móviles con flagelos peritricos; pueden ser aisladas de diversos nichos ambientales y son patógenos para un amplio rango de seres; existen 14 especies y 2 subespecies que pertenecen al género: *S. entomophila, S. ficaria, S. fonticola, S. glossinae, S. grimesii, S. liquefaciens, S. marcescens* subsp. *marcescens, S. marcescens* subsp. *sakuensis, S. nematodiphila, S. odorifera, S. plymuthica, S. proteamaculans, S. quinivorans, S. rubidaea* y *S. ureilytica*, siendo *S. marcescens* la especie mejor estudiada del género y que se aísla con mayor frecuencia. (Jawetz, Melnick, 2013; Martina Lazzaro Directora & Eleonora García Véscovi Rosario, 2019)

Este género tiene características que les permiten sobrevivir en condiciones extremas y colonizar una gran variedad zonas, ya que secretan exoproteínas, presentan resistencia a múltiples antibióticos, realizan motilidades tipo swimming, producen metabolitos como prodigiosina en cepas pigmentadas y presentan comportamientos comunitarios, por ejemplo quorum sensing y producción de biopelículas; además de poseer factores de virulencia como hemolisina, fimbrias, proteasas, lipasas, nucleasas, antígenos de pared celular, entre otros. (Martina Lazzaro Directora & Eleonora García Véscovi Rosario, 2019)

Serratia es considerado como un patógeno oportunista, y causante de infecciones nosocomiales, principalmente en área de hospitalización y cuidados intensivos; ocasionando elevadas tasas de mortalidad, y cuyos aislamientos en mayor parte son de *S. marcescens*, siendo escasos los reportes de otras especies. (Mahlen, 2011)

S. marcescens da lugar a una amplia gama de manifestaciones clínicas: desde colonización asintomática hasta queratitis, conjuntivitis, infecciones del tracto urinario, neumonía, infecciones de heridas quirúrgicas, sepsis, infección del torrente sanguíneo y meningitis; todo esto gracias a sus factores de virulencia y su gran capacidad de adherencia y elevada resistencia a protocolos de esterilización y desinfección, persistiendo en material hospitalario, catéteres, agujas, tubos intravenosos y endoscopios. (Cristina et al., 2019)

Las infecciones causadas suelen ser difíciles de tratar debido a la resistencia a múltiples antibióticos; teniendo resistencia intrínseca a varios antibióticos β-lactámicos como la penicilina G, ampicilina, amoxicilina y cefalosporinas de primera generacion, aunque pueden existir mutantes que incluso presentan resistencia a cefalosporinas de tercera generacion; dicha resistencia a β-lactámicos viene dada por dos mecanismos: la expresión de β-lactamasas capaces de degradar antibióticos y, por otro lado, una menor permeabilidad de la membrana debido a modificaciones en el antígeno O del LPS. (Cristina et al., 2019; Navarro et al., 2010)

1.1.7. Género Citrobacter.

Es un grupo de bacilos gram negativos aerobios encontrados con mucha frecuencia en muchos nichos ecológicos y como flora saprófita intestinal de animales y humanos; con una capacidad variable de fermentar lactosa; algunos utilizan citrato y otros no, muchas tienen antígenos somáticos O, flagelar H y de superficie K, lo que provoca reacciones cruzadas con otras *Enterobacteriaceae*, este género frecuentemente causa infecciones importantes, especialmente en inmunodeprimidos. (Jawetz, Melnick, 2013; L. H. Liu et al., 2018)

El género está compuesto por las siguientes genomoespecies: complejo *C. freundii* (*C. freundii, C. braakii, C. sedlakii, C. werkmanii, C. youngae, C. gillenii, C. murliniae* y *C. rodentium*), *C. koseri, C. amalonaticus* y *C. farmer*. (Manganello et al., 2001)

Por tratarse de un patógeno oportunista es uno de los más importantes causantes de infecciones nosocomiales en unidades de cuidados neonatales, hospitalización y cuidados intensivos; pudiendo provocar, infecciones urinarias, meningitis neonatal y abscesos cerebrales. (L. H. Liu et al., 2018)

C. koseri y *C. amalonaticus*, presenta resistencia de bajo nivel a aminopenicilinas y carboxipenicilinas, sensibilidad disminuida a ureidopenicilinas, manteniéndose sensibles a cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos y a las asociaciones con inhibidores de betalactamasas; por otra parte *C. freundii* presenta una betalactamasa cromosómica inducible con actividad cefalosporinasa que le confiere resistencia a aminopenicilinas y cefalosporinas de primera generacion, manteniendo la sensibilidad a carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas de tercera y cuarta generacion, así como monobactámicos y carbapenémicos. (Navarro et al., 2010)

1.1.8. Género Proteus.

Son bacilos gram negativos miembros de la familia de bacterias *Enterobacteriaceae*, normalmente no fermentan lactosa por razón de no tener una β galactosidasa, con algunas excepciones, son oxidasa negativos y ureasa positivos; algunos son motiles, no esporulados ni capsulados y son productoras de fenilalanina desaminas; cuyo género está compuesto por *P. mirabilis, P. vulgaris, P. penneri, P. hauseri, P. terrae* y *P. cibarius*, junto con otras genomoespecies sin nombre. (Jawetz, Melnick, 2013; Murray et al., 2017)

Muestran dimorfismo en formas de natación y enjambre; las células nadadoras predominan en ambientes líquidos, como células individuales con flagelos peritricos; mientras que el

comportamiento de enjambre resultada como un patrón de ojo de buey, como resultado de un proceso cíclico, este fenotipo puede ocurrir tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, también un pH ácido aumenta drásticamente este comportamiento, siendo así un factor importante en la invasión y persistencia intracelular, con 15 a 20 veces más que las células nadadoras. (Pathogens et al., 2018)

Son comensales comunes de la microbiota gastrointestinal, normalmente el humano está colonizado por varias combinaciones de *P. vulgaris, P. mirabilis* y *P. penneri*, pero comprenden menos del 0,05% de la microbiota intestinal de sujetos sanos; la mayoría de miembros del género, excepto *P. cibarius* y *P. terrae,* se han aislado de muestras clínicas de humanos; se reconocen clínicamente más por ser una causa de infecciones del tracto urinario. (Pathogens et al., 2018)

Este género posee resistencia a las polimixinas mediada por modificaciones covalentes del lípido A; también poseen resistencia intrínseca a la nitrofurantoina, colistina, tigeciclina y tetraciclina; por otro lado, *P. vulgaris*, y *P. penneri*. presentan una betalactamasa cromosómica inducible con actividad cefalosporinasa que al igual que *Citrobacter* les confiere resistencia a aminopenicilinas y cefalosporinas de primera generacion, pero no a carboxipenicilinas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, monobactámicos y carbapenémicos; si bien estos patrones de resistencia están mediados por diferentes betalactamasas, la disminución de la permeabilidad, ayuda a tener una menor sensibilidad a los carbapenémicos. (Girlich et al., 2020; Navarro et al., 2010)

1.1.9. Género Yersinia.

Son bacilos gram negativos aerobios y anaerobios facultativos, mótiles a 22°C, pero no a 37°C por sus flagelos anfitricos o peritricos, forman pilis y fimbrias, pero no cápsulas de gran espesor ni esporas; además todas las especies del género poseen lipopolisacáridos con actividad endotóxica y antígenos de envoltura celular bacteriana llamada fracción I, una proteína que se

produce a 37ºC la cual tiene propiedades antifagocitarias y activa el complemento; por otro lado el antígeno V-W es producido por las cepas virulentas de *Y. pestis*, la cual también produce catalasa a una tempera de entre 28 a 35 °C. (Bintsis, 2017; Jawetz, Melnick, 2013)

El género incluye 10 especies, aunque solo 3 se consideran patógenas para humanos o animales; primeramente *Y. pestis* como agente causal de la peste, *Y. pseudotuberculosis* es principalmente un patógeno animal, pero puede infectar a los humanos después de la ingestión de alimentos o agua contaminados, y *Y. enterocolitica* ha surgido como una causa de gastroenteritis transmitida por alimentos en humanos. (Bintsis, 2017)

Y. enterocolitica en la mayoría de las cepas, posee un fenotipo de cefalosporinasa y penicilinasa, siendo resistente a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, amoxicilina ac. clavulánico y cefalosporinas de primera y segunda generacion; este fenotipo es producto de la síntesis de 2 enzimas, una de clase A y otra de clase C. (Navarro et al., 2010)

1.1.10. Género Providencia.

Es un bacilo gramnegativo productor de ureasa de la familia *Enterobacteriaceae* que incluye a *Providencia stuartii, P. rettgeri, P. alcalifaciens, P. rustigianii* y *P. heimbachae*; siendo las dos primeras consideradas las de mayor importancia y patógenos oportunistas en pacientes hospitalizados y residentes de edad avanzada en enfermería, la mayoría de las infecciones se asocian al uso prolongado de catéteres urinarios, aumentando la probabilidad de tener infecciones polimicrobianas. (Murray et al., 2017; Wie, 2015)

Si bien estas especies no son causa habitual de infecciones del tracto urinario o bacteriemia, cuando están implicadas en las mismas, su tasa de mortalidad general llega a ser alta, especialmente en los ancianos con afecciones subyacentes. (Wie, 2015)

P. stuartii es ureasa positiva y cuya actividad es uno de los factores que contribuyen al desarrollo de infección, sumando que posee fimbrias de tipo 3 que le permiten adherirse a las

superficies; por otro lado, la coinfección con Proteus mirabilis contribuye al aumento de la incidencia de urolitiasis y bacteriemia, además de estar asociada con la formación de cálculos en el tracto urinario, la obstrucción de catéteres urinarios a largo plazo o el desarrollo de pielonefritis aguda. (Wie, 2015)

Providencia, al igual que *C. freundii* presenta una betalactamasa de clase C que les confiere resistencia a las asociaciones de inhibidores y una sensibilidad variable a cefoxitina; en el caso de *Providencia* siendo resistentes a cefuroxima y moderadamente resistentes a cefoxitina; todo esto puede varias por alteraciones en los genes lo que da lugar a una hiper producción de la misma y por lo tanto pueden pasar a ser resistentes a carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, las cefalosporinas, manteniendo cierta actividad las de cuarta generacion y monobactámicos. (Navarro et al., 2010)

1.1.11. Género Morganella.

El género actualmente consta de una sola especie *M. morganii* con dos subespecies, a saber, *morganii y sibonii*; es una bacteria gramnegativa anaerobia facultativa, móvil, no fermentadora de lactosa, que tiene la capacidad de producción de ureasa y la presencia de fenilalanina desaminasa; este microorganismo se encuentra en el medio ambiente y el tracto intestinal de humanos como la mayoría de enterobacterias, siendo parte de la flora normal. (Jawetz, Melnick, 2013; H. Liu et al., 2016)

Además, puede producir otros factores de virulencia, como hemolisinas y lipopolisacáridos; estos factores le ayudan en su papel de patógeno oportunista que principalmente causa infecciones de heridas y del tracto urinario. (H. Liu et al., 2016)

Las infecciones causadas por *M. morganii* son amplias, incluyendo principalmente sepsis, abscesos, infección del tracto urinario y bacteriemia; además que este microorganismo puede

albergar BLEE y carbapenemasa, lo que da resistencia a múltiples antibióticos y da como resultado una alta tasa de mortalidad. (H. Liu et al., 2016)

Además, puede producir otros factores de virulencia, como hemolisinas y lipopolisacáridos; estos factores le ayudan en su papel de patógeno oportunista que principalmente causa infecciones de heridas y del tracto urinario. (H. Liu et al., 2016)

M. morganii posee resistencia intrínseca a oxacilina, ampicilina, amoxicilina, a la mayoría de las cefalosporinas de primera y segunda generación, macrólidos, lincosamidas, glucopéptidos, fosfomicina, y colistina; siendo sensible a aztreonam, aminoglucósidos, penicilinas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, carbapenémicos, quinolonas, trimetoprim/sulfametoxazol y cloranfenicol. (H. Liu et al., 2016; Navarro et al., 2010)

2. Mecanismos de patogenicidad de las *Enterobacteriaceae*

La invasión del microorganismo al hospedador da comienzo a la interacción entre este y la bacteria, lo que posteriormente produce una serie de procesos fisiopatológicos que dependen de la patogenicidad y de la reacción desencadenada por el sistema inmune para producir una enfermedad infecciosa; se define como patogenicidad a la capacidad intrínseca de determinado microorganismo para desarrollar una enfermedad infecciosa y la virulencia se refiere al grado de patogenicidad dentro de un grupo o especie de microorganismos. (Murray et al., 2017)

Las enterobacterias poseen una estructura antigénica compleja con más de 150 diferentes antígenos somáticos termoestables O (lipopolisacáridos), más de 100 antígenos K (capsulares) termolábiles y más de 50 antígenos H (flagelares); también producen diversas toxinas ya sean endotoxinas o exotoxinas de importancia clínica, así como otros factores de virulencia como fimbrias y producción de enzimas; muchos de estos mecanismos son similares y compartidos en las diferentes especies de la familia. (Jawetz, Melnick, 2013)

Los antígenos O son resistentes al calor y al alcohol; suelen ser específicos para cada género sin embargo un solo microorganismo puede portar varios antígenos O; por otro lado los antígenos K son externos a los antígenos O en algunas bacterias pero no en todas; y unos se expresan como son polisacáridos, y otros como proteínas; finalmente los antígenos H están situados en los flagelos, y son desnaturalizado fácilmente por calor o alcohol y su patogenicidad va a depender de la secuencia de aminoácido en la proteína flagelar; si bien estos pueden ser diferentes en cada especie también pueden ser similares en muchas, como por ejemplo muchas *Shigella* comparten uno o más antígenos O con *E. coli*; y *Klebsiella* comparte algunos antígenos K con esta. (Cárdenas et al., 2014; Jawetz, Melnick, 2013)

La patogenicidad es función de algunos antígenos superficiales y de las toxinas que generan; así como, las fimbrias actúan aportando su capacidad de adherencia, los antígenos O y K presentan propiedades antifagocitarias e inhibidoras de las sustancias bactericidas del suero, y son responsables de la virulencia de las cepas invasivas; muchas también expresan una endotoxina ligada al lipopolisacarido, en especial al lípido A, responsable de la acción pirógena y probablemente de las alteraciones vasculares que se producen en las infecciones generalizadas. (Jawetz, Melnick, 2013; Murray et al., 2017)

La presencia de fimbrias facilita la adherencia a tejidos, los flagelos ayudan en la movilidad haciendo que se extienda la infección, las proteínas específicas de membrana externa enzimas proteolíticas como las proteasas ayudan para la inactivación de IgA; las hemolisinas permiten la adherencia e invasión celular; los polisacáridos capsulares ayudan a la formación de biofilms; los lipopolisacáridos provocan endotoxicidad y dan cierta resistencia al suero; y en el caso de géneros que causen infecciones urinarias muchos producen ureasa para alcalinizar el pH y poder sobrevivir mejor, lo que a su vez también produce citotoxicidad. (Cárdenas et al., 2014; Murray et al., 2017)

Las *Klebsiellas* forman grandes cápsulas que constan de antígenos K las que recubren los antígenos somáticos; la formación de están grandes capsulas le da cierta ventaja a este género para producir infecciones; ya que le protege contra la actividad bactericida del suero, los péptidos antimicrobianos y la fagocitosis; muchas cepas de *E. coli* también producen antígenos K, lo que le permite tener una mayor adherencia a las células epiteliales. (Jawetz, Melnick, 2013; Murray et al., 2017)

En el caso de *E. coli* uno de los factores de virulencia que son importantes para el contacto patógeno-hospedador son las OMPs las cuales son proteínas de membrana; OmpA principalmente y su sobreexpresión es un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones; por otro lado, muchas cepas de *E. coli* causan graves cuadros de diarrea y son las que producen toxina Vero o toxina semejante a Shiga. (Jawetz, Melnick, 2013)

3. Antibióticos activos frente a Bacilos Gram negativos.

3.1. Destructores de la pared celular.

3.1.1. Betalactámicos: es una familia de antibióticos de uso extendido a nivel universal dado su amplio espectro, su mecanismo de acción se basa en la destrucción de la pared celular mediante el bloqueo de las proteínas ligadoras de penicilina (PBP). (Kapoor et al., 2017)

Según Suárez & Gudiol (2009), a este grupo pertenecen:

Penicilinas: este grupo de fármacos es constituidos por 3 partes: un anillo betalactámico, un anillo tiazolidínico y una cadena lateral unida en posición 6; constituyen el grupo de antibióticos más usados y mejor tolerados; por tener una buena distribución en el organismo, baja toxicidad y buena actividad bactericida; aquí tenemos aquí tenemos a la penicilina, amoxicilina, ticarcilina y piperacilina.

Cefalosporinas: son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, constituidos por un núcleo central y la fusión de dos anillos: un anillo betalactámico y un anillo dihidrotiazínico; son antibióticos de amplio espectro, muy eficaces y poco tóxicos, pero que deben ser cuidadosamente administrados para prevenir el desarrollo de resistencia; este grupo se divide por generaciones donde tenemos: la 1ra generación: cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefradina; la 2da generación: cefaclor, cefuroxima, la 3ra generación: cefpodoxima, cefoperazona, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, la 4ta generación: cefepime y por último la 5ta generación: ceftobiprol, ceftarolina.

Monobactámicos: estos compuestos tienen una débil actividad antibacteriana, y la simplicidad de su estructura permitió sintetizar otros a partir de su núcleo adicionándole diversos radicales, teniendo así varios derivados semisintéticos y sintéticos con disímiles propiedades farmacológicas; como principal tenemos al aztreonam.

Carbapenémicos: son los de mayor relevancia clínica; difieren de las penicilinas por cambiar un átomo de carbono por uno azufre, además del doble enlace entre los átomos 2 y 3 del anillo pentagonal de la penicilina; estas modificaciones les confiere mayor afinidad por las PBP, mayor potencia y un espectro antibacteriano más amplio; constando dentro del grupo el ertapenem, doripenem, imipenem y meropenem.

Inhibidores de las B-lactamasas (IBL): su mecanismo de acción se divide en dos: los inhibidores reversibles, que se unen a las B-lactamasas, pero no la destruyen y pueden disociarse de ella, perdiendo eficacia a medida que su concentración disminuye; por otro lado están los ihibidores irreversibles, los que se unen a la B-lactamasa, alterándola y destruyendo su actividad en forma permanente, la enzima queda modificada químicamente de forma definitiva, mientras que el IBL sufre un proceso de autodegradación.

