



Universidad Nacional de Loja

FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

Título

Colistin resistencia en Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados

Tesis previa a la obtención del Título de Licenciada en Laboratorio Clínico

Autora:

Allison Loretho Ochoa Paz

Directora:

Lcda. Carmen Alejandra Ullauri Mg. Sc.

1859

LOJA – ECUADOR

2021

Certificación

CERTIFICA:

Que he revisado y orientado el proceso de la elaboración de trabajo titulado:

“COLISTIN RESISTENCIA EN ENTEROBACTERIACEAE PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS AISLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS” de autoría de la Sra. Allison Loretho Ochoa Paz, previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico, trabajo que ha sido desarrollado, corregido y orientado bajo mi dirección y cumple con lo estipulado en el Reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja vigente.

Loja, 11 de noviembre, 2021

Atentamente,



Firmado electrónicamente por:
**CARMEN ALEJANDRA
ULLAURI GONZALEZ**

Leda. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

Autoría

Yo Allison Loretho Ochoa Paz con CI. 1150352514 declaro ser autor del presente trabajo de tesis titulado **“Colistin resistencia en Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados”**, como requisito para obtener el título de Licenciada 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.

Adicional 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, 16 de febrero 2022.

Firma:

Autor: Allison Loretho Ochoa Paz

Cedula: 1150352514

Correo Electrónico: allison.ochoa@unl.edu.ec / allisonochoa254@gmail.com

Teléfono: 0990470061

Carta de autorización

Yo, **Allison Loretho Ochoa Paz** declaro ser autora de la Tesis titulada “**Colistin resistencia en Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados**”, como requisito para optar al grado de **Licenciada 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 la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo 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 que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 16 días del mes de febrero del 2022, firma la autora.

Firma:

Autora: Allison Loretho Ochoa Paz

Cedula de identidad: 1150352514

Dirección: Las Pitas calles Eduardo Mora Moreno 182 A-18 y José Tabara

Correo Electrónico: allison.ochoa@unl.edu.ec /allisonochoa254@gmail.com

Celular: 0990470061

DATOS COMPLEMENTARIOS

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

Tribunal de Grado:

Presidenta: Lic. Gladys Margoth Jumbo Chuquimarca, Mg. Sc.

Miembro del Tribunal: Lic. Iliana Alicia Delgado, Mg. Sc.

Miembro del Tribunal: Bioquim. Luisa Ivonne Celi Carrión, Mg. Sc

Dedicatoria

Dedico mi tesis primeramente a Dios, por darme la oportunidad de cumplir con otro reto en mi vida 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; mis padres, por su esmero y esfuerzo por formarme con valores sólidos y con mucho cariño. A mis hermanas y amigas por siempre estar presentes apoyándome.

Allison Loretho Ochoa Paz

Agradecimiento

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

A mi familia, por estar apoyándome siempre y brindarme consejos para seguir adelante. A mis padres en especial por brindarme siempre muy buenos valores y ser mi razón de seguir adelante, mis hermanas por su cariño y palabras de motivación.

A la Universidad Nacional de Loja, por la oportunidad estudiar en tan prestigiosa institución para alcanzar mi objetivo.

A mi directora de tesis Lic. Carmen Ullauri, por su dedicación y por ayudarme con su conocimiento en el desarrollo de mi tesis.

Al prestigioso Hospital Isidro Ayora, por su ayuda y colaboración en la recolección de datos de las muestras.

Allison Loretho Ochoa Paz

ÍNDICE

Certificación	II
Autoría	III
Carta de autorización	IV
Dedicatoria	VI
Agradecimiento	VII
Índice	VIII
1. Título	2
2. Resumen - Abstract	3
3. Introducción	5
4. Marco teórico	7
4.1 Bacterias	7
4.1 Enterobacterias	7
4.2. Características Microbiológicas	8
4.3 Clasificación	9
4.3.1 <i>Escherichia coli</i> spp	9
4.3.2 <i>Shigella</i> spp	10
4.3.3 <i>Salmonella</i> spp.	10