El IBL tiene la función de unirse a la B-lactamasa impidiendo que el B-lactámico sea destruido, dejando al antibiótico activo y libre para que ejerza su efecto; los IBL disponibles son ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

3.1.2. Polimixinas: se descubrieron en 1940, donde se obtuvieron 5 compuestos a, b, c, d y e, de los cuáles solo b y e se definieron de uso terapéutico, los mismos que cayeron en pronto desuso por su alto potencial nefrotóxico y neurotóxico; su estructura está formada por un decapéptido catiónico unido a una cadena de ácidos grasos, lo que da una carga positiva a la molécula y le permite interactuar eléctricamente con la membrana externa de las bacterias gram negativas. (Medina et al., 2019)

3.2. Inhibidores de la biosíntesis de proteínas

3.2.1. Aminoglucósidos: son moléculas con carga positiva lo que les permite unirse con mayor facilidad a la membrana externa de las bacterias, para luego formar poros los que permitan su ingreso con la finalidad de alcanzar su sitio de acción que es el ribosoma; requieren condiciones aeróbicas para cumplir su función ya que necesitan oxígeno y transporte activo a través de membranas; finalmente actúan con el ARN de la subunidad 30s ribosomal causando errores de lectura y terminación temprana de la traducción del ARN mensajero bacteriano. (Kapoor et al., 2017)

3.2.2. Tetraciclinas: actúan sobre el mismo sitio impidiendo la unión de ARN de transferencia con el sitio ribosomal, y así el inicio de la traducción; esta familia está formada por tres grupos:

Grupo I o primera generación, con mala absorción y poco lipofílicos, a la cual pertenecen la tetraciclina, oxitetraciclina, y metaciclina. (Kapoor et al., 2017)

Grupo II, estos son mejor tolerados con una mejor absorción y son entre tres y cinco veces más lipofílicos, la minociclina y doxiciclina son los antibióticos de este grupo.

Grupo III, última generación, aquí tenemos a la tigeciclina y las aminometilciclinas, que son fármacos de mayor espectro y con más resistencia que las anteriores. (Kapoor et al., 2017)

3.2.3. Macrólidos: este tipo de antibióticos inhiben de manera temprana la translocación proteica al modificar las secuencias ribosómicas de la subunidad 50s, lo que termina de forma temprana e incompleta con las cadenas de péptidos. (Kapoor et al., 2017)

3.3. Inhibidores de la replicación del ADN

3.3.1. Quinolonas: se encargan de inhibir la girada del ADN bacteriano que es necesaria para el corte de la doble cadena del mismo, y para su posterior reparación durante la replicación y transcripción; adicional a esto inhiben la topoisomerasa IV que es utilizada para desenrollar el ADN durante la replicación. Dentro de este grupo tenemos los siguientes: ácido nalidíxico, norfloxacina, ciprofloxacina y levofloxacina. (Kapoor et al., 2017)

4. Métodos de determinación de susceptibilidad antimicrobiana.

4.1. Métodos de difusión

Método de Difusión por discos: Este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Partiendo de una muestra clínica siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica. Para esto se utiliza la técnica de aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa en estudio (al cual además se le deben otorgar las condiciones atmosféricas específicas de esa cepa). El antibiograma por difusión de disco basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el NCCLS recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos. (Palacios et al., 2015)

Sinergia de discos: este consiste en la visualización de una ampliación del halo de inhibición en forma de cerradura debido al crecimiento de cepas productoras de 30 carbapenemasas en agar con discos de carbapenémicos imipenem, meropenem, ertapenem y sus inhibidores, EDTA o ácido dipicolínico, para carbapenemasas de clase B y ácido borónico, para carbapenemasas de clase A; dichos discos deben ser colocados a una distancia correcta. (Navarro et al., 2011)

Discos combinados: este método similar al anterior, con la diferencia que el inhibidor está en el mismo disco que el carbapenémico y, para su valoración, únicamente se visualiza el halo de inhibición que produce, tanto el disco de carbapenémico, como el de carbapenémico + su inhibidor. (Navarro et al., 2011)

4.2. Métodos de dilución

Macrodilución en caldo.

Se trata de uno de los métodos más antiguos donde se emplea una cantidad considerable de tubos de ensayo con un volumen mínimo de 1mL del medio de crecimiento líquido, en los cuales se coloca diluciones seriadas del antimicrobiano y se adiciona a cada solución una cantidad de bacterias suspendidas; para luego de 20-24 horas de incubación se determina el valor de la CMI, cuantitativamente mediante la turbidez dentro de los tubos. (Schumacher et al., 2018)

La ventaja en este método es el inóculo, ya que se puede multiplicar para analizar la tasa de muerte bacteriana para diferentes concentraciones, mientras que la desventaja es la preparación manual de cada solución antibiótica y la cantidad considerable de reactivos que se necesita para cada una de las diluciones. (Schumacher et al., 2018)

Microdilución en caldo.

La microdilución en caldo es uno de los métodos más utilizados en el laboratorio de microbiología para determinar las CMI cuantitativamente; este método se basa en utilizar bandejas

que contienen 96 pocillos con fondo en “U”, cada uno con un volumen mínimo de 0,1 mL y concentraciones preestablecidas de antimicrobianos que, en cada uno de los pocillos, lo que permite experimentar hasta 12 antibióticos en un rango de 8 diluciones dobles en una sola microplaca. (Sandle, 2016).

El medio recomendado en estas pruebas de susceptibilidad antimicrobiana es el caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes (CAMHB), o el caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes con 2-5 % de sangre lisada de caballo para microorganismos exigentes que requieren condiciones ajustadas y medios ricos en nutrientes; posterior a la incubación por 24 horas, se produce un cambio de turbidez y color por el crecimiento bacteriano por lo que se utiliza un dispositivo de visualización manual o automático que permiten la inspección de cada uno de los pocillos del panel para determinar la CMI. (Schumacher et al., 2018)

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

5. Resistencia bacteriana.

Muchas bacterias poseen resistencia natural a algunos antibióticos y otras la van adquiriendo; el primer caso tiende a ser un mecanismo permanente, determinado por genes que no han sido modificados por la interacción con los antibióticos, como ejemplo tenemos a *K. pneumoniae* que debido a la producción de β- lactamasas es resistente a las penicilinas; en el segundo caso la resistencia adquirida se da cuando la bacteria inicialmente es sensible a cierto tipo de antibiótico pero genéticamente se producen modificaciones ya sea por mutaciones, por adquirir genes de

resistencia a través de plásmidos compartidos de otra bacteria o principalmente por la forma de utilizar los antibióticos. (Garza-Ramos et al., 2009; López Velandia et al., 2016)

El uso inadecuado de antibióticos ha generado que la resistencia adquirida aumente incontrolablemente, ya que erradica a poblaciones bacterianas sensibles incluso las que forman parte benéfica de nuestro organismo; por lo cual se van originando cepas resistentes las cuales se reproducen a gran escala.

Las bacterias son tan perfectas que se adaptan al medio, a sus condiciones, toman información del mismo y desarrollan mecanismos importantes para inhibir la acción de los antibióticos tales como:

- Producción de enzimas inactivadoras: un claro ejemplo es la producción de β- lactamasas que permite a la bacteria hidrolizar el anillo β-lactámico del antibiótico. (Martínez-Martínez, 2016)
- Alteración de la barrera de permeabilidad: cambia la estructura externa bacteriana frente a receptores específicos de los fármacos debido a la falta de permeabilidad por una mutación de la membrana que daña el transporte. (Troncoso et al., 2017)
- Alteración del sitio blanco del antibiótico: se refiere a la modificación específica de algún sitio de la célula bacteriana como; la membrana celular o modificaciones a nivel ribosomal. (Martínez-Martínez, 2016)
- Bombas de salida: expulsan al antibiótico desde el espacio periplásmico evitando que se transporte al sitio de acción. (Martínez-Martínez, 2016)

6. Mecanismos de resistencia en *Enterobacteriaceae.*

Las bacterias, por su tremenda capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a diversos agentes antimicrobianos, además de que han evolucionado hasta el punto de llegar a compartir información genética entre ellas, crear interacciones reciprocas entre

ellas y también con el huésped, generando así una supervivencia mucho mayor. (López Velandia et al., 2016)

Si bien muchas bacterias poseen una resistencia natural o intrínseca que les confiere cierta resistencia a uno o varios antibióticos, de acuerdo al estímulo de producción de la misma esta no suele ser de mucho interés clínico; como lo es la resistencia adquirida, que es realmente importante, ya que aumenta los índices de resistencia, que es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética; además de que en una misma bacteria pueden haber diversos mecanismos de resistencia lo que complica el trabajo de los antibióticos. (Troncoso et al., 2017)

6.1. Mecanismos contra Betalactámicos.

La resistencia a beta-lactámicos está mediada por varios mecanismos; modificación de las proteínas PBP que impiden la unión del antibiótico a su lugar de acción; impermeabilidad de la pared por cambios en las porinas que disminuyen la permeabilidad del fármaco hacia el interior de la pared bacteriana; extracción activa o bomba de flujo que reduce las concentraciones de antibiótico disponible y producción de enzimas (beta-lactamasas) que inactivan al antimicrobiano. (D. Q. Pérez, 2017)

Modificación de las proteínas PBP: este puede ocurrir por mutación de los genes que codifican para estos péptidos o por la adquisición de genes extraños que producen nuevas proteínas PBP con menor afinidad por antibióticos beta-lactámicos; este mecanismo de resistencia es importante tanto en cocos Gram positivos como en bacterias Gram negativas, y su presencia conjunta con otros mecanismos aumenta la resistencia a un mayor número de antibióticos; al día de hoy se han encontrado varias cepas de *Proteus spp* resistentes a imipenem como resultado de la modificación estructural de las PBP. (Gastelo Acosta & Maguiña Vargas, 2018)

Impermeabilidad de la pared por cambios en las porinas; es un mecanismo presente en un sin número de bacterias Gram negativas tanto de la familia *Enterobacteriaceae* como otros bacilos; y consiste en la modificación de las porinas de la membrana externa como resultado de mutaciones cromosómicas, de manera que la penetración del antibiótico es más difícil y se reduce en gran medida la cantidad que puede interactuar con las proteínas de membrana; además de dar resistencia a betalactámicos, también puede impedir el ingreso de otro grupo de antibióticos como las quinolonas. (Gastelo Acosta & Maguiña Vargas, 2018).

Mecanismo de extracción activa del antibiótico: este mecanismo de extracción activa o más conocido como bomba de flujo evita la acción de antibióticos, y está codificado por plásmidos R que poseen fragmentos genéticos móviles los cuales crean un sistema de bombeo de antibiótico desde el interior hacia el exterior de la bacteria, en contra de un gradiente de concentración. (D. Q. Pérez, 2017)

Producción de enzimas "betalactamasas": son enzimas que hidrolizan la unión peptídica endocíclica del anillo beta-lactámico, y su producción es el mecanismo más frecuente de resistencia antibiótica; pueden ser de carácter intrínseco y conferir baja resistencia así como tener continuas mutaciones que producen expresión de betalactamasas de espectro extendido, siendo clínicamente resistente a las penicilinas, a todas las cefalosporinas y al aztreonam, pero no a los carbapenémicos ni a las cefamicinas y muchas son inhibidas por el ácido clavulánico y sulbactam los que tienen mayor afinidad por la enzima e impiden la destrucción del antibiótico, de esta manera permiten su acción. (Mina-ortiz et al., 2021)

Las BLEE se asocian a co-resistencia con aminoglucósidos y cotrimoxazol, dado que se pueden transferir en el mismo plásmido con mucha frecuencia.

Según Chiriboga & Araujo (2012), hay varios tipos de Beta-lactamasas:

Beta-lactamasas inducibles: su producción se inicia cuando las bacterias que poseen un gen de beta-lactamasa, se exponen a un beta-lactámico; la acción de este en la pared celular activa un mecanismo genético que inicia la producción de la enzima; la misma que cesa ante la ausencia del antibiótico en la pared o alrededor de ella.

Beta-lactamasas constitutivas: estas son aquellas que la bacteria posee de forma intrínseca o natural y que produce de forma continua; como ejemplo tenemos la enzima cromosómica BLEA, SHV-1 de *Klebsiella pneumoniae* que interviene en la resistencia contra ampicilina.

Beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE): se dan por mutaciones puntuales que resultan en cambios de 1 a 4 aminoácidos, las cuales van a codificar estas enzimas; las bacterias que las producen van a presentar resistencia también a los aminoglucósidos, lo que produce una limitación mayor en la eficacia de los beta-lactámicos.

Beta-lactamasas resistentes a los inhibidores: los inhibidores tazobactam, ácido clavulánico y sulbactam, como su nombre lo dice inhiben la enzima y permiten que el antibiótico actúe; pero también existen betalactamasas en las que estos no tienen ningún efecto, y por ende estas confieren resistencia a amino, ureido y carboxipenicilinas, además de muchas cefalosporinas, siendo sensibles a las cefalosporinas de cuarta generación, carbapenémicos y monobactámicos.

AmpC: son serin-betalactamasas, presentes de forma natural en diversas enterobacterias y otros bacilos Gram negativos como *Pseudomonas aeruginosa;* estas enzimas son capaces de resistir la inhibición por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam; clínicamente presentan resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, y con una falla terapéutica de muchas de las cefalosporinas de tercera generación. (Mina-ortiz et al., 2021)

6.2. Mecanismos contra Aminoglucósidos.

El mecanismo de resistencia más importante contra este grupo de antibióticos es la inactivación enzimática, luego está la alteración de la permeabilidad y por último están las mutaciones

puntuales en los sitios de acción, el mismo que es limitado solo para estreptomicina y espectinomicina ya que altera la proteína de la subunidad 30s denominada proteína S12, que es donde actúan estos dos. (Gastelo Acosta & Maguiña Vargas, 2018; D. Q. Pérez, 2017)

La inactivación enzimática, viene dada por diversas enzimas que pueden inactivar estos antibióticos a distintos niveles; así es que pueden acetilar a través de acetiltransferasas, adenilar por adeniltransferasas o fosforilar por fosfotransferasas, teniendo un perfil de acción diferente de acuerdo al aminoglucósido sobre el que actúan, pero la presencia de más de una enzima dificulta el tratamiento; dichas enzimas pueden ser cromosómicas o plasmídicas y se expresan constitutivamente, e independientemente de la presencia de antibiótico. (Gastelo Acosta & Maguiña Vargas, 2018; D. Q. Pérez, 2017)

La inactivación enzimática se produce en el proceso de transporte del antibiótico hacia el interior de la célula para alcanzar el ribosoma; y la resistencia a los diferentes aminoglucósidos se da por el balance entre la captación intracelular y la inactivación enzimática, por ende, la velocidad de inactivación dependerá de la afinidad de la enzima presente con el antibiótico que este siendo suministrado. (Gastelo Acosta & Maguiña Vargas, 2018; D. Q. Pérez, 2017)

La resistencia a este tipo de antibiótico tiene una incidencia muy variable a nivel mundial, como consecuencia del uso de determinados aminoglucósidos en los diferentes países; existe un predominio de enzimas que inactivan la estreptomicina y kanamicina lo ha llevado a desplazar el uso de estos fármacos. (Gastelo Acosta & Maguiña Vargas, 2018; D. Q. Pérez, 2017)

La resistencia a aminoglucósidos por alteraciones en la membrana se basa en que estos entran a la célula bacteriana por un mecanismo complejo que implica la adherencia a moléculas de carga negativa, como residuos del LPS, cabezas polares de fosfolípidos y proteínas aniónicas de membrana externa; posterior a esta adherencia por rearreglo del LPS se produce la entrada al espacio periplásmico del agente, y su ingreso al citoplasma, se da por un sistema de trasporte

ajustado al gradiente protónico, el mismo que depende de la actividad de las cadenas respiratorias aerobias, lo cual explica la inactividad de estos agentes frente a anaerobios; entonces las modificaciones de este gradiente electroquímico, dificultan la entrada del agente a la célula, lo cual esta codificado por mutaciones cromosómicas espontáneas, generando alteraciones de este potencial o de la cadena de electrones. (D. Q. Pérez, 2017)

6.3. Mecanismos contra Carbapenémicos.

Producción de Carbapenemasas: las carbapenemasas representan la familia más versátil de las β-lactamasas, ya que tienen la capacidad de hidrolizar los carbapenémicos y también otros β-lactámicos; además de ser resistentes contra la acción de los inhibidores de β-lactamasas disponibles; estas enzimas pueden ser codificadas en el cromosoma bacteriano o estar presentes en elementos genéticos móviles mayormente en plásmidos. (Moreno-Monge, 2013)

Existe más de un grupo de carbapenemasas que dependen de metales como el zinc para su funcionamiento, lo que a su vez les divide en grupos; los mismos que difieren en su mecanismo de hidrólisis, el modo de transferencia y la acción de los inhibidores. (Moreno-Monge, 2013)

Estas enzimas, sumadas a otras modificaciones de la bacteria similares a las que acompañan a las BLEE, como son las bombas de explosión, la alteración del PBP o alteración del sitio de acción, aumentan drásticamente la resistencia bacteriana.

7. Clasificación Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) y Carbapenemasas.

7.1. BLEE.

Las betalactamasas son enzimas bacterianas capaces de hidrolizar los antimicrobianos betalactámicos, inactivándolos y haciéndolos inefectivos. Las BLEE están entre las de mayor relevancia clínica e incluyen tres tipos principales, TEM, SHV y CTX-M.

Las TEM provienen de las clásicas TEM-1 y TEM-2 contenidas en plásmidos, por otro lado, la SHV tienen origen cromosómico y finalmente las CTX-M, que tienen una historia evolutiva distinta, tienen actividad BLEE intrínseca movilizada desde su predecesora cromosómica y son las BLEE de mayor reporte mundial, predominando en agentes de infecciones nosocomiales como *Escherichia coli y Klebsiella spp*. (Rivera-Jacinto et al., 2015)

Enzimas TEM y SHV.

Las betalactamasas de espectro extendido de tipo temoniera (TEM) y la variable de sulfhidrilo (SHV), se derivaron de la sustitución de aminoácidos del grupo de penicilinasas. (Rada et al., 2019)

Las TEM se derivaron de los grupos TEM-1 y TEM-2 mientras que la SHV se derivaron del SHV-1; ambas son capaces de hidrolizar antibióticos betalactámicos de espectro extendido y son fuertemente inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam, estas se han encontrado con mayor frecuencia en *K. pneumoniae* y *E. coli*, y son codificadas en diferentes plásmidos asociados con otros genes de resistencia; se han logrado describir 189 variantes alélicas de tipo SHV y más de 200 de tipo TEM. (Rada et al., 2019)

Enzimas CTX-M.

Las enzimas cefotaximasas (CTX-M) son un tipo que no está relacionado con el grupo de las TEM o las SHV; estas hidrolizan la cefotaxima y la ceftriaxona con mayor eficacia que a la ceftazidima, y también, hidrolizan la cefepima efectivamente; llegan a inhibirse mejor con el tazobactam que con el ácido clavulánico; estas han venido reemplazando las variantes TEM y SHV hasta constituirse en el tipo más común y de carácter endémico en una amplia área geográfica, y hasta la fecha se han identificado 172 variantes diferentes de las CTX-M, divididas en cinco grupos con base en la secuencia de aminoácidos que poseen. (Rada et al., 2019)

7.2. Carbapenemasas.

Según la clasificación molecular de Ambler, las carbapenemasas se agrupan en las clases moleculares A (penicilinasas), B (metalo-β-lactamasas o MBL) y D (oxacilinasas). (Iovleva & Doi, 2017).

Clase A.

La primera carbapenemasa de clase A, SME-1 ("Serratia marcescens enzyme") fue descrita en 1982 en una cepa de *S. marcescens*; posteriormente en 1984 se aisló una enzima inhibidora de imipenem ("Imipenem-hydrolysing β-lactamase") en un aislado de *E. cloacae* procedente de un paciente hospitalizado en EE.UU; ya en 1993, se aisló un tercer tipo de enzima carbapenemasa, NmcA ("not-metallo-enzyme-carbapenemase A") a partir de una cepa de *E. cloacae;* todas estas carbapenemasas son de localización cromosómica, aunque algunas variantes de IMI, como IMI-2, se han identificado en plásmidos. (Navarro et al., 2011)

Las enzimas GES ("Guiana extended spectrum") fueron identificadas inicialmente como BLEE, pero con el tiempo se identificó que hidrolizaban parcialmente el Imipenem; los genes que la codifican son de localización plasmídica. (Astocondor, 2018)

En este grupo de serin carbapenemasas, las que tienen mayor transcendencia clínica e importancia epidemiológica son las denominadas KPC ("Klebsiella pneumoniae carbapenemase"); las cuales son inhibidas por el ácido borónico compuesto que se emplea para su reconocimiento mediante métodos fenotípicos; estas llamadas KPC se distinguen del resto de carbapenemasas ya que se encuentran siempre en plásmidos transferibles. (Chinchilla Puente et al., 2013)

La primera enzima KPC se identificó en un hospital de EE.UU., en 1996 en un aislado de *K. pneumoniae*; desde entonces, se han detectado en distintas especies de enterobacterias hasta 24 variantes, siendo KPC-2 y KPC-3 las más frecuentes. (González Rocha et al., 2017)

Clase B.

Las metalo-β-lactamasas (MBL) son el grupo de carbapenemasas más diverso y diseminado a nivel mundial; poseen un amplio perfil hidrolítico que incluye todos los antibióticos β-lactámicos, aunque presentan muy baja afinidad por los monobactámicos como el aztreonam y no se inhiben por el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam. (Gastelo-Acosta et al., 2016)

A diferencia de las clases A y D, el sitio activo de las MBL contiene un ion (o iones) de Zn^{+2}, que es esencial para la hidrólisis del anillo β-lactámico; esta característica estructural hace que puedan ser inhibidos por agentes quelantes de cationes divalentes como el EDTA, ácido 2-mercaptopropiónico o el ácido dipicolínico, por lo que algunos de ellos se utilizan en el reconocimiento fenotípico de esta familia. (Stoesser et al., 2014).

Las enzimas MBL más importantes desde el punto de vista epidemiológico, por su prevalencia y por su elevada capacidad de diseminación, son las de tipo IMP, VIM y NDM; la enzima IMP-1 ("Imipenem-resistant Pseudomonas") fue la primera carbapenemasa transferible descrita en concreto en *P. aeruginosa*; estas posteriormente se empezaron a encontrar asociadas a otras 27 especies como *S. marcescens y K. pneumoniae,* hasta que al día de hoy se han descrito más de 50 variantes en todo el mundo, siendo especialmente prevalentes en Asia. (López Velandia et al., 2016)

Las enzimas VIM ("Verona integron encode metallo-β-lactamase") se describieron por primera vez en Verona (Italia) en 1997 en un aislado de *P. aeruginosa*; y poco después se comunicó en Francia una segunda variante, VIM-2, localizada en un plásmido transferible; desde allí hasta el día se han descrito más de 40 variantes asociadas tanto a *P. aeruginosa* como a enterobacterias, siendo VIM-2 la más difundida a nivel mundial; pero VIM-1 la que posee un mayor perfil hidrolítico frente a los antibióticos β-lactámicos, especialmente frente a las cefalosporinas. (López Velandia et al., 2016)

Las enzimas NDM (New Delhi metallo-β-lactamase”) son las carbapenemasas con amplia distribución geográfica más recientemente identificadas; su primera descripción se realizó en 2009, asociada a dos aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* procedentes de un paciente sueco llegado de un hospital de Nueva Delhi (India); a partir de 2010 se han descrito 16 variantes y todas ellas muestran un perfil hidrolítico similar al de otras MBL. (Rozales et al., 2014)

Clase D.

La clase D comprende más de 200 enzimas OXA (“Oxacillin-hydrolysing carbapenemase”), cuya producción se ha asociado mayoritariamente con la especie *Acinetobacter baumannii*; toman el nombre de oxacilinasas por su capacidad de hidrolizar la oxacilina y la penicilina; no hidrolizan, o apenas hidrolizan, las cefalosporinas de espectro extendido; a excepción de la variante OXA-163 y en general tienen una actividad carbapenemasa muy débil; estas no se inhiben por el ácido clavulánico, ácido borónico, ni por agentes quelantes como el EDTA, aunque sí por el NaCl; y su elevada resistencia a la temocilina es una característica propia que las diferencia de las carbapenemasas de las clases A y C. (Brañas et al., 2018)

Dentro de estas solo unas pocas variantes poseen actividad carbapenemasa, siendo una de las principales la enzima OXA-48; que después de su primera descripción en Turquía en 2001 en una cepa de *K. pneumoniae,* su diseminación ha sido mundial y principalmente asociada a enterobacterias productoras de BLEE; identificando ya para 2011 en India una variante de esta enzima, OXA-181, con un perfil hidrolítico idéntico a OXA-48. (Potter et al., 2016)

Los niveles de resistencia a carbapenémicos de estas enzimas son muy bajos, siendo sólo detectables en muchos casos cuando van asociados a otros mecanismos de resistencia como BLEE o pérdida de permeabilidad de la membrana. (Brañas et al., 2018)

8. Métodos de detección.

Para la detección de BLEE o carbapenemasas en cepas bacterianas, se pueden utilizar métodos tanto fenotípicos como genotípicos; si bien las técnicas moleculares son consideradas los métodos de referencia para confirmar la presencia de los genes de resistencia, estas técnicas no suelen estar disponibles en el contexto de la práctica clínica habitual. (Josa et al., n.d.; Toledo Barrigas, 2015)

Se han propuesto diversos ensayos fenotípicos para detectar presuntivamente la presencia de estas, en aislamientos clínicos; pero no se recomiendan para confirmación de la actividad enzimática BLEE o Carba, en enterobacterias debido a que tienen baja especificidad que pueden dar falsos positivos debidos a otras enzimas no verdaderas carbapenemasas. (Navarro et al., 2011)

8.1. Métodos fenotípicos.

8.1.1. Concentración Inhibitoria mínima*:* La concentración inhibitoria mínima (CIM) de un agente antimicrobiano es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. Se determina la concentración en el laboratorio incubando una cantidad conocida de bacterias con diluciones definidas del agente antimicrobiano. Utilizando los criterios de interpretación del NCCLS los resultados son interpretados como susceptible, intermedios o resistentes. Las pruebas de la CIM pueden ser realizadas usando como medio de cultivo la microdilución en caldo o agar, siendo en caldo el método más utilizado en los laboratorios clínicos. (Palacios et al., 2015)

8.1.2. Prueba de inactivación de carbapenémicos: Esta prueba se basa en que los microrganismos productores de carbapenemasas degradan el meropenem impregnado en un disco, provocando su hidrólisis e inactivación, y al sacar ese disco y enfrentarlo con una cepa de susceptibilidad a carbapenémicos conocida (*Escherichia coli* ATCC 25922) no ocurre la inhibición. En caso de que la carbapenemasa no esté presente, el meropenem no será hidrolizado y podrá inhibir el crecimiento de la cepa de *E. coli*. (Reyes-Chacón et al., 2017)

8.1.3. Test colorimétrico: Se ha desarrollado un test colorimétrico rápido, denominado Carba NP test, basado en la detección colorimétrica de la hidrólisis del imipenem, al momento de producirse esta hidrólisis, hay un cambio de pH y, en consecuencia, un cambio de color rojo a amarillo/naranja que confirma la producción de carbapenemasa. Este test tiene una buena especificidad, pero baja sensibilidad para la detección del enzima OXA-48. (Sakurada, 2016)

8.2. Métodos genotípicos

8.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa convencional.

La detección de genes realizada por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional; utiliza diversos reactivos: dNTPs, Buffer, Taq Polimerasa y los primers o cebadores que serán diseñados de acuerdo a la epidemiologia de las CRE según el lugar de estudio. (Sacsaquispe-Contreras & Bailón-Calderón, 2018).

El proceso de la PCR comienza con la desnaturalización de la cadena molde, le sigue el alineamiento de los primers que deben tener una secuencia correcta para que se unan a la cadena molde de la muestra; y finalmente la extensión o elongación; este proceso también lleva controles tanto positivos como negativos que pueden ser cepas ATCC. (Sacsaquispe-Contreras & Bailón-Calderón, 2018)

La amplificación se llevó a cabo con las siguientes condiciones de ciclo térmico: 10 min a 94 ° C y 36 ciclos de amplificación que constan de 30 segundos a 94 ° C, 40 segundos a 52 ° C y 50 segundos a 72 ° C, con 5 min a 72 °C para la extensión final; para luego que los fragmentos de ADN se analizaran mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% a 100 V durante 1 h en 1 × TAE (40 mmol / L Tris – HCl [pH 8.3], 2 mmol / L acetato, 1 mmol / L EDTA) que contiene 0,05 mg / L de bromuro de etidio. (Poirel et al., 2011)

8.2.2. FilmArray

Consiste en un sistema cerrado dentro de una bolsa desechable, que aloja todos los productos químicos necesarios para aislar, amplificar y detectar ácidos nucleicos procedentes de diferentes patógenos; el componente plástico de esta bolsa contiene todos los 17 reactivos liofilizados, esta también de divide en segmentos (ampollas) en las que se llevan a cabo todos los procesos químicos, una vez introducida la muestra en la bolsa, esta se lleva al instrumento FilmArray y se inicia la prueba, la que comienza con la purificación del ácido nucleico, una primera etapa de PCR multiplex, posteriormente otra etapa de PCR y finalmente el análisis de fusión del ADN, todo esto a través del software. (March-Rosselló, 2017)

8.2.3. MicroArrays

Esta metodología se basa en la detección, mediante un análisis de imágenes, de la hibridación de una molécula diana a una sonda específica inmovilizada en un soporte sólido. Los microarrays detectan un gran número de genes de resistencia en un mismo ensayo dado que estas sondas, que normalmente son oligonucleótidos, están pegadas a una distancia muy corta; estos microarrays precisan 8h para la obtención de los resultados y presentan una sensibilidad y una especificidad prácticamente del 100%. (March-Rosselló, 2017)

8.2.4. GeneXpert

es un test molecular rápido basado en RPC múltiple en tiempo real, completamente automatizado, que en 58 min detecta las secuencias genéticas, ayuda a pruebas confirmatorias de resistencia a carbapenémicos, utilizando PCR en tiempo real GeneXpert y el equipo GeneXpert, el Kit a utilizar en este proceso es Xpert®Carba-R (Cepheid®) el cual esta estandarizado tanto para muestras de hisopado rectal como a partir de cultivos, y es capaz de detectar los genes KPC, NDM, VIM, IMP-1 Y OXA-48. (Muñoz et al., 2017)

5. Metodología.

Tipo de estudio.

El presente estudio tuvo enfoque cuantitativo con diseño descriptivo y transversal.

Área de estudio.

El estudio se llevó a cabo en la ciudad de Loja, ubicada al sur del Ecuador, en el Hospital Isidro Ayora; unidad operativa de 2° nivel que recibe referencias de las unidades operativas de la zona 7, cuenta con atención a consulta externa en varias especialidades: Medicina Interna, Cardiología, Gineco Obstetricia, Pediatría, Gastroenterología, Oncología, Oftalmología, Neumología, Psiquiatría, Psicología, Dermatología, Neurología, Traumatología Ortopedia, Audiología, Reumatología, Hemofilia, Hematología, Nefrología; cuenta con departamentos de hospitalización y apoyo diagnóstico como: Clínica, Cirugía, Pediatría, Ginecología, Unidad de quemados, Laboratorio Clínico, Microbiológico, Anatomo Patológico, Clínica del VIH, Servicio de medicina transfusional, Imagenología, Endoscopia; dispone de 255 camas.

Grupo de estudio.

La investigación se realizó en muestras con pedido médico para cultivo y antibiograma de pacientes hospitalizados del Hospital General Isidro Ayora durante el año 2019; de las cuales se obtuvieron 364 aislados de *Enterobacteriaceae*; clasificándolas en productoras de BLEE y carbapenemasas, de estas ultima se analizaron los genes que provocan dicha resistencia de un total de 32 cepas bacterianas.

Universo y muestra

El presente estudio trabajó con una muestra censal constituida por el total de bacterias resistentes a carbapenémicos para la parte molecular, con un total de 32 cepas productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados durante el año 2019 las cuales ya tenían

identificación bacteriana y perfil de susceptibilidad determinado por microdilución en caldo y métodos automatizados a través del equipo VITEK 2 Compact de Biomeriux, en estas se confirmó por método fenotípicos la presencia de mecanismos de resistencia para BLEE y carbapenémicos por sinergia de discos.

Criterios de inclusión.

Muestras con pedido médico de cultivo y antibiograma que se hayan recibido en el Laboratorio Clínico del Hospital Isidro Ayora Loja, durante el año 2019.

Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados.

Criterios de exclusión.

Muestras de pacientes con pedido médico de cultivo y antibiograma procedentes de pacientes ambulatorios.

Bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas que no pertenezcan a la familia *Enterobacteriaceae*.

Materiales y métodos

El presente estudio se realizó con el apoyo tecnológico del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Loja para realizar la identificación genotípica y del laboratorio de microbiología para la identificación y fase fenotípica.

Para el cumplimiento del primer objetivo específico planteado que fue clasificar las infecciones causadas por *Enterobacteriaceae* productoras de betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas en pacientes hospitalizados, se utilizó los resultados que están en la base de datos ya obtenidos sobre las infecciones causadas por cepas productoras de BLEE, y los datos conseguidos sobre carbapenemasas a través de biología molecular; para el segundo objetivo específico que fue identificar los genes prevalentes de carbapenemasas en *Enterobacteriaceae* que

causan infecciones en pacientes hospitalizados, se realizó una tabulación de los datos ya obtenidos a través de la genotipificación por PCR.

Procesamiento de muestras

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio y se organizaron de la siguiente manera:

Fase pre analítica.

- Obtención de permiso para la ejecución del estudio. (Anexo N°1) (Anexo N°2).
- Elaboración de instrumentos de recolección de datos: Los datos se obtuvieron de los registros de las muestras tomadas a pacientes hospitalizados en el Hospital Isidro Ayora, de las cuales se aislaron las diferentes cepas bacterianas productoras de carbapenemasas y BLEE. (Anexo N°3)

Fase analítica

- Preparación de agar sangre para siembra de cepas bacterianas. (Anexo N°4)
- Reconstitución de cepas. (Anexo N°5)
- Protocolo de extracción de ADN (Anexo N°6)
- Procesamiento molecular por reacción en cadena de la polimerasa convencional (Anexo N°7)
- Protocolo de electroforesis (Anexo N°8)

Fase post analítica

- Instrumento para recolección de resultados (Anexo N°9) (Anexo N°10).

Tabulación, presentación e interpretación de resultados.

Los resultados obtenidos se tabularon en el programa Microsoft Excel 2010, de acuerdo a los objetivos planteados, los mismos que serán presentados mediante tablas o figuras para su posterior análisis e interpretación.

Consideraciones éticas

En el presente trabajo de investigación aplicará las Normas de Bioética manteniendo la confidencialidad de los datos en estricto apego a los derechos de los pacientes.

6. Resultados.

Tabla N°1

Enterobacteriaceae aisladas en servicios de Hospitalización durante el año 2019.

Microorganismo aislado.	AREAS DE HOSPITALIZACION															
	CIRUGIA		MED. INTERNA		NEONATOLOGIA		PEDIATRIA		UCI		GINECO OBS		QUEMADOS		TOTAL	
	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
E. coli	50	13,74	49	13,46	14	3,85	15	4,12	21	5,77	17	4,67	8	2,20	174	47,80
K. pneumoniae	20	5,49	18	4,95	24	6,59	4	1,10	23	6,32	3	0,82	7	1,92	99	27,20
K. oxytoca	2	0,55	7	1,92	4	1,10	0	0	0	0	0	0	0	0	13	3,57
K. aerogenes	2	0,55	1	0,27	1	0,27	0	0	1	0,27	0	0	0	0	5	1,37
E. cloacae	2	0,55	4	1,10	3	0,82	1	0,27	0	0	1	0,27	2	0,55	13	3,57
C. freundii	3	0,82	2	0,55	1	0,27	1	0,27	2	0,55	0	0	0	0	9	2,47
M. morganii	3	0,82	0	0	0	0	0	0	2	0,55	0	0	0	0	5	1,37
P. vulgaris	0	0	1	0,27	1	0,27	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,55
P. mirabilis	11	3,02	4	1,10	0	0	0	0	5	1,37	3	0,82	1	0,27	24	6,59
P. penneri	0	0	1	0,27	1	0,27	0	0	1	0,27	0	0	0	0	3	0,82
S. liquefaciens	1	0,27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,27	2	0,55
S. fonticola	0	0	0	0	1	0,27	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,27
S. marcescens	5	1,37	3	0,82	0	0	1	0,27	4	1,10	0	0	0	0	13	3,57
Salmonella typhi	0	0	0	0	1	0,27	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,27
TOTAL	99	27,20	90	24,73	51	14,01	22	6,04	59	16,21	24	6,59	19	5,22	364	100

Autor: *David Alejandro Gallegos Criollo*
Fuente: *Hoja de registro de muestras procesadas en microbiología durante el 2019*

Los aislamientos de *Enterobacteriaceae* se obtuvieron de diversos tipos de muestras como orina, secreciones, esputo, líquidos corporales, hemocultivos y dispositivos médicos de los pacientes hospitalizados en las diferentes áreas del "Hospital Isidro Ayora Loja", se obtuvo un total de 364 aislados bacterianos; siendo el área de cirugía la que presenta un mayor índice de aislamientos con un 27,20%, seguida del área de medicina interna y UCI con un 24,73% y 16,21% respectivamente.

Dentro de las diferentes áreas de hospitalización y de los 364 aislados bacterianos, se identificaron 14 diferentes bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, siendo *E. coli* la que predomina con un 47,80%, seguida de *K. pneumoniae* con un 27,20%, y finalmente *P. mirabilis* con un 6,59% del total.

Tabla N°2

Enterobacteriaceae productoras de BLEE aisladas en pacientes hospitalizados del HIAL durante el año 2019.