4.3.4 <i>Klebsiella spp.</i>	11
4.3.5 <i>Yersinia spp</i>	12
4.3.6 <i>Enterobacter spp</i>	13
4.3.7 <i>Serratia spp</i>	13
4.3.8 <i>Proteus spp</i>	14
4.3.9 <i>Moraxella spp</i>	14
4.3.10 <i>Providencia spp</i>	15
4.4 Mecanismos de resistencia en Enterobacteriaceae	15
4.4.1 B-lactamasas	15
4.4.2 B-lactamasas tipo AmpC	15
4.4.3 B-lactamasas de espectro extendido (BLEE).	16
4.4.4 B-lactamasas de tipo carbapenemasas.	17
4.4.5 Resistencia a Quinolonas	18
4.4.6 Resistencia a Aminoglicosidos	18
4.5 Resistencia cromosómica a la colistina	18
4.6 Resistencia plasmídica a la colistina	19
4.7 Gen <i>mcr-1</i>	20
4.8 Gen <i>mcr-2</i>	20
4.9 Gen <i>mcr-3</i>	20
4.10 Gen <i>mcr-4</i>	20

4.11 Gen <i>mcr-5</i>	21
4.12 Técnicas de identificación de resistencia a las polimixinas	21
4.12.1 Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria.	21
4.12.2 Prueba Rápida Polimixina-NP	22
4.14.3 Microdilución en caldo	22
4.14.5 Detección molecular	22
5. Metodología	24
5.1 Tipo de estudio	24
5.2 Área de estudio	24
5.3 Universo y muestra	25
5.4 Criterios de Inclusión	25
5.5 Criterios de Exclusión	25
5.6 Materiales y Metodos	25
5.6.1 Fase Pre- analítica	25
5.6.2 Fase Analítica	26
5.6.3 Fase Pos-analítica	26
5.7 Tabulación y presentación de resultados	26
5.8 Consideraciones éticas	26

6. Resultados	27
7. Discusión	31
8. Conclusiones	34
9. Recomendaciones	35
10. Bibliografía	36
11. Anexos	44
11.1 Anexo 1: Autorización para la ejecución del estudio en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Loja	44
11.2 Anexo 2: Ficha de recolección de datos del registro de muestras tomadas en el Hospital Isidro Ayora	45
11.3 Anexo 3: Protocolo Reconstitución de cepas	46
11.4 Anexo 4: Protocolo de extracción de ADN de cepas aisladas	47
11.5 Anexo 5: Protocolo de procesamiento molecular por reacción en cadena de la polimerasa convencional	49
11.6 Anexo 6: Secuenciación de los primers utilizados para la identificación de los 5 genes de <i>mcr</i>	51

11.7 Anexo 7: Base de datos según la bacteria aislada y el gen de resistencia identificado	52
11.8 Anexo 8: Evidencias Fotográficas	53
11.9 Anexo 9: Certificado de Traducción	57

Índice de Tablas

Tabla N° 1.- <i>Enterobacteriaceae</i> productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital General Isidro Ayora, Loja. 2019	27
Tabla N° 2.- Gen <i>mcr</i> y variantes en bacterias productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados.	28
Tabla N° 3.- Resistencia a colistín identificada por métodos moleculares y el resultado reportado por microdilución en caldo.	29

1. Título

Colistin resistencia en Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados

2. Resumen

Los mecanismos de resistencia adquirida y transmisible consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos, algunas bacterias pueden desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos. Algunos factores como la automedicación, la prescripción innecesaria, el no cumplimiento de los tratamientos prescritos y el consumo de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal predisponen a la aparición de súper bacterias capaces de expresar resistencia a múltiples familias de fármacos. Por ello se realizó el presente trabajo para identificar los genes de resistencia a colistina en cepas productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados en un hospital de segundo nivel de complejidad durante el 2019, fue un estudio de enfoque cuantitativo con diseño descriptivo-transversal en el que se trabajó con 32 cepas de Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas a las que se les realizó el tamizaje de los genes *mcr 1*, *mcr 2*, *mcr 3*, *mcr 4* y *mcr 5*, se identificaron los genes *mcr 2* y *mcr 5* en las bacterias *Citrobacter freundii* y *Klebsiella oxytoca*. Demostrando la circulación de cepas multirresistentes que inactivan los betalactámicos y la colistina, siendo considerado este último antibiótico como una opción de terapia combinada en cepas productoras de carbapenemasas.