MICROORGANISMO AISLADO	**MECANISMO DE RESISTENCIA BLEE**					
	NO PRODUCTORAS DE BLEE		PRODUCTORAS DE BLEE		TOTAL	
	F	%	F	%	F	%
E. coli	109	29,95	65	17,86	174	47,80
K. pneumoniae	30	8,24	69	18,96	99	27,20
K. oxytica	10	2,75	3	0,82	13	3,57
K. aerogenes	5	1,37	0	0	5	1,37
E. cloacae	13	3,57	0	0	13	3,57
C. freundii	8	2,20	1	0,27	9	2,47
M. morganni	5	1,37	0	0	5	1,37
P. vulgaris	2	0,55	0	0	2	0,55
P. mirabilis	22	6,04	2	0,55	24	6,59
P. penneri	3	0,82	0	0	3	0,82
S. liquefaciens	2	0,55	0	0	2	0,55
S. fonticola	1	0,27	0	0	1	0,27

S. marcensces	13	3,57	0	0	13	3,57
Salmonella typhi	1	0,27	0	0	1	0,27
TOTAL	224	61,54	140	38,46	364	100

BLEE: Betalactamasas de espectro extendido.

HIAL: Hospital Isidro Ayora Loja.

Autor: *David Alejandro Gallegos Criollo.*

Fuente: *Hoja de registro de muestras procesadas en microbiología durante el 2019.*

Las cepas de *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE fueron 140 lo que representa el 38,46%, siendo así *K. pneumoniae* la bacteria que presenta en mayor porcentaje este mecanismo con el 18,96%, seguida de *E. coli* con el 17,86%.

Tabla N°3

Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas aisladas en pacientes hospitalizados del HIAL durante el año 2019.

MICROORGANISMO AISLADO	**PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS.**		**NO PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS.**		**TOTAL**	
	F	%	F	%	F	%
E. coli	2	0,55	172	47,25	174	47,80
K. pneumoniae	24	6,59	75	20,60	99	27,20
K. oxytoca	2	0,55	11	3,02	13	3,57
K. aerogenes	1	0,27	4	1,10	5	1,37
E. cloacae	1	0,27	12	3,30	13	3,57
C. freundii	1	0,27	8	2,20	9	2,47
M. morganii	1	0,27	4	1,10	5	1,37
P. vulgaris	0	0	2	0,55	2	0,55
P. mirabilis	0	0	24	6,59	24	6,59
P. penneri	0	0	3	0,82	3	0,82
S. liquefaciens	0	0	2	0,55	2	0,55
S. fonticola	0	0	1	0,27	1	0,27
S. marcescens	0	0	13	3,57	13	3,57
Salmonella typhi	0	0	1	0,27	1	0,27
TOTAL	32	8,79	332	91,21	364	100

HIAL: Hospital Isidro Ayora Loja.

Autor: *David Alejandro Gallegos Criollo.*

Fuente: *Hoja de registro de muestras procesadas en microbiología durante el 2019.*

Del total de 364 cepas aisladas, las que presentaron producción de carbapenemasas fueron 32 lo que representa el 8,79% de este mecanismo de resistencia; siendo *K. pneumoniae* con el 6,59 % la bacteria que con mayor frecuencia produce carbapenemasas; seguida de *K. oxytoca* y *E. coli* con el 0,55% para ambas.

Tabla N°4

Total, de cepas productoras de carbapenemasas aisladas de acuerdo al área de hospitalización del HIAL durante el año 2019.

MICROORGANISMO AISLADO	AREA DE HOSPITALIZACION										TOTAL	
	MED INTERNA		CIRUGIA		UCI		NEONATOLOGIA		U. QUEMADOS			
	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
Escherichia coli	0	0	0	0	1	3,13	0	0	1	3,13	2	6,25
Klebsiella pneumoniae	10	34,37	6	18,75	5	15,62	3	9,37	0	0	24	75
Enterobacter cloacae	0	0	0	0	1	3,125	0	0	0	0	1	3,13
Klebsiella aerogenes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3,13
Citrobacter freundii	0	0	0	0	1	3,13	0	0	0	0	1	3,13
Klebsiella oxytoca	1	3,13	0	0	0	0	1	3,13	0	0	2	6,25
Morganella morganii	0	0	1	3,127	0	0	0	0	0	0	1	3,13
TOTAL	12	37,50	7	21,87	8	25	4	12,5	1	3,13	32	100

HIAL: Hospital Isidro Ayora Loja.

Autor: *David Alejandro Gallegos Criollo.*

Fuente: *Hoja de registro de muestras procesadas en microbiología durante el 2019.*

El total de cepas aisladas que presentaron enzimas carbapenemasas fueron 32; siendo *K. pneumoniae* la que con mayor frecuencia muestra este mecanismo con un 75%; seguido de *E. coli y K. oxytoca* con 6,25%, y por último *K. aerogenes, E. cloacae, C. freundii* y *M. morganii* 3,13% respectivamente.

Del mismo total de 32 cepas bacterianas productoras de carbapenemasas; el área más afectada por estos microorganismos fue Medicina interna con un 37.50% seguido del área de UCI con

UN 25% y Cirugía con un y 21,87% respectivamente; siendo Neonatología con 12,50% y Unidad de Quemados con 3,13% las que menos índice de esta resistencia presentaron.

Tabla N°5

Genes presentes en las *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados en el HIAL durante el año 2019

Microorganismos aislados	**Genes que codifican la producción de carbapenemasas**										TOTAL	
	KPC		**IMP**		**VIM**		**NMD**		**OXA**			
	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
Escherichia coli	2	6,25	0	0	0	0	0	0	0	0	2	6,25
Klebsiella pneumoniae	23	71,87	1	3,125	0	0	0	0	0	0	24	75
Enterobacter cloacae	1	3,125	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3,125
Klebsiella aerogenes	1	3,125	1	3,125	0	0	0	0	0	0	1	3,125
Citrobacter freundii	1	3,125	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3,125
Klebsiella oxytoca	2	6,25	0	0	0	0	0	0	0	0	2	6,25
Morganella morganii	1	3,125	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3,125
TOTAL											32	100

HIAL: Hospital Isidro Ayora Loja.

Autor: *David Alejandro Gallegos Criollo.*

Fuente*: Registros de laboratorio de PCR convencional.*

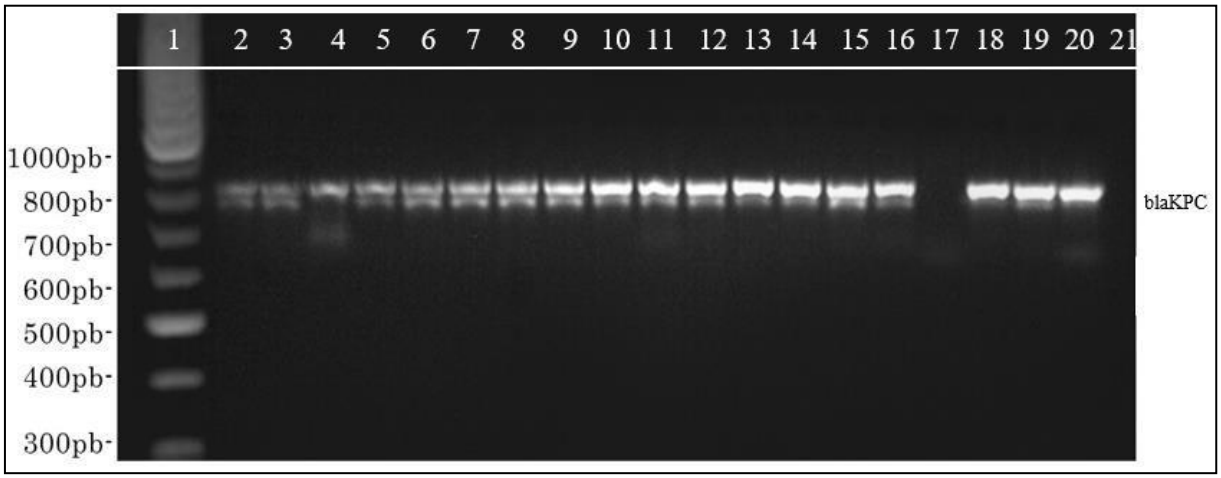
De las cepas de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas, se realizó el estudio para conocer que genes portan y permiten la producción de carbapenemasas; obteniendo como resultado la presencia de 31 *bla*KPC, y 2 *bla*IMP en las distintas bacterias aisladas; dos de las cepas identificadas presentaron la presencia de ambos genes.

Los genes *bla*KPC que predominan en este estudio están distribuidos principalmente en *K. pneumoniae* con el 71,87%, seguida de *E. coli* y *K. oxytoca* con 6,25%, quedando *K. aerogenes,*

E. cloacae y *C. freundii* con el 3,12%; por otra parte, el gen blaIMP estuve presente en 1 caso de *K. pneumoniae* y otro en *E. cloacae.*

Figura 1.

Electroforesis de cepas de *Enterobacteriaceae* para detección de genes blaKPC.

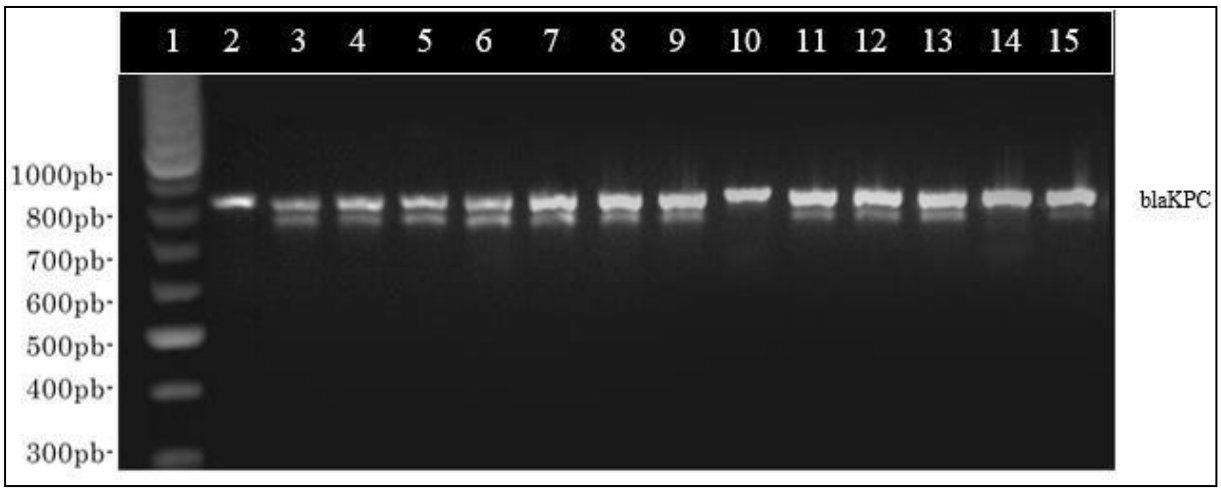


Autor: *David Alejandro Gallegos Criollo.*

Figura 1. Detección de genes blaKPC, por PCR en algunas cepas. Corrida electroforética en gel de agarosa. Carriles: 1- Marcador de peso molecular; 2 a 20 – Cepas bacteriana productoras de Carbapenemasas. 21 - Control negativo. 12- Control Positivo.

Figura 2.

Electroforesis de cepas de *Enterobacteriaceae* para detección de genes blaKPC.

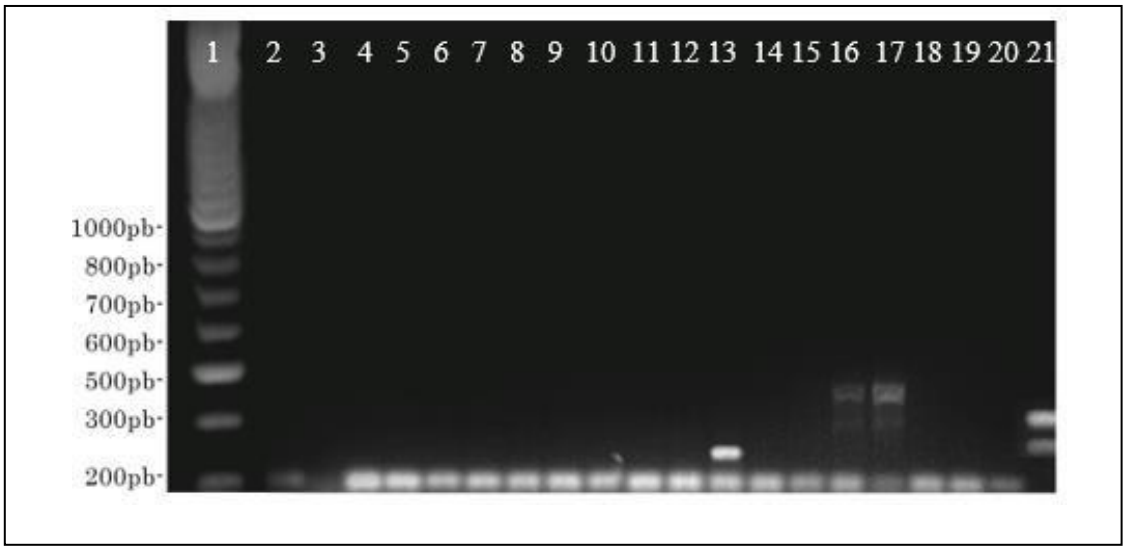


Autor: *David Alejandro Gallegos Criollo.*

Figura 2. Detección de genes blaKPC, por PCR en algunas cepas. Corrida electroforética en gel de agarosa. Carriles: 1- Marcador de peso molecular, 2 a 14 – Cepas bacteriana productoras de Carbapenemasas. 15 - Control positivo.

Figura 3.

Electroforesis de cepas de *Enterobacteriaceae* para detección de genes blaIMP y blaVIM.



Autor: *David Alejandro Gallegos Criollo.*

Figura 3. Detección de genes blaIMP y blaVIM, por PCR en algunas cepas. Corrida electroforética en gel de agarosa. Carriles: 1- Marcador de peso molecular; 2 a 19 – Cepas bacteriana productoras de Carbapenemasas. 20 - Control negativo, 21- Control positivo.

Figura 4.

Electroforesis de cepas de *Enterobacteriaceae* para detección de genes blaIMP y blaVIM:

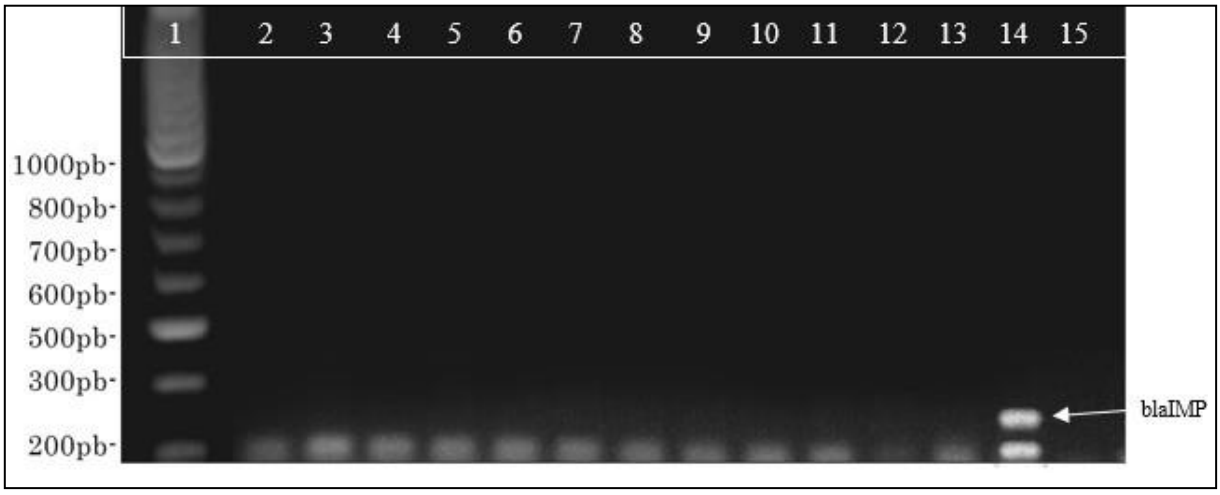
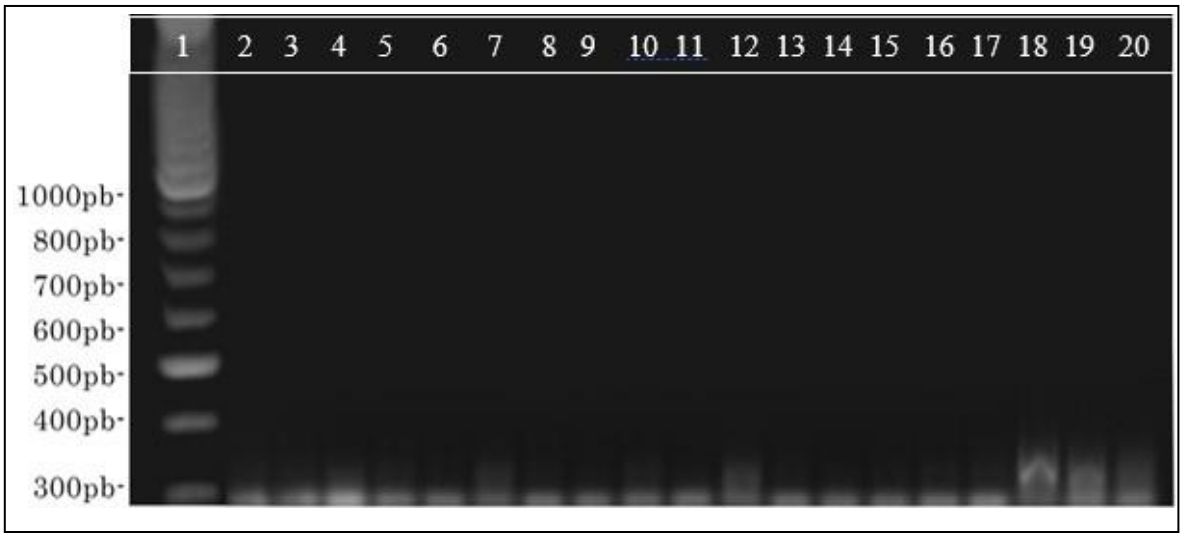


Figura 4. Detección de genes blaIMP y blaVIM, por PCR en algunas cepas. Corrida electroforética en gel de agarosa. Carriles: 1- Marcador de peso molecular (100pb), 2 a 14 – Cepas bacteriana productoras de Carbapenemasas. 15 - Control negativo.

Figura 5.

Electroforesis de cepas de *Enterobacteriaceae* para detección de genes blaNDM.



Autor: *David Alejandro Gallegos Criollo.*

Figura 5. Detección de genes blaNDM, por PCR en algunas cepas. Corrida electroforética en gel de agarosa. Carriles: 1- Marcador de peso molecular, 2 a 20 – Cepas bacteriana productoras de Carbapenemasas.

Figura 6.