Palabras Claves

Fármacorresistencia bacteriana, Colistina, Enterobacteriaceae, Gen *mcr*.

Summary

The mechanisms of acquired and transmissible resistance consist fundamentally in the production of bacterial enzymes that inactivate antibiotics. Some bacteria can develop several resistance mechanisms against one or many antibiotics, and in the same way an antibiotic can be inactivated by different mechanisms. Some factors such as self-medication, unnecessary prescription, non-compliance with prescribed treatments and the consumption of antibiotic residues in foods of animal origin predispose to the appearance of super bacteria capable of expressing resistance to multiple families of drugs. For this reason, the present work was carried out to identify the colistin resistance genes in isolated carbapenemase-producing strains of hospitalized patients in a second-level hospital during 2019, it was a study with a quantitative approach with a descriptive-cross-sectional design in which We worked with 32 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae strains that were screened for the *mcr 1*, *mcr 2*, *mcr 3*, *mcr 4* and *mcr 5* genes, the *mcr 2* and *mcr 5* genes were identified in the *Citrobacter freundii* bacteria and *Klebsiella oxytoca*. Demonstrating the circulation of multiresistant strains that inactivate beta-lactams and colistin, the latter antibiotic being considered as a combined therapy option in carbapenemase-producing strains.

Keywords

Bacterial drug resistance, Colistin, Enterobacteriaceae, Gene *mcr*.

3. Introducción

Las infecciones producidas por enterobacterias como infecciones urinarias, pulmonares, del torrente circulatorio, gastroenteritis e intoxicación alimentaria son frecuentes las cuales pueden adquirirse en la comunidad y en el ámbito hospitalario, muchas enterobacterias tienen una beta-lactamasa cromosómica lo que determina una resistencia intrínseca a algunos antimicrobianos facilitando la adquisición de plásmidos que codifican otras betalactamasas de amplio espectro (BLEA) y mecanismos de resistencia a aminoglucósidos, quinolonas, en especial las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas asociándose a una mortalidad considerable debido a la multirresistencia generada, convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial a medida que transcurre el tiempo las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia que les permiten inhibir la función de una gran variedad de antibióticos llegando a la necesidad de reevaluar y reintroducir algunos antimicrobianos como colistina. (Stefaniuk & Tyski, 2019).

La emergencia de resistencia a colistina es preocupante debido a que en la práctica clínica se considera una de las opciones en terapia combinada y a veces únicos agentes de elección aunque no siempre sean efectivos para el tratamiento de bacterias con resistencia a múltiples antibióticos, algunos estudios describen que el gen de resistencia *mcr* y sus variantes se movilizan por plásmidos por ende es de naturaleza transferible su presencia permite la modificación de las paredes bacterianas impidiendo la interacción de las bacterias con colistina, dentro de los genes más prevalente están *mcr 1* y *mcr 2* encontrándose en cepas que presenta genes de resistencia ya a carbapenémicos generando un cuadro clínico grave en las salud de los pacientes y un esquema de tratamiento más complejo. (Wang et al., 2018).

Se presume que la aparición de este mecanismo está relacionada con el uso de colistina en la crianza de animales como prevención para mejorar el crecimiento animal cuya carne con residuos del antibiótico es de consumo humano. Así mismo su uso en terapias para el tratamiento de infecciones causadas por cepas multirresistentes representa un desafío para tratar enfermedades infecciosas lo que sin duda aporta al incremento de la mortalidad.(Stefaniuk & Tyski, 2019).

La presente investigación de grado tuvo como objetivo identificar los genes de resistencia a colistina en cepas productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados, correlacionando los resultados reportados por microdilución en caldo y métodos moleculares, con el fin de lograr dar un apoyo que permita profundizar y aportar información a la comunidad encargada de la salud fomentando conciencia sobre el uso de colistina tanto en la parte hospitalaria como en la veterinaria. Para alcanzar los propósitos del presente estudio se comprobó la viabilidad de las cepas y la presencia de resistencia a algún carbapenémico, luego se realizó el tamizaje molecular con las cinco variantes del gen *mcr* obteniéndose la identificación de este gen en dos cepas.

4. Marco Teórico

4.1 Bacterias

Las bacterias son microorganismos procariotas unicelulares sencillos con un tamaño de 0.5 a 5 micrómetros, manifestándose en una variedad de formas que incluyen bacilos, cocos y espiroquetas, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplásmico que se reproducen por división asexual. (Basaldúa, 2016; Murray et al., 2017).

Varios de ellos cuentan con sistemas de desplazamiento que les permiten ser móviles y generalizados, su pared celular es compleja, existiendo dos formas elementales, una para bacterias grampositivas con una gruesa capa de peptidoglucano y otra para bacterias gramnegativas con una delgada capa de peptidoglucano. (Murray et al., 2017).

La adaptabilidad de las bacterias a pesar de su simplicidad estructural les dio la oportunidad de desarrollarse en ambientes muy desfavorables y pobres en oxígeno a medida que cambiaban las condiciones atmosféricas, las bacterias desarrollaron capacidades que dieron como resultado la producción acelerada de oxígeno lo que a su vez provocó el desarrollo de bacterias aeróbicas, anaeróbicas y facultativas. (Basaldúa, 2016).

4.1 Enterobacterias

La familia Enterobacteriaceae es un conjunto de bacilos gramnegativos entéricos o también denominados coliformes amplio y heterogéneo cuyo hábitat natural son los intestinos de los seres humanos y los animales aunque también se encuentran de forma natural en el suelo, el agua y la vegetación. (Carrol, 2017).

Son bacilos aeróbicos o anaeróbicos facultativos que fermentan una variedad de carbohidratos, tienen una estructura antigénica compleja produciendo diversas toxinas y factores

de virulencia, cuyo tamaño fluctúa entre 0,3-1 μm por 0,6-6 μm , no forman esporas y pueden ser móviles por flagelos peritricos o inmóviles. (Carrascoso, 2016).

Su ubicuidad y elementos genéticos móviles adquiridos con frecuencia a través del agua, alimentos, animales o fuentes inanimadas en el hospital indican que su huésped contacta regularmente nuevas cepas con nuevo material genético incluido la resistencia a los antibióticos, (Pericacho-Gómez, 2015).

Las Enterobacteriaceae pueden llegar a ingresar a otras partes del cuerpo humano, produciendo enfermedades, de las cuales las más comunes son infecciones del sistema urinario e infecciones del tracto respiratorio y menos comunes como infecciones en el sitio quirúrgico o infecciones de catéteres u otros equipos intravasculares. (Pericacho-Gómez, 2015).

4.2. Características Microbiológicas

Las características estructurales constituyen significativos factores de virulencia, como la presencia de fimbrias que permiten evitar las barreras de defensa del organismo, la adherencia a la célula huésped y otras bacterias. Algunas especies también producen cápsulas con propiedades polisacáridas, que pueden ser rígidas, organizadas o sueltas, con límites poco claros llamado glucocáliz previenen la activación del complemento y la fagocitosis. (Merino & Lösch, 2015).

La pared posee una estructura multicapa compuesta por una membrana interna o membrana citoplasmática formada por una doble capa de fosfolípidos y proteínas que regulan el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas, seguido de una capa externa constituido por el periplasma el cual contiene una capa delgada de peptidoglucano y una membrana externa compuesta por una doble capa de fosfolípidos, que incluye lipopolisacáridos,

lipoproteínas unidas a peptidoglicano y proteínas poliméricas que forman porinas, que pueden promover diversas sustancias incluidos los antibióticos. (Carrasco, 2016).

4.3 Clasificación

4.3.1 *Escherichia coli* spp

Es una bacteria en forma de bacilo puede ser móviles o inmóviles anaerobio facultativo no esporulante, tiene producción de indol a partir de triptófano, no utiliza citrato como fuente de carbono es reductor de nitritos fermenta glucosa y lactosa con producción de gas, con 3 antígenos Antígeno O: somático, Antígeno H: flagelar, Antígeno K: de superficie. (Cravioto et al., 2020). Es una bacteria con gran capacidad de adquirir varios factores de patogenicidad debido a que habita principalmente el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento considerándose un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, como infecciones extraintestinales, infecciones de vías urinarias, infecciones respiratorias, sistema nervioso central, provocando la muerte por deshidratación y otras complicaciones. (Canet, 2016).