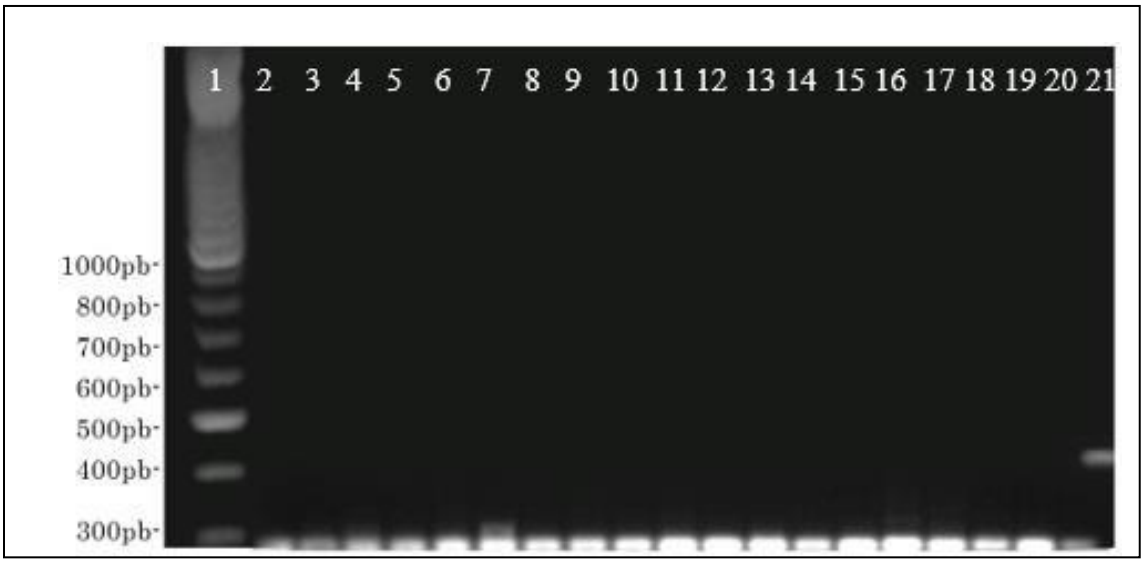
Electroforesis de cepas de *Enterobacteriaceae* para detección de genes blaNDM.

Autor: *David Alejandro Gallegos Criollo.*

Figura 6. Detección de genes blaNDM, por PCR en algunas cepas. Corrida electroforética en gel de agarosa. Carriles: 1- Marcador de peso molecular; 2 a 14 – Cepas bacteriana productoras de Carbapenemasas. 15 - Control negativo, 16- Control positivo.

Figura 7.

Electroforesis de cepas de *Enterobacteriaceae* para detección de genes blaOXA.

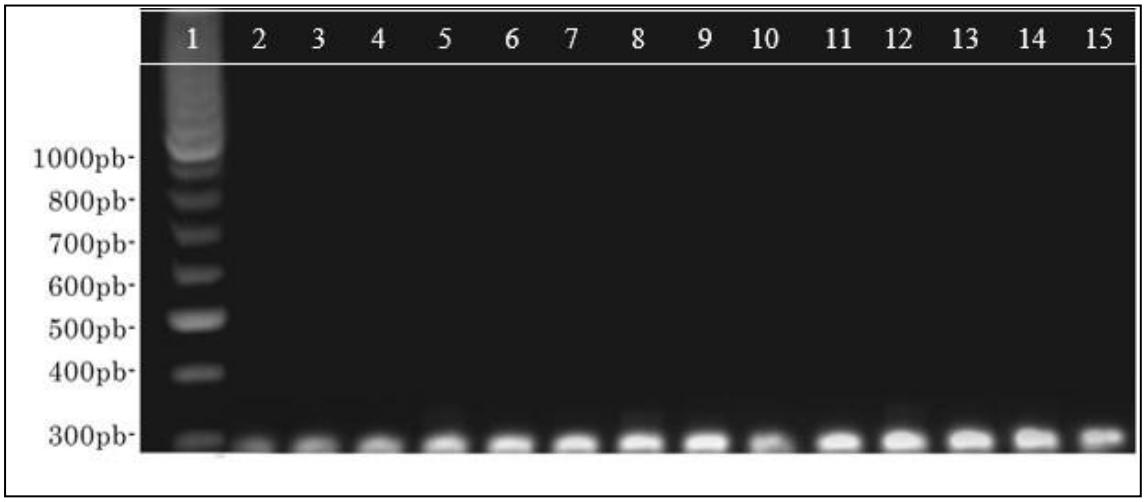


Autor: *David Alejandro Gallegos Criollo.*

Figura 7. Detección de genes blaOXA, por PCR en algunas cepas. Corrida electroforética en gel de agarosa. Carriles: 1- Marcador de peso molecular; 2 a 19 – Cepas bacteriana productoras de Carbapenemasas. 20 - Control negativo, 21 – Control positivo.

Figura 8.

Electroforesis de cepas de *Enterobacteriaceae* para detección de genes blaOXA.



Autor: *David Alejandro Gallegos Criollo.*

Figura 8. Detección de genes blaOXA, por PCR en algunas cepas. Corrida electroforética en gel de agarosa. Carriles: 1- Marcador de peso molecular (100pb), 2 a 14 – Cepas bacteriana productoras de Carbapenemasas. 15 - Control negativo.

7. Discusión.

La resistencia bacteriana es una crisis alarmante a nivel mundial; y las bacterias que mayormente la producen son las *Enterobacteriaceae*, dentro de los mecanismos más fuertes y de mayor preocupación tenemos la producción de enzimas como las Betalactamasas de espectro extendido y las carbapenemasas; la frecuencia de estas en la población estudiada es que la presencia de BLEE se identificó en 140 aislamientos (38,46%) y de carbapenemasas en 32 (8,79%); y las bacterias que mayores índices de BLEE presentaron fueron *K. pneumoniae* (18,96%) y *E. coli* (17,86%).

Del total de cepas aisladas con producción de carbapenemasas que fueron 32, *K. pneumoniae* fue la que con mayor incidencia presento con el 75%; seguido de *E. coli y K. oxytoca* con 6,25%, y por último *K. aerogenes, E. cloacae, C. freundii* y *M. morganii* con el 3,13% respectivamente; la presencia de genes que codifican esta resistencia se vio distribuida principalmente en dos, *bla*KPC (93,94%) y *bla*IMP (6,06%), los mismos que están distribuidos principalmente en *K. pneumoniae* con el 69,70%, seguida de *E. coli* y *K. oxytoca* con 6,06%, quedando *K. aerogenes, E. cloacae* y *C. freundii* con el 3,03%; por otra parte, el gen blaIMP(6,06) estuvo presente en *K. pneumoniae* (3,03%) y otro en *E. cloacae* (3,03%). La importancia de conocer los mecanismos de resistencia y los genes que la producen es poder implementar opciones terapéuticas combinadas para minimizar las tasas de mortalidad y los costos dentro de la atención médica, evitando el uso indiscriminado de antibióticos.

En Loja, en un estudio dirigido a analizar los mecanismos de resistencia bacteriana en el Hospital “Manuel Ignacio Monteros” durante el año 2013, realizado por Toledo Barrigas (2015); se encontró que el 26,4% de cepas aisladas eran productoras de BLEE; y el 1,6% corresponden a cepas productoras de carbapenemasas; resultados que discrepan a nuestro estudio ya que, la presencia de BLEE se identificó en 38,46% y de carbapenemasas en 8,79%, indicando un aumento significativo de la resistencia, aun debiéndose a un campo de estudio análogo al

nuestro; mostrando así que la resistencia van en aumento masivo si no se responsabiliza el uso y consumo de antibióticos.

Un estudio sobre epidemiología molecular de las infecciones y colonizaciones por CRE en un hospital de Madrid, llevado a cabo por Brañas et al., (2018); identifico 7 especies bacterianas, predominando *K. pneumoniae* (78,9%) y *E. cloacae* (16,4%); exponiendo el tipo de carbapenemasa más frecuente en *K. pneumoniae* OXA-48 (91,1%) y en *E. cloacae* VIM (71,4%); estudio que tiene cierta similitud con nuestros resultados en el caso de que *K. pneumoniae* es la que mayormente presenta carbapenemasas con el 75%, sin embargo difiere en otros resultados no siendo *E. cloacae* el segundo agente con mayor frecuencia, sino *E. coli y K. oxytoca* con 6,25%, además de discrepar con la distribución de genes de resistencia que en nuestro estudio fueron blaKPC (93,94%) y blaIMP (6,06%); la similitud se basa en que *K. pneumoniae* es uno de los patógenos que se encuentra mayormente distribuido a nivel mundial, aparte de ser un oportunista y de los que mayores infecciones genera, por presentar altos índices de resistencia ha sido ubicado dentro del grupo *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter spp.* (ESKAPE); por otra parte, la presencia de genes diferentes se debe a la cercanía con zonas endémicas y de brotes de los mismos como son: Asia y África; ya que se encuentran más cerca continentalmente y esto sumado a las migraciones permitiría una diseminación mucho mayor.

Un estudio sobre identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en *Enterobacteriaceae* en hospitales de Perú, realizado por Sacsaquispe-Contreras & Bailón-Calderón (2018); confirmo la presencia de carbapenemasas en *E. coli, K. pneumoniae, P. mirabilis. P. rettgeri, P. stuartii, E. cloacae, E. aerogenes, C. freundii*, portadores de los genes de resistencia blaKPC (31,3 %), blaNDM (67,5 %), y blaIMP (1,2 %); los resultados difieren en la presencia del gen blaNDM el cual no se encontró en nuestro estudio, y se asemeja en la identificación de los genes blaKPC (93,94%) y blaIMP (6,06%), esto se debería a que es un

territorio vecino y la diseminación puede ser similar; pero por otro lado la diferencia estaría dada por la cercanía al territorio brasileño donde se han reportado brotes de este gen, así mismo estaría involucrada su recién aparición en Sudamérica y que no se ha diseminado por igual en todos los países.

Un estudio llevado a cabo en un Hospital de tercer nivel en la cuidad de Quito, realizado por Morales et al., (2018); reporto 71 aislados bacterianos los cuales producían carbapenemasas de los cuales 69 presentaron el gen blaKPC, en 1 el gen blaIMP y en otro dos no se logró identificar el gen asociado; resultados semejantes a nuestro estudio ya que el gen prevalente fue blaKPC con 31 casos y blaIMP con 2; esta gran similitud se debería a la epidemiologia nacional de los genes, al lugar de estudio un hospital, además de usar el mismo sistema VITEK 2 para la identificación bacteriana y su susceptibilidad.

8. Conclusiones.

K. pneumoniae y *E. coli* son las bacterias que predominan como causantes de infecciones en estancia hospitalaria; ambas expresan similares índices de BLEE, pero *K. pneumoniae* es la que predomina en los casos de producción de carbapenemasas sobre otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Los genes que prevalecen en enterobacterias causantes de infecciones y que circulan intrahospitalariamente son los *bla*KPC, cuya mayor presencia se halló distribuida en *K. pneumoniae.*

Las bacterias productoras de carbapenemasas predominan dentro del medio hospitalario, principalmente en las áreas de Medicina Interna, UCI, y Cirugía en ese orden respectivamente.

9. Recomendaciones.

Se recomienda poner más atención e interés en la resistencia bacteria, ya que estamos creando bacterias multirresistente las mismas que en un futuro ya no solo encontraremos en centros de atención de salud, si no en la comunidad, aumentando aquí el problema.

Se recomienda elaborar campañas de concientización a la población en general sobre el uso y consumo indiscriminado de antibióticos, lo que lleva así a un desarrollo de índices de resistencia mucho más altos de los de hoy en día.

Promover al personal de salud, el uso de terapias correctas, y no el abuso de medicamentos, evitando aumentar las altas tasas de morbilidad y mortalidad, limitaciones en las opciones terapéuticas e incremento en los costos por terapias alternativas y estadía hospitalaria por largos periodos

Es recomendable que las autoridades de la Universidad Nacional de Loja, impulsen e inviertan en investigaciones con características científicas que alcancen resultados eminentes y permitan establecer estadísticas reales de nuestro medio, las cuales serán útiles para toda la población.

10. Bibliografía.

Alós, J. I. (2015). Antibiotic resistance: A global crisis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *33*(10), 692–699. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004

Álvarez, D. (2017). *"Determinación De Betalactamasas De Espectro Extendido Tipo Ampc En Cepas De Escherichia Coli Y Su Relación Con La Resistencia Antimicrobiana."*

Astocondor, L. (2018). Artículo de revisión betalactamasas: la evolución del problema. *Rev Peru Investig Salud*, *2*(2), 42–49.

Besser, J. M. (2018). Salmonella epidemiology: A whirlwind of change. *Food Microbiology*, *71*, 55–59. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.018

Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, *3*(3), 529–563. https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529

Brañas, P., Gil, M., Villa, J., Orellana, M. Á., & Chaves, F. (2018). Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* infection/colonisation in a hospital in Madrid. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *36*(2), 100–103. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.10.004

Cárdenas, M., Gándara, J., & Pérez, M. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la "inteligencia" de las bacterias. *Elementos*, *94*, 35–43.

Chinchilla Puente, A. M., Tomas Barrios, B. E., & Morales Santizo, R. D. (2013). *Detección de carbapenemasas tipo NDM-1 y KPC-2 en enterobacterias BLEE+: evaluación fenotípica con confirmación genotípica*. http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/05/05_9215.pdf

Chiriboga, M., & Araujo, C. (2012). *Nuevo Método alternativo para la detección de BLEE en*. http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/644/1/T-UCE-0006-28.pdf

Cristina, M. L., Sartini, M., & Spagnolo, A. M. (2019). Serratia marcescens infections in neonatal intensive care units (NICUs). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *16*(4). https://doi.org/10.3390/ijerph16040610

Cristina Naranjo. (2018). Shigella spp., determinación de los serotipos y perfiles de susceptibilidad antimicrobiana en el periodo 2009 – 2016, Quito Ecuador. In *Universidad Central del Ecuador*. http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/14581/1/T-UCE-0008-BC017-2018.pdf

Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pagès, J. M. (2019). Enterobacter spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resisDavin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pagès, J. M. (2019). Enterobacter spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. Clinical Micro. *Clinical Microbiology Reviews*, *32*(4), 1–32. https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19

Dedios Periche, A. C. (2018). *Enterobacterias productoras de betalactamasas AmpC y de espectro extendido aisladas en el Hospital Universitario de la Universidad Nacional de Piura, Perú.* https://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/1683/BIO-DED-PER-2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Delgado Fernández, R. (2015). Peculiaridad de la clasificación taxonómica y nomenclatura del género Salmonella. *Acta Médica Del Centro*, *9*(4), 73–75.

Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., & Martínez-Romero, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Publica de Mexico*, *51*(SUPPL.3), 439–446. https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000900009

Gastelo-Acosta, R. M., Díaz-Sipión, R. S., & Maguiña Vargas, C. (2016). Carbapenemasas en bacterias Gram negativas no fermentadoras aisladas en servicios críticos del Hospital Regional Lambayeque, diciembre 2014 - julio 2015. *Acta Medica Peruana*, *33*(3), 183.

https://doi.org/10.35663/amp.2016.333.110

Gastelo Acosta, R., & Maguiña Vargas, C. (2018). Mecanismos de resistencia bacteriana. *Diagnóstico*, *57*(2), 82–86. https://doi.org/10.33734/diagnostico.v57i2.139

Girlich, D., Bonnin, R. A., Dortet, L., & Naas, T. (2020). Genetics of Acquired Antibiotic Resistance Genes in Proteus spp. *Frontiers in Microbiology*, *11*(February), 1–21. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00256

Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic Escherichia coli. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*, 3–30. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015

González Rocha, G., Vera Leiva, A., Barría Loaiza, C., Carrasco Anabalón, S., Lima, C., Aguayo Reyes, A., Domínguez, M., & Bello Toledo, H. (2017). KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemase, main carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *Revista Chilena de Infectología*, *34*(5), 476–484.

Iovleva, A., & Doi, Y. (2017). Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Clinics in Laboratory Medicine*, *37*(2), 303–315. https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.005

Jawetz, Melnick, & A. M. (2013). Microbiologia Medica. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).

Josa, D. F., Bustos, G., Cristina, I., & Esparza, G. (n.d.). *Evaluación de tres métodos de tamizaje para detección de*. 253–261.

Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, *33*(3), 300. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15

Kot, B. (2019). Antibiotic Resistance among Uropathogenic Escherichia coli. *Polish Journal of Microbiology*, *68*(4), 403–415. https://doi.org/10.33073/PJM-2019-048

Liu, H., Zhu, J., Hu, Q., & Rao, X. (2016). Morganella morganii, a non-negligent opportunistic pathogen. *International Journal of Infectious Diseases*, *50*, 10–17. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.07.006

Liu, L. H., Wang, N. Y., Wu, A. Y. J., Lin, C. C., Lee, C. M., & Liu, C. P. (2018). Citrobacter freundii bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *51*(4), 565–572. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.08.016

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

Mahlen, S. D. (2011). Serratia infections: From military experiments to current practice. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(4), 755–791. https://doi.org/10.1128/CMR.00017-11

Manganello, S., Tayara, A., Perazzi, B., Neira, L., Famiglietti, A., Pugliese, L., Santini, P., & Vay, C. (2001). Caracterización y distribución de especies de Citrobacter en un hospital universitario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *19*(1), 11–14. https://doi.org/10.1016/S0213-005X(01)72541-4

March-Rosselló, G. A. (2017). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *35*(3), 182–188. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.005

Martina Lazzaro Directora, L., & Eleonora García Véscovi Rosario, D. (2019). *"Factores de virulencia de Serratia marcescens."* http://rephip.unr.edu.ar/xmlui/handle/2133/16075

Martínez-Martínez, L. (2016). *Revista médica Valdecilla*. *1*(1), 7–16.

Mattock, E., & Blocker, A. J. (2017). How do the virulence factors of shigella work together to cause disease? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*(MAR), 1–24. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00064

Medina, J., Paciel, D., Noceti, O., & Rieppi, G. (2019). Actualización acerca de colistina (polimixina E). *Revista Médica Del Uruguay*, *33*(3 SE-Trabajos de Revisión o Actualización y Puestas al día), 195–206. http://revista.rmu.org.uy/ojsrmu311/index.php/rmu/article/view/101

Meletis, G. (2016). Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, *3*(1), 15–21. https://doi.org/10.1177/2049936115621709

Mina-ortiz, J. B., Pinto-nogales, E. S., & Lino-villacreses, W. A. (2021). *Resistência a antibióticos em bastonetes Gram negativos : betalactamases AmpC*. *7*, 314–340.

Ministerio de Salud Publica. (2018). Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en ecuador 2014-2018. *Ministerio de Salud Publica*, 10. https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf

Morales, U., Estefanía, E., Alexandra, V., Polo, V., Gabriela, A., Martínez, C., Lucia, X., Araque, O., Fabián, B., Freile, N., Marcos, F., Toapanta, G., Aníbal, J., & Chacón, R. (2018). *Carbapenemasas y sensibilidad a los antibióticos no*. 52–57.

Moreno-Monge, K. M. (2013). Terapéutica Médica Carbapenémicos : Tipos Y Mecanismos De Resistencia. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXX*, *608*(608), 599–605. http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/608/art8.pdf

Muñoz, C., Zumarán, C., González, T., Wozniak, A., Castillo, C., & García Cañete, P. (2017).

Evaluación de test rápidos y diseño de una estrategia para la detección y caracterización de carbapenemasas en cepas de bacilos gramnegativos. *Revista Chilena de Infectologia*, *34*(4), 326–332. https://doi.org/10.4067/s0716-10182017000400326

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfauer, M. A. (2017). *Manual of Clinical Microbiolology* (Vol. 1).

Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., & Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *29*(7), 524–534. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011

Navarro, F., Miró, E., & Mirelis, B. (2010). Interpretive reading of enterobacteria antibiograms. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *28*(9), 638–645. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.05.002

Niyogi, S. K. (2005). Shigelosis. *J. Micobiol.*, *43*, 133–143.

Ocampos Ugarte, J. G., & Takahasi Alvarez, V. E. (2015). Enterobacterias productoras de carbapenemasas en pacientes del Servicio de Clínica Médica del Hospital Nacional de Itauguá. *Revista Virtual de La Sociedad Paraguaya de Medicina Interna*, *2*(2), 33–42. https://doi.org/10.18004/rvspmi/2312-3893/2015.02(02)33-042

Organización Panamericana de la Salud. (2017). *Resistencia a los antimicrobianos - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. https://www.paho.org/es/temas/resistencia-antimicrobianos

Palacios, J. A., Ojeda, S. B., Gonzalez, V. O., & Moreno, M. M. (2015). Comparación de la actividad antimicrobiana de meropenem genérico y meropenem innovador por la técnica de micro dilución en cepas resistentes. *Revista Cubana de Farmacia*, *49*(4), 651–663.

Pathogens, G., Hamilton, A. L., Kamm, M. A., & Ng, S. C. (2018). Proteus spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(3), 1–19. https://doi.org/10.1128/CMR%0A.00085-17.

Patricia, D. C., Zarain, L., Margarita, D., Hernández, M. P. A., Rosa, D., & Gracia, R. (2021). *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla " Determinación fenotípica y molecular de la resistencia antimicrobiana en cepas de Klebsiella spp . aisladas de diferentes hospitales mexicanos " . Licenciado en Biomedicina Marco Arturo Pérez Sánchez*.

Pérez, C., Melo, P., Besomi, J., Porte, L., & Wilhelm, J. P. (2018). Escherichia vulneris etiologic agent of septic arthritis in a child. *Rev. Chil. Infectol*, *35*(1), 80–82. https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000100080

Pérez, D. Q. (2017). Antimicrobial resistance: Evolution and current perspectives in the context of the "one health" approach. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, *69*(3), 1–17.

Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *70*(1), 119–123. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002

Potter, R. F., D'Souza, A. W., & Dantas, G. (2016). The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Drug Resistance Updates*, *29*, 30–46. https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.09.002

Prats, G., & Mirelis, B. (2012). GÉNERO Shigella: Aspectos prácticos para el laboratorio de Microbiología. *Control de Calidad SEIMC*, 1–4. https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Rshigella.pdf

Quirós Cárdenas, S. (2016). Infecciones por bacterias del género Salmonella: relevancia en la práctica clínica. *Revista Clínica Escuela de Medicina UCR-HSJD*, *6*(4).

https://doi.org/10.15517/rc_ucr-hsjd.v6i4.26925

Rada, A. M., Hernández-Gómez, C., Restrepo, E., & Villegas, M. V. (2019). Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. *Biomédica*, *39*, 199–220. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351

Reyes-Chacón, J. A., Villacís-Acuña, J. E., Chicaiza-Alomoto, S., Satán-Salazar, C., Salas-Iglesias, S., Ushiña-Cueva, L., Villavicencio-Zambrano, F., Tamayo-Trujillo, R., Rivera-Villalba, R., Esparza-Sánchez, G., & Escalante-Vanoni, S. (2017). Inactivación del carbapenémico, un método alternativo para detectar carbapenemasa tipo KPC en Enterobacteriaceae. *Infectio*, *21*(4), 251–254. https://doi.org/10.22354/in.v21i4.688

Ríos-Muñiz, D., Cerna-Cortés, J. F., Morán-García, N., Meza-Segura, M., & Estrada-García, T. (2019). Escherichia coli enterotoxigénica y enteroagregativa: Prevalencia, patogénesis y modelos múridos. *Gaceta Medica de Mexico*, *155*(4), 410–416. https://doi.org/10.24875/GMM.19004716

Rivera-Jacinto, M., Rodríguez-Ulloa, C., Flores Clavo, R., Serquén López, L., & Arce Gil, Z. (2015). Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en Klebsiella spp y Escherichia coli aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *32*(4), 752. https://doi.org/10.17843/rpmesp.2015.324.1768

Rojo, V., Vázquez, P., Reyes, S., Fuertes, L. P., & Cervero, M. (2018). Risk factors and clinical evolution of carbapenemase-producing klebsiella pneumoniae infections in a university hospital in Spain. Case-control study. *Revista Espanola de Quimioterapia*, *31*(5), 427–434.

Rozales, F. P., Ribeiro, V. B., Magagnin, C. M., Pagano, M., Lutz, L., Falci, D. R., Machado, A., Barth, A. L., & Zavascki, A. P. (2014). Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, *25*,

79–81. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.01.005

Sacsaquispe-Contreras, R., & Bailón-Calderón, H. (2018). Identification of carbapenem-resistant genes in enterobacteria from Peruvian hospitals, 2013-2017. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, *35*(2), 259–264. https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.352.3829

Sakurada, A. (2016). Protocolo simplificado de Carba NP para la detección de carbapenemasas directamente de cultivos. *Revista Chilena de Infectologia*, *33*(1), 95. https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000100017

Sandle, T. (2016). Antibiotics and preservatives. *Pharmaceutical Microbiology*, 171–183. https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100022-9.00014-1

Schumacher, A., Vranken, T., Malhotra, A., Arts, J. J. C., & Habibovic, P. (2018). In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *37*(2), 187–208. https://doi.org/10.1007/s10096-017-3089-2

Stoesser, N., Sheppard, A. E., Shakya, M., Sthapit, B., Thorson, S., Giess, A., Kelly, D., Pollard, A. J., Peto, T. E. A., Walker, A. S., & Crook, D. W. (2014). Dynamics of MDR Enterobacter cloacae outbreaks in a neonatal unit in Nepal: Insights using wider sampling frames and next-generation sequencing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(4), 1008–1015. https://doi.org/10.1093/jac/dku521

Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *27*(2), 116–129. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001

Toledo Barrigas, Z. P. (2015). *Detección de β-lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas en bacilos Gram negativos aislados en pacientes del Hospital Manuel*

Ignacio Monteros Loja desde julio a noviembre del 2013. http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/46808/1/CD-61-TOLEDO BARRIGA.pdf

Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar, R., & Barrientos Díaz, L. (2017). Structural and physiological implications of bacterial cell in antibiotic resistance mechanisms. *International Journal of Morphology*, *35*(4), 1214–1223. https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000401214

Ugarte Silva, R. G., Olivo López, J. M., Corso, A., Pasteran, F., Albornoz, E., & Sahuanay Blácido, Z. P. (2018). Resistencia a colistín mediado por el gen mcr-1 identificado en cepas de Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae. Primeros reportes en el Perú. *Anales de La Facultad de Medicina*, *79*(3), 213. https://doi.org/10.15381/anales.v79i3.15313

Vázquez, E. G., Torres, A. H., Martínez, J. A. H., & Gómez, J. G. (2014). Infecciones por Salmonella y Yersinia. *Medicine (Spain)*, *11*(56), 3322–3326. https://doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70777-2

Villacrés, I., Alcocer, I., Zurita, J., & Rodríguez Riglos, M. (2017). Sensibilidad antimicrobiana y detección de genes de virulencia en aislados clínicos de Shigella spp. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, *36*(1–2), 67–76. https://doi.org/10.26807/remcb.v36i1-2.69

Wie, S. H. (2015). Clinical significance of providencia bacteremia or bacteriuria. *Korean Journal of Internal Medicine*, *30*(2), 167–169. https://doi.org/10.3904/kjim.2015.30.2.167

Yacarini-Martínez, A. E., Arriaga-Deza, E. V., Alvarado-Pineda, R. L., & Fupuy-Chung, J. A. (2019). Genes de virulencia de Escherichia coli detectados en muestras diarreicas de niños de la Región Lambayeque – Perú. *Horizonte Médico (Lima)*, *19*(1), 7–12. https://doi.org/10.24265/horizmed.2019.v19n1.02

11. Anexos

Anexo N°1

Solicitud de permiso al Líder del Laboratorio.

Loja, 19 de Agosto de 2020

Lic. Ángel Luzón

RESPONSABLE DEL LABORATORIO DEL HOSPITAL REGIONAL ISIDRO AYORA

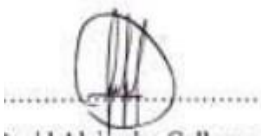
Cuidad. -

De mis consideraciones:

Yo, David Alejandro Gallegos Criollo, con cedula de identidad número 1104806532, estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja, por medio del presente me dirijo muy respetuosamente, deseándole un cordial saludo y éxitos en sus actividades diarias, a la vez solicito muy comedidamente por su intermedio se me autorice el permiso correspondiente para la realización de la parte práctica del proyecto de tesis titulado "***ENTEROBACTERIACEAE* RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS AISLADAS EN MUESTRAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS**", lo cual implica el uso de muestras, registros y datos con el fin de cumplir los objetivos planteados en la investigación.

En espera de ser atentado en la forma más favorable y oportuna, me anticipo en expresarle mis sentidos reconocimientos.

Atentamente.



David Alejandro Gallegos Criollo

ESTUDIANTE

Anexo N°2

Solicitud de petición de los Laboratorios de la Facultad de la Salud Humana

Universidad Nacional de Loja

Facultad de la Salud Humana

Loja, 29 de octubre del 2020

Dr.
Amable Bermeo
DECANO DE LA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

Ciudad.-

De nuestras consideraciones:

Nosotros, **Allison Loretho Ochoa Paz** con cédula número **1150352514**, **David Alejandro Gallegos Criollo** con cédula número **1104806532** y **Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz** con cédula número **1105097669**, estudiantes de 8vo ciclo de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja por medio del presente nos dirijimos a usted para solicitarle de la manera más comedida, se nos autorice el uso del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de la Salud Humana, para ejecutar nuestros proyectos de tesis aprobados: nombrados "**COLISTIN RESISTENCIA EN *ENTEROBACTERIACEAE* PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS AISLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS**", "***ENTEROBACTERIACEAE* RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS AISLADAS EN MUESTRAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS**" y **"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO RESISTENTE AISLADO DE PACIENTES HOSPITALIZADOS"** respectivamente, debemos mencionar que las cepas aisladas serán las mismas por ello realizamos esta solicitud en conjunto, los gastos en materiales e insumos serán financiados por nosotros.

Con la seguridad de ser atendidos favorablemente, le expresamos nuestros más sinceros agradecimientos.

Atentamente

Allison Ochoa

.....
Allison Loretho Ochoa Paz
C.I 1150352514

Daniela Ruiz

.....
Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz
C.I. 1105097669

.....
David Alejandro Gallegos Criollo
C.I. 1104806532

072 -57 1379 Ext. 102
Calle Manuel Monteros,
tras el Hospital Isidro Ayora · Loja - Ecuador

Universidad Nacional de Loja

Facultad de la Salud Humana

Of. Nro. 2021-0015-DFSH-UNL
Loja, 11 de enero de 2021

Señores
Allison Loretho Paz
David Alejandro Gallegos Criollo
Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz
ESTUDIANTES DEL OCTAVO CICLO DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO
Ciudad.-

De mi especial consideración:

Acuso recibo de comunicación de 29 de octubre de 2020, recibido en este Decanato el 08 de enero de 2021, relacionado con el uso del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de la Salud Humana.

Al respecto, y con base al protocolo PCR MILTIPLEX, en mi calidad de Autoridad Académica de esta Facultad, autorizo el uso del Laboratorio de Biología Molecular a partir del 18 de enero de 2021 para la ejecución de los proyectos de tesis denominados: **"COLISTIN RESISTENCIA EN ENTEROBACTERIOACEAE PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS AISLADAS DE PACIENTES A CARBAPENEMICOS AISLADAS EN MUESTRAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS", "ENTEROBACTERIACEAE RESISTENTES A CARBAPENEMICOS AISLADAS EN MUESTRAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS" y "CARACTERIZACION MOLECULAR DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINO RESISTENTE AISLADO DE PACIENTES HOSPITALIZADOS"**, teniendo en cuenta como requisito obligatorio el acudir al referido laboratorio con el Tutor o Director de Tesis.

Aprovecho la oportunidad para reiterar mi sentimiento de consideración y estima.

Atentamente,
EN LOS TESOROS DE LA SABIDURIA
ESTA LA GLORIFICACION DE LA VIDA.

SANTOS AMABLE BERMEO FLORES

Dr. Amable Bermeo Flores, Mg. Sc.
DECANO DE LA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

cc. Lcda. Nathaly Moscoso, Carrera Laboratorio Clínico, Archivo
ABF/yadycordova

Calle Manuel Monteros
tras el Hospital Isidro Ayora · Loja - Ecuador
072 -57 1379 Ext. 102

Anexo N°3

Rubrica de recolección de datos.

FORMATO DE RECOLECCION DE DATOS							
Bacterias resistentes aisladas en pacientes hospitalizados y mecanismo de resistencia							
CODIGO	EDAD	SEXO	TIPO DE MUESTRA	BACTERIA AISLADA	MECANISMO DE RESISTENCIA		
					BLEE	BLEE + CARBA	CARBA

Anexo N° 4

Preparación de agar sangre.

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO	**Revisado y autorizado:** Lic. Carmen Ullauri G., Mg.sc
		Fecha de elaboración: Abril – 2021
		Versión: 001
		Páginas: 2

Área: Laboratorio.

Responsable: Estudiante.

Objetivo: Preparara medio de cultivo Agar Sangre.

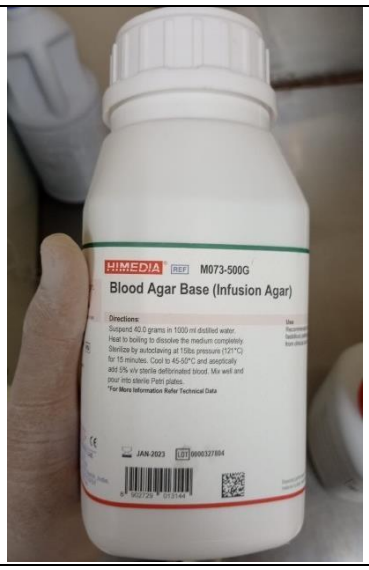
Nombre: Protocolo de Preparación de Agar Sangre.

Materiales y equipos:

- Agar.
- Matraz.
- Agua destilada.
- Estufa.
- Autoclave.
- Cajas Petri.
- Balanza.
- Guantes.
- Incubadora.
- Sangre.

Procedimiento:

- Pesar la cantidad necesaria de acuerdo a la proporción a preparar (40gr/1000mL)
- Sellar el matraz evitando la contaminación.
- Hervir la mezcla, llevar a punto de ebullición hasta que sea una solución.
- Colocar en la autoclave a 15 lbs de presión, 121°C, durante 15 minutos.
- Sacar y dejar reposar unos minutos hasta un lapso de temperatura de 40-50°C.
- Una vez reposado agregar 5% de sangre de acuerdo al volumen total, mezclar suavemente para evitar la hemolisis.
- Verter con cuidado en las cajas Petri, evitando la contaminación, que dará errores posteriores.
- Incubar las cajas Petri como control de calidad, para evitar crecimiento de microorganismos ajenos a la investigación.



Bibliografía:

HiMedia. (2018). *Blood Agar Base (Infusion Agar) M073*. 3. www.himedialabs.com

Anexo N° 5

Recuperación de las cepas de estudio.

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO	**Revisado y autorizado:** Lic. Carmen Ullauri G., Mg.sc
		Fecha de elaboración: Abril – 2021
		Versión: 001
		Páginas: 2

Área: Laboratorio de Microbiología.

Responsable: Estudiante.

Objetivo: Recuperar las cepas bacterianas de estudio.

Nombre: Protocolo de Recuperación de cepas de estudio.

Materiales y equipos:

- Cajas Petri con Agar sangre.
- Asas estériles.
- Cepas congeladas.
- Estufa de incubación.
- Rotuladores.

Procedimiento:

- Se llevo todas las cepas congeladas a -20°C a temperatura ambiente; a la vez se ambiento placas de agar Sangre y se rotulo respectivamente.
- Con una estéril se tomó una muestra de la cepa en la glicerina o de las perlas CRYOBANK las misma que se inoculo en la placa de agar Sangre.
- Se realizo la siembra por agotamiento para obtener colonias características y bien aisladas.
- Se colocaron en posición invertida en la estufa de incubación con temperaturas de 36˚C ± 1 ˚C por 24 horas.
- Luego del periodo de incubación se observó que los cultivos tengan las colonias características y crecimientos sin contaminaciones por otros microrganismos, en caso de contaminación desechar la placa y volver a aislar.
- Se recogió de Páginas 5 a 7 colonias del cultivo puro y se realizó una escala McFarland mayor a 1, en caldo infusión cerebro-corazón; y se incubo durante 24 horas a 37°C.

Bibliografía:

Belmonte, A., Nogueras, M., Contigiani, M., Gandini, V., & Sutich, E. (2008). Estudio de métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de Gardnerella vaginalis. *Bioquímica y Patología Clínica*, *72*(2), 15–18.

http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=65112134003
Solera, J. S., Microkit, T. D. L., Goyeneche, B. R., Calidad, D. C. De, Microkit, D. L., Mª, E., Pozuelo, S., Microkit, D. L. De, Roldán, S. M., Producción, D., Microkit, D. L., González, N. R., & Microkit, D. L. (2006). *Estudio sobre la recuperación de diferentes cepas microbianas de colección, mantenidas en congelación, en los diferentes tipos de CRIOTECA ® * MICROKIT*. 1018–1020.

Anexo N° 6

Extracción de ADN Bacteriano

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO	**Revisado y autorizado:** Lic. Carmen Ullauri G., Mg.sc
		Fecha de elaboración: Abril – 2021
		Versión: 001
		Páginas: 3

Área: Laboratorio de Biología Molecular.

Responsable: Estudiante.

Objetivo: Extraer el ADN bacteriano, de las cepas de estudio.

Nombre: Protocolo de Extracción de ADN Bacteriano

Materiales y equipos:

- Pipetas regulables (1uL, 10uL, 100uL, 1000uL).
- Puntas estériles.
- Microcentrífuga.
- Tubos ependorf.
- Vortex.
- Baño maría
- Cronometro.
- Recipiente de desechos (riesgo biológico y cortopunzantes).
- Refrigeradora.

Componentes del Kit

Reactivos:

- Proteinasa K, liofilizada 25 mg x 2 viales.
- RNasa A, liofilizada 24 mg x 2 viales
- Buffer TL 35 ml.
- Buffer GB 30 ml.
- Buffer WA1 40 ml.
- Buffer W2 80 ml.
- Buffer EA 25 ml.

Adicionales:

- Etanol absoluto
- Tubo de 1,5 ml o 2 ml (para la preparación de lisado)
- Solución salina tamponada con fosfato.
- Tris-HCl 20 mM (pH 8.0), EDTA sódico 2 mM y Triton al 1.2%

Preparación de reactivos

- **Proteinasa K, liofilizada:** Disolvemos en 1,25 ml de agua libre de nucleasas, y se almacenar a -20 °C para prolongar la actividad de la proteinasa K.
- **RNasa A, liofilizada:** Disolvemos en 600 µl de agua libre de nucleasas, almacenar a -20 ° C para prolongar la actividad de la RNasa A.
- **Buffer TL 35 ml:** Reactivo listo para su uso, mezclamos bien agitando antes de usar y su estabilidad es de 2 años almacenada a temperatura ambiente (TA, 15 - 25 °C).
- **Buffer GB 30 ml:** Reactivo listo para su uso; mezclamos bien GB Buffer agitando antes de usar, y su estabilidad es de 2 años a temperatura ambiente.

Nota: No se debe agregar la proteinasa K liofilizada directamente al tampón GB.

- **Buffer WA1 40 ml:** El tampón WA1 está en forma concentrada.

Antes de su primer uso agregamos 30 ml de etanol absoluto y su estabilidad es de 2 años cuando se almacena a temperatura ambiente.

- **Buffer W2 80 ml:** Reactivo listo para su uso y es estable durante 2 años cuando se almacena a temperatura ambiente.
- **Buffer EA 25 ml:** El Tris-HCl a 10 mM (pH 8,5), está listo para su uso y se almacena a temperatura ambiente.

Extracción de ADN de células bacterianas (bacterias gramnegativas)

1. Recogimos las células bacterianas anteriormente recuperadas e incubas por 24 horas en caldo infusiona cerebro-corazón; posteriormente centrifugamos a 8.000 rpm durante 5 min, y desechamos el sobrenadante. (Repetir este proceso en caso de que exista poca concentración).
2. Agregamos 180 µl de TL Buffer al sedimento celular recolectado y resuspendemos completamente usando un mezclador vórtex o pipeteando.
3. Transferimos la suspensión de las células bacterianas a un tubo de 1,5 ml o 2 ml.
4. Añadimos 20 µl de proteinasa K y 10 µl de RNasa A; y mezclamos mediante vórtex.
5. Posteriormente incubamos a 60 ° C durante 1 hora, en el baño maría.
6. Agregamos 200 µl de Buffer GB y mezclamos inmediatamente con un mezclador vórtex.
7. Añadimos 400 µl de etanol absoluto y mezclamos bien mediante pipeteo; giramos un poco hacia abajo para que las gotas se adhieran debajo de la tapa.
8. Transferimos el lisado al depósito superior del tubo de la columna de unión sin mojar el borde.
9. Cerramos el tubo y centrifugar a 8.000 rpm durante 1 min. Cerrar cada tubo de la columna de unión para evitar la formación de aerosoles durante la centrifugación.
10. En caso de que el lisado no haya pasado completamente a través de la columna después de la centrifugación, centrifugar nuevamente a una

velocidad mayor (> 10,000 rpm) hasta que el tubo de la columna de unión esté vacío.

11. Desechamos la solución del tubo de recolección y reutilice el tubo de recolección.
12. Añadimos 500 ul de tampón WA1 sin mojar el borde, cerramos el tubo y centrifugar a 8.000 rpm durante 1 min.
13. Desechamos la solución del tubo de recolección y reutilice el tubo de recolección.
14. Añadimos 500 µl de tampón W2 sin mojar el borde, cierre el tubo y centrifugue a 8.000 rpm durante 1 min.
15. Deseche la solución del tubo de recolección y reutilice el tubo de recolección.
16. Centrifugamos una vez más a 13.000 rpm durante 1 minuto para eliminar el etanol por completo y verificamos que no haya gotas adheridas al fondo del tubo de la columna de unión, ya que el W2 residual en el tubo de la columna de unión puede causar problemas en aplicaciones posteriores.
17. Transferimos el tubo de la columna de unión a un tubo nuevo de 1,5 ml para elución, agregamos 200 µl de tampón EA al tubo de la columna de unión y esperamos al menos 1 minuto a temperatura ambiente hasta que el EA se absorba completamente en la fibra de vidrio del tubo de la columna de unión.

Para aumentar el rendimiento de ADN, debe esperar 5 minutos después de agregar el tampón EA.

El volumen de EA añadido se puede ajustar de 50 a 200 µl. Un volumen más pequeño dará como resultado una solución más concentrada, pero el rendimiento total puede reducirse.

18. Centrifugamos a 8.000 rpm durante 1 minuto para eluir.

Para obtener un rendimiento mejorado, eluya la muestra dos veces.

El ADN genómico eluido es estable y puede usarse directamente o almacenarse.

Almacenamos a -20 °C para análisis posterior.

Almacenamos los reactivos igualmente a -20°C para análisis a largo plazo y de 2 – 4°C para análisis posteriores. (Corporation, 2018)

Bibliografía.

Corporation, B. (2018). *User ' s Guide AccuPrep ® Genomic DNA Extraction Kit*.

Anexo N° 7

PCR convencional

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO	**Revisado y autorizado:** Lic. Carmen Ullauri G., Mg.sc
		Fecha de elaboración: Abril – 2021
		Versión: 001
		Páginas: 4

Área: Laboratorio de Biología Molecular.

Responsable: Estudiante.

Objetivo: Realizar PCR convencional a las cepas de estudio.

Nombre: Protocolo de PCR convencional.

Materiales y equipos:

- ADN bacteriano extraído anteriormente.
- Termociclador.
- Mastermix
- Primers.
- Pipetas regulables.
- Puntas estériles.
- Tubos ependorf pequeños.

Preparación de Primers.

Los primers adquiridos vinieron liofilizados y fueron los siguientes:

PRIMER	SECUENCIA	GEN	BP
IMP -F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	blaIMP	232
IMP-R	GGTTTAAYAAAACAACCACC		
VIM-F	GATGGTGTTTGGTCGCATA	blaVIM	390
VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG		
OXA-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	blaOXA-48	438
OXA-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG		
NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	bla-NDM	621
NMD-R	CGGAATGGCTCATCACGATC		
KPC-F	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	bla-KPC	798
KPC-R	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG		232

La preparación de los primers se dio siguiendo los pasos:

1. Colocamos 250uL de agua libre de nucleasas en cada primers liofilizado y centrifugamos. (100pmol/uL)

2. De estos primers que están a una concentración de 100pmol/uL, necesitamos una concentración de tan solo 10pmol/uL, para usar como primer de trabajo.
3. Realizamos una dilución en tubos ependorf estériles, de 1:9, siendo así 1 parte de primer y 9 partes de agua libre de nucleasas. (10uL de primers + 90uL de agua).
4. Una vez realizado la dilución, preparamos alícuotas para almacenarlas y no perder si estabilidad.

Preparación del MasterMix:

Una vez listos los reactivos de trabajo y las extracciones de ADN de cada cepa, se realizó la master mix para los diferentes protocolos de trabajo y posteriormente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

- Gen blaKPC

REACTIVO O PRODUCTO	VOLUMEN POR CADA CEPA (uL)	VOLUMEN CON EL TOTAL DE CEPAS (uL)
Master Mix	10	320
KPC rev	1	32
KPC fow	1	32
Agua	7	224
Muestra	1	32
	20	640

- Gen bla NDM

REACTIVO O PRODUCTO	VOLUMEN POR CADA CEPA (uL)	VOLUMEN CON EL TOTAL DE CEPAS (uL)
Master Mix	10	320
NDM rev	1	32
NDM fow	1	32
Agua	7	224
Muestra	1	32
	20	640

- Gen blaOXA-48

REACTIVO O PRODUCTO	VOLUMEN POR CADA CEPA (uL)	VOLUMEN CON EL TOTAL DE CEPAS (uL)

Master Mix	10	320
OXA-48 rev	1	32
OXA-48 fow	1	32
Agua	7	224
Muestra	1	32
	20	640

- Genes blaIMP y bla VIM

REACTIVO O PRODUCTO	VOLUMEN POR CADA CEPA (uL)	VOLUMEN CON EL TOTAL DE CEPAS (uL)
Master Mix	10	320
IMP rev	1	32
IMP fow	1	32
VIM rev	1	32
VIM fow	1	32
Agua	5	160
Muestra	1	32
	20	640

La amplificación del producto se realizó con los siguientes ciclos y tiempos, reflejados en el esquema:

PCR CONVENCIONAL/TERMOCICLADOR	
PASOS	**ESPECIFICACIONES**
1ero	A 95°C por 5 min
2do	A 95°C por 20 seg
3ero	A 55°C por 20 seg
4to	A 72°C por 50 seg. y volver al 2do paso y repetir 34 ciclos.
5to	A 75°C por 5 min

6to	A 4°C por tiempo indefinido	

Bibliografía:

Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *70*(1), 119–123. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002

Anexo N° 8

Electroforesis en Gel agarosa.

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO	**Revisado y autorizado:** Lic. Carmen Ullauri G., Mg.sc
		Fecha de elaboración: Abril – 2021
		Versión: 001
		Páginas: 2

Área: Laboratorio de Biología Molecular.

Responsable: Estudiante.

Objetivo: Realizar la electroforesis en gel de agarosa de las muestras realizadas la PCR.

Nombre: Protocolo de Electroforesis en gel de agarosa.

Materiales y equipos:

- Estufa o microondas.
- Matraz.
- Espátula.
- Agarosa.
- Cámara de electroforesis.
- Balanza.
- Solución TBE.
- Bromuro de etidio.
- Transiluminador.
- Cámara de luz UV.
- Computadora.

Procedimiento:

Preparación del Gel Agarosa para la corrida (1.5 %)

- Se pesaron 0.75 gr de agarosa liofilizada en la balanza analítica, se colocó en un matraz y se diluyó con 150 ml de TBE con concentración de 1X.
- Colocamos en el calentador hasta que se disolvió completamente presentando aspecto transparente.
- Dejamos enfriar un poco y luego colocamos 250 µl de Bromuro de etidio y se mezcló.
- Posteriormente se vertió el gel en la cámara con peine para su gelificación.
- Una vez gelificado se retiró el peine y se le colocó TBE 1X en los lados de la cámara, hasta cubrir el gel.

Electroforesis en Gel de Agarosa

- Una vez concluida la PCR, se tomó el producto amplificado y se colocó en los pocillos del gel de agarosa, con una pipeta teniendo cuidado de no colocar burbujas ni romper el gel.
- Se colocaron las muestras en cada posición en el gel según el protocolo de corrida, incluyendo el marcador de peso molecular y los controles positivo que correspondían a cepas de las cuales ya se habían realizado estudios y estaban verificadas, y negativo para el cual se utilizó agua libre de ADNsa que validaron cada corrida.

Corrida en el gel de agarosa (1.5%)

- Colocadas las muestras, controles y marcador, se cerró la cámara y se procedió a conectar a una fuente de poder de acuerdo al tiempo y potencia indicado.

Concentración de agarosa	Voltaje	Tiempo	Producto cargado
1,5	120 V	1H30	5uL

- Corridas las muestras se colocó el gel de agarosa sobre el Transiluminador y la cámara de luz UV y se analizaron los resultados obtenidos, se tomaron fotos de los productos amplificados para su debido registro. (Poirel et al., 2011)

Bibliografía:

Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *70*(1), 119–123. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002

Anexo N°9

Rubrica de recolección de resultados.

Código	Edad	Sexo	Tipo de muestra	Infección causada	Área de hospitalización.	Bacteria aislada	Mecanismo de resistencia	Gen que produce carbapenemasas

Anexo N°10

Esquemas de corridas electroforéticas.

CORRIDA ELECTROFORETICA DE KPC																					
#POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
	MPB	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11 Y CP	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	CN
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
#POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15						
	MPN	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32	CP						
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						

	CORRIDA ELECTROFORETICA DE IMP + VIM																				
#POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
	MPB	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M1	CP
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
#POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15						
	MPN	M32	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	CN						
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-						

CORRIDA ELECTROFORETICA DE NDM																				
#POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	MPB	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16				
	MPN	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32	CN	CP				
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+				

CORRIDA ELECTROFORETICA DE OXA-48																					
#POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
	MPB	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	CP
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
#POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15						
	MPN	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32	CN						
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						

Anexo N°11

Cepas productoras de carbapenemasas a trabajar.

# DE IFENTIFICACION	CODIGO	BACTERIA	AREA DE HOSPITALIZACION
1	191119203	K. PNEUMONIAE	CIR
2	191103143	K. PNEUMONIAE	MED
3	190929083	K. PNEUMONIAE	MED
4	191025278	K. PNEUMONIAE	MED
5	190913285	E. COLI	U. QUEMADOS
6	191018174	C. FREUNDI	UCI
7	190521396	K. PNEUMONIAE	CIR
8	190411302	M. MORGANNI	CIR
9	190729321	K. PNEUMONIAE	NEO
10	190430328	K. PNEUMONIAE	MED
11	190708020	K. PNEUMONIAE	MED
12	190518066	E. CLOACAE	MED
13	190731027	E. COLI	UCI
14	190426443	K. PNEUMONIAE	MED
15	190605274	K. AEROGENES	UCI
16	190607156	K. PNEUMONIAE	CIR
17	190907021	K. PNEUMONIAE	CIR
18	190809236	K. PNEUMONIAE	UCI
19	190720096	K. OXYTOCA	NEO
20	190628406	K. PNEUMONIAE	CIR
21	190427026	K. PNEUMONIAE	MED
22	190521366	K. PNEUMONIAE	CIR
23	190414068	K. PNEUMONIAE	NEO
24	190605221	K. PNEUMONIAE	MED
25	190508371	K. OXYTOCA	MED
26	190815111	K. PNEUMONIAE	UCI
27	191227340	K. PNEUMONIAE	UCI
28	190610034	K. PNEUMONIAE	UCI
29	190520354	K. PNEUMONIAE	MED
30	190606070	K. PNEUMONIAE	MED
31	190516248	K. PNEUMONIAE	UCI
32	190722260	K. PNEUMONIAE	NEO

Anexo N°12

Información obtenida de la base de datos del HIAL

CODIGO	C.I / HISTORIA CLINICA	SEX	EDAD	SERVICIO	48HORAS SI	NO	
190521366 X	0400027993 1	H	94	CIR	✓		
190729321 X	1151423546	H	12 D	NEO	✓		
190430328 X	1717222838	M	39	E. CLINICA	✓	✓	
190516248 X	0700714389	M	69	UCI	✓	✓	
190720096 X	1150878492-2	M	18 D	NEO	✓		
190508371 X	1900856277	M	78	MED	✓	✓	
190426443 X	1100500121	M	64	E. CLINICA	✓	✓	
190731027 X	1101766465	H	61	UCI	✓		
190715197	0702649658	M	49	CIR	✓		
190519104	0400279931	H	94	CIR	✓	✓	
190607156 X	0702649658	M	49	CIR	✓		
190613272	1102598479	H	53	UCI	—	—	
190605274 X	1100250040	H	80	UCI	—	—	N
190520354 X	1104196533	M	83	E. CLINICA	✓	✓	
190414068 X	0705145597-1	H	21 D	NEO	✓		
190415191	1151394366	H	1M	PED	—	—	
190610034 X	1900229348	H	51	UCI	✓	✓	
190722200	0702649658	M	49	CIR	✓		
190116912					—		N
190708020 X	1103969521	M	40	MED CLI	✓		

CODIGO	C.I / HISTORIA CLINICA	SEX	EDAD	SERVICIO	48HORAS SI	NO
190801329						
190521396 X	0400279931	H	94	CIR	✓	✓
190506271	110227590	M	89	UCI	—	
190427026 X	110050021	M	64	E. CLINICA	✓	✓
190610250	1900581115	M	30	Emergencia	—	
190521365	0400279931	H	94	CIR	✓	
190518066 X	1104531585	M	24	HEMODIAL	✓	
190718323	1100077666	H	89	CIR		✓
190605221 X	1100250040	H	80	MED CLINICA	✓	✓
190411302 X	1950099166	H	16	CIR	✓	✓
190807190	26327584-1	H	50	NEO	—	
190807192					—	
190809236 X	1103382022	H	44	UCI	✓	✓
190606070 X	1101918033	H	71	HEMODIAL	✓	✓
190722260 X	1900750348-6	H	80	NEO	✓	
190628406 X	1101093340	H	67	CIR	✓	
190929083 X	1100638152	M	79	MED CLINICA	✓	
191018174 X	1102029467	H	65	UCI	✓	
191021292	1102029467	H	65	MED CLIN	✓	
190025278 X	1101029344	H	81	MED CLIN	✓	

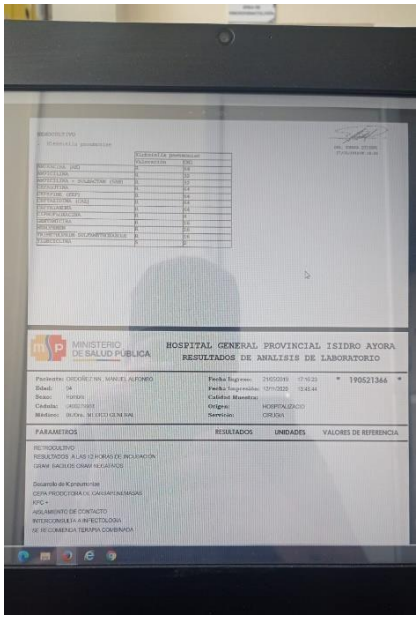
CODIGO	C.I / HISTORIA CLINICA	SEX	EDAD	SERVICIO	48HORAS SI	NO
191227340 X	5281671	M	70	UCI	V	
191119203 X	1101967006	H	73	CIR	V	
191103143 X	1102035142	M	60	MED CLINICA	✓	
190426443					—	
190815113	1101766465	H	61	UCI	V	
190815111 X	1106000829	H	21	UCI	V	
190907021 X	1103528707	H	41	CIR	✓	V
190917305					—	
190925260	1104068117-3	M	24D	NEO	—	
190917078	1101677233	H	66	CIR	—	
190913285 X	1105260168	H	25	U. QUEM.	✓	

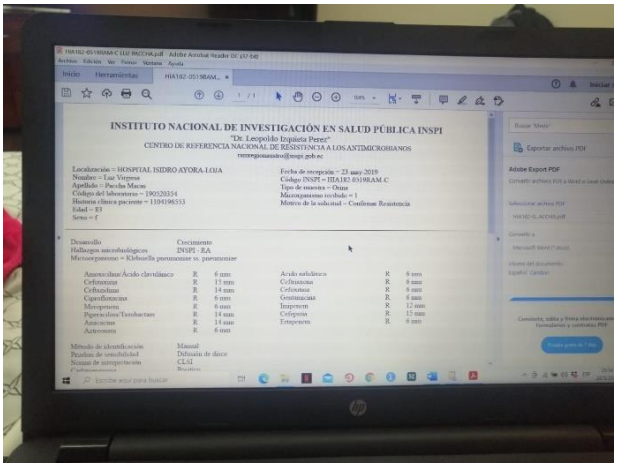
	1	9	1	1	9	2	0	3	x		G	P	KPN		1	
	1	9	1	1	0	3	1	4	3	x	G	P	KPN		2	
	1	9	0	9	2	9	0	8	3	x	G	P	KPN		3	
	1	9	1	0	2	5	2	7	8	x	G	P	KPN		4	
	1	9	0	9	1	3	2	8	5	x	G	P	COLI		5	
	1	9	1	0	1	8	1	7	4	x	G	P	C. FREUNDII		6	
	1	9	0	5	2	1	3	9	6	x	P	P	KPN		7	•
	1	9	0	4	1	1	3	0	2	x	P	P	M. MORGANNI		8	
	1	9	0	7	2	9	3	2	1	x	P	P	KPN		9	
	1	9	0	4	3	0	3	2	8	x	P	P	KPN		10	
	1	9	0	7	0	8	0	2	0	x	P	P	KPN		11	
	1	9	0	5	1	8	0	6	6	x	P	P	E. CLOACAE		12	•
	1	9	0	7	3	1	0	2	7	x	P	P	COLI		13	
	1	9	0	4	2	6	4	4	3	x	P	P	KPN		14	
	1	9	0	6	0	5	2	7	4	x	P	P	K. AEROGENES.		15	
	1	9	0	6	0	7	1	5	6	x	P	P	KPN		16	
	1	9	0	9	0	7	0	2	1	x	P	P	KPN		17	
	1	9	0	8	0	9	2	3	6	x	P	P	KPN		18	
	1	9	0	7	2	0	0	9	6	x	P	P	K. OXYTOCA		19	
	1	9	0	6	2	8	4	0	6	x	P	P	KPN		20	
	1	9	0	4	2	7	0	2	6	x	P	P	KPN		21	
	1	9	0	5	2	1	3	6	6	x	P	P	KPN		22	
	1	9	0	4	1	4	0	6	8	x	P	P	KPN		23	
	1	9	0	6	0	5	2	2	1	x	P	P	KPN		24	•
~~Fatti~~	1	9	0	5	0	8	3	7	1	A	x	P	P	K. OXYTOCA	25	
	1	9	0	8	1	5	1	1	1	A	x	P	D	KPN	26	
	1	9	1	2	2	7	3	4	0	A				KPN	27	
	1	9	0	6	1	0	0	3	4	x		P	P	KPN	28	
	1	9	0	5	2	0	3	5	4	x		P	P	KPN	29	•
	1	9	0	6	0	6	0	7	0	x		P	P	KPN	30	
	1	9	0	5	1	6	2	4	8	x		P	P	KPN	31	
	1	9	0	7	2	2	2	6	0	x		P	P	KPN	32	

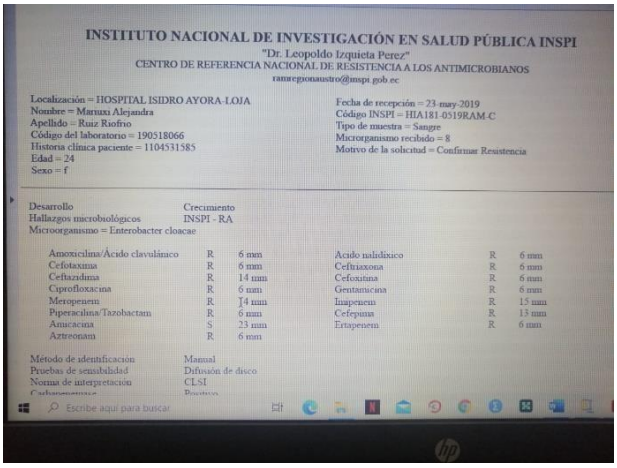
Anexo N°13

Evidencia fotográfica.

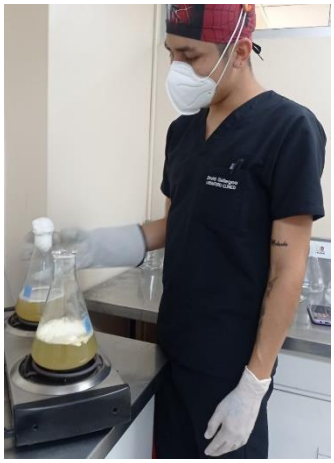
Obtención de información de la base de datos del HIAL

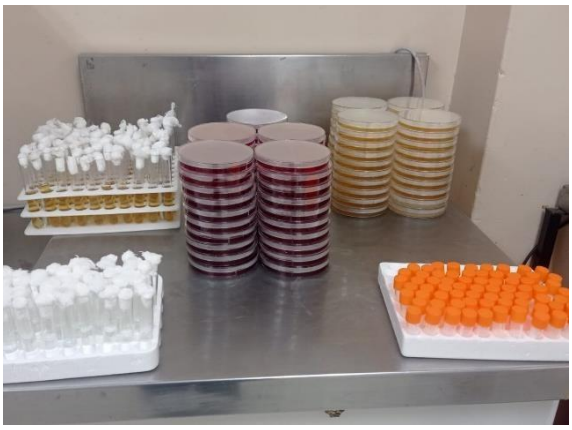




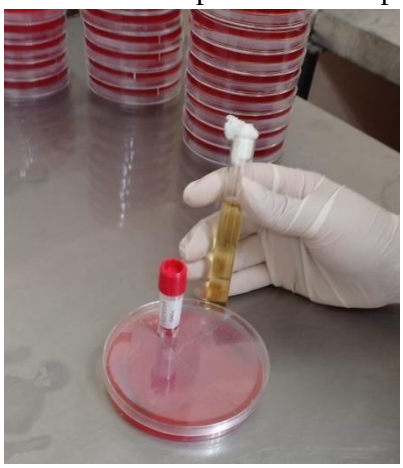
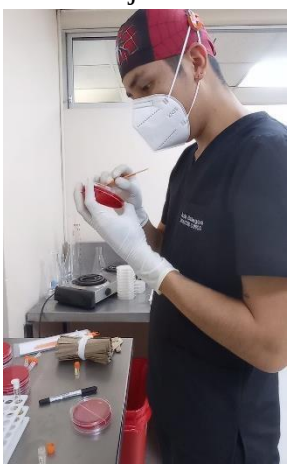


Preparación de material





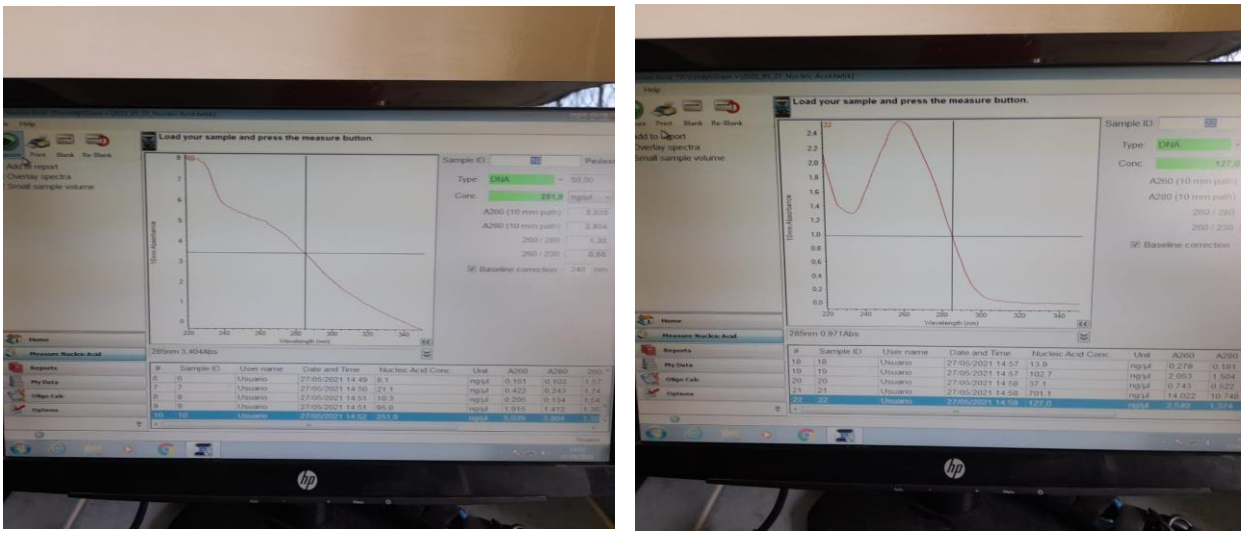
Recuperacion de cepas de trabajo.

Equipos de Laboratorio.

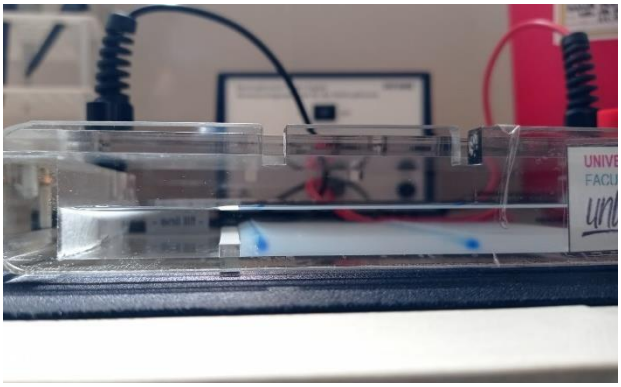
Extraccion de AND bacteriando (Gram Negativos)

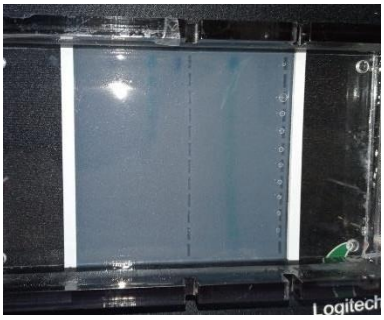
Lecturas en el NanoDrop



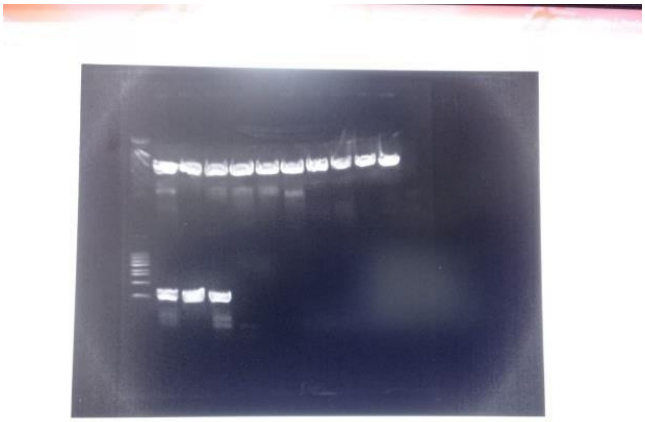
Proceso de amplificacion mediante PCR convencional

Proceso de electroforesis en Gel de agarosa





Primeras corridas electroforeticas.



Anexo N°14

Certificado de traducción.

Loja, 25 de Octubre del 2021

David Andrés Araujo Palacios

TRADUCTOR E INTÉRPRETE DE IDIOMAS(INGLÉS-ESPAÑOL-INGLÉS)

CERTIFICO:

Que he realizado la traducción de español a ingles del resumen del Artículo Científico y Resumen derivados de la tesis denominada **"ENTEROBACTERIACEAE RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS AISLADAS EN MUESTRAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS"** De autoría del **Sr. David Alejandro Gallegos Criollo** portador de la cédula de identidad número **1104806532**, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, la misma que se encuentra bajo la dirección de la Mg.sc. Carmen Ullauri G, previo a la obtención del título de Licenciado en Laboratorio Clìnico.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad, facultando al interesado hacer uso del presente en lo que considere conveniente.

David A. Araujo P.
TRADUCTOR
3104-2021-252098
CI:1104521545

David Andrés Araujo Palacios
Senescyt: MDT-3104-CCL-252098

Ofc. N° 435 CLC-FSH-UNL
Loja, 26 de agosto de 2020

Lic.
Carmen Ullauri González. Mg. Sc.
DOCENTE CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO FSH - UNL
Ciudad. -

De mi consideración:

Es grato dirigirme a su usted con el propósito de expresarle un cordial saludo, a la vez que me permito solicitarle muy comedidamente se digne analizar y emitir informe de estructura y coherencia, de acuerdo a la normativa vigente; para el proyecto de tesis con el tema: "**Enterobacteriaceae resistentes a carbapenémicos aisladas en muestras de pacientes hospitalizados"** de autoría del Sr. estudiante David Alejandro Gallegos Criollo, estudiante del VII ciclo de la Carrera de Laboratorio Clínico Régimen 2009.

En la seguridad de merecer su favorable atención, le antelo mi agradecimiento

Atentamente,

Firmado electrónicamente por:
SANDRA
ELIZABETH
FREIRE CUESTA

Dra. Sandra Freire Cuesta,
GESTORA ACADÉMICA DE LA CARRERA
DE LABORATORIO CLÍNICO

Loja, septiembre 01 de 2020

Sra. Dra.
Sandra Freire Cuesta, Esp.
GESTORA ACADÉMICA DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO
Ciudad. -

De mi consideración:

Después de saludar su eficiente gestión a la cabeza de nuestra Carrera, me permito dar contestación al oficio Nro. 435 -CLC-FSH-UNL, de fecha 26 de agosto de 2020, en el que se pide se emita informe de estructura y coherencia del trabajo de Proyecto de Tesis denominado: "*Enterobacteriaceae* productora de carbapenemasas aisladas en pacientes hospitalizados" de autoría de la Sr. David Gallegos Criollo, estudiante del séptimo ciclo de la Carrera de Laboratorio Clínico.

En relación al documento revisado, me permito indicar lo siguiente:

- El trabajo contiene todos los elementos de la estructura indicados en el Art. 135 del Reglamento de Régimen Académico vigente de la Universidad Nacional de Loja.
- Los elementos incluidos y objetivos de investigación son viables y guardan coherencia entre ellos.

Por lo antes expuesto considero que, el documento guarda Estructura y coherencia por lo que recomiendo su aprobación como trabajo de titulación.

Segura de la favorable atención a la presente antelo mis agradecimientos.

Atentamente,

Firmado electrónicamente por:
CARMEN ALEJANDRA ULLAURI GONZALEZ

Lcda. Carmen Ullauri González, Mg.sc
DOCENTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

Ofic. Nro. 004 - CLC-FSH-UNL
Loja, 05 de enero de 2021.

Licenciada
Carmen Ullauri González
DOCENTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO
Ciudad. –

De mi consideración:

Por el presente y dando cumplimiento a lo dispuesto en el "Capítulo II del Proyecto de Tesis, Artículos 133, y 134 del Reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja, aprobado el 7 de julio de 2009" una vez que ha cumplido con todos los requisitos y considerando que el proyecto de tesis fue aprobado; me permito hacerle conocer que esta Dirección le ha designado Directora del trabajo de Investigación, titulado **"*ENTEROBACTERIACEAE* RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS AISLADAS EN MUESTRAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS"**, de autoría del Sr. David Alejandro Gallegos Criollo**,** estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico

Aprovecho la oportunidad para expresarle mi agradecimiento por su e colaboración

Atentamente,

Firmado electrónicamente por:
SANDRA ELIZABETH FREIRE CUESTA

Dra. Sandra Freire Cuesta
GESTORA ACADÉMICA DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

c.c. Sr. David Gallegos Criollo
Archivo

SFC/ala.

Referente a/ memorando *N*• 322

Conocido el Informe emitido por la Dra. Sonia Paulina Vallejo Maldonado, Secretaria Abogada de la Facultad de la Salud Humana, mediante memorando N°. 321—SG—FSH-UNL., de fecha 07 de diciembre del 2021, en el que se hace constar que el/la peticionario/a ha presentado la documentacion exigida para el efecto, consecuentemente se declara la APTITUD LEGAL DE GRADO, al/a la senor/ita: GALLEGOS CRIOLLO DAVID ALEJANDRO, con cédula N°. 110480653-2, egresado/a de la Carrera de Laboratorio Clfnico, de la Facultad de la Salud Humana, de la Universidad Nacional de Loja, previo a la obtencion del Titulo de Licenciado/a en Laboratorio Clinico.

Loja, a 07 de diciembre de 2021.

Atentamente,
EN LOS TESOROS DE LA SABIDURIA
ESTA LA GLORIFICACION DE LA VIDA

SANTOS AMABLB
BBRMBO F LORB S

Dr. Sa"ntos Amable Bermeo Flores, Mg. Sc.
DECANO DE LA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

SABF/bmmc.
C. C.- Gallegos Criollo David Alejandro; Secretaria de la Direccion de Carrera; y, Archivo de la Secretaria General, de la FSH.

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

ACTA DE SESIÓN RESERVADA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

En la ciudad de Loja, a los dieciséis días del mes de diciembre del dos mil veintiuno siendo las 08h00, se reúne el Tribunal de grado para la **Revisión y Calificación** de la Tesis titulada**: "ENTEROBACTERIACEAE RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS AISLADAS EN MUESTRAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS",** de autoría del Sr. **GALLEGOS CRIOLLO DAVID ALEJANDRO** , egresado de la Carrera de Laboratorio Clínico, el Tribunal lo preside la Lic. María del Cisne Loján González y lo integran las docentes señoras: Bq. María del Cisne Luzuriaga Moncada y Lic. Iliana Alicia Delgado**,** quienes calificaron la tesis en forma individual y secreta, tomando en cuenta los siguientes aspectos: el contenido y la presentación de la tesis considerando: la estructura del documento, coherencia entre sus elementos, calidad de los procesos de trabajo, el cumplimiento de los objetivos, la calidad de los resultados, conclusiones y recomendaciones, la fundamentación científico-técnica de la discusión, los efectos e impactos potenciales, la presentación y claridad de la redacción; conforme lo establece el Art. 156 Reglamento Régimen Académico, obteniendo las calificaciones que a continuación se detallan: **9/10, 9 /10, 9/10**; Siendo el cómputo total de **9 /10** (nueve sobre diez), equivalente a **SOBRESALIENTE.**

Suscriben la presente acta:

Firmado electrónicamente por:
MARIA DEL CISNE LOJAN GONZALEZ

Lic. María del Cisne Luján González ……
PRESIDENTA

Bq. Maira del Cisne Luzuriaga Moncada …
Firmado electrónicamente por:
MARIA DEL CISNE LUZURIAGA ONCADA M
……
VOCAL

ILIANA ALICIA DELGADO
Firmado digitalmente por ILIANA ALICIA DELGADO
Fecha: 2022.01.11 17:36:12 -05'00'

Lic. Iliana Alicia Delgado ……
VOCAL

Firmado electrónicamente por:
SONIA PAULINA VALLEJO MALDONADO

Dra. Sonia Paulina Vallejo Maldonado
SECRETARIA ABOGADA