Presenta un fenotipo sensible a todos los betalactámicos, se encuentra el mecanismo de resistencia AmpC el cual hace que la bacteria sea resistente a algunas penicilinas, pero en la actualidad *Escherichia coli* presenta no solo resistencia por AmpC sino que también por BLEA y BLEE, por lo que la bacteria se ha hecho resistente a todas las cefalosporinas, dependiendo el tipo de mecanismo que posea. (Abramo et al., 2018).

Según (Farfán-García et al., 2016), los principales patógenos intestinales se describen en función de los síntomas que generan y los factores de patogenicidad siendo, *Escherichia coli enterotoxigenas* (ETEC), *Escherichia coli enteropatógeno* (EPEC) , *Escherichia coli*

enteroagregativas (EAggEC), *Escherichia coli enterohemorrágicas* (EHEC) y *Escherichia coli enteroinvasivas* (EIEC)

4.3.2 *Shigella* spp

Estas bacterias son inmóviles no formadoras de esporas tienen como único reservorio al hombre y su dosis infectante mínima es pequeña, lo que permite su transmisión no sólo a través de los alimentos, sino también a través del agua y por contacto directo entre niños en las guarderías. (Lopardo et al., 2016).

Según (Anselmo et al., 2020), *shigella* está compuesto por cuatro especies, *shigella dysenteriae* perteneciente al Grupo A considerada el más patógeno teniendo 15 serotipos del cual el serotipo 1 produce la toxina Shiga involucrada en el síndrome urémico hemolítico, *Shigella flexneri* parte del grupo B teniendo 8 serotipos algunos de los cuales relacionados con el Síndrome de Reiter, un tipo de artritis reactiva ligada a factores genéticos y la infección con algunos patógenos bacterianos, *Shigella boydii* del Grupo C cuenta con 19 serotipos, *Shigella sonnei* de Grupo D cuenta con un solo serotipo los grupos C y D causan un cuadro infeccioso generalmente auto limitado, con una baja mortalidad.

Los inhibidores más frecuentes de las cepas de *Shigella* para suprimir los ataques clínicos agudos de la disentería y abreviar la duración de los síntomas son ciprofloxacina, ampicilina, doxiciclina y trimetoprim-sulfametoxazol, la azitromicina a menudo se utiliza para tratar niños con shigelosis. (Carrol, 2017).

4.3.3 *Salmonella* spp.

Es capaz de sobrevivir la acidez del estómago, la alta osmolaridad del intestino delgado, induce su internalización por las células epiteliales intestinales del íleon resiste la fagocitosis

mediada por las células dendríticas y macrófagos los diferentes serotipos pueden producir distintos cuadros de infección aguda en el hombre que clásicamente pueden clasificarse en cuatro grupos: fiebre entérica, gastroenteritis, bacteriemia o infección focal extraintestinal, denominándose invasivas aquellas infecciones que traspasan la barrera intestinal.(Betancor & Yim, 2016).

Como ocurre con otras enfermedades infecciosas el curso de la enfermedad y la evolución clínica depende de una gran variedad de factores, entre los que se incluyen la dosis recibida, el estado inmune del hospedador, la composición de su microbiota intestinal y el linaje genético tanto del hospedador como del organismo infeccioso. (Betancor & Yim, 2016).

Según (Barreto et al., 2016), dentro de los serotipos de *salmonella* están *Salmonella enteritidis*, *typhimurium*, *hadar*, *virchow*, *infantis*, son portadoras de una betalactamasas cromosómica (AmpC), le confiere resistencia natural a todos los β -lactámicos, excepto carbapenémicos a no ser que coexistan alteraciones en las porinas.

4.3.4 *Klebsiella spp.*

Es un bacilo gram negativo fermentador de lactosa en los medios diferenciales, todas las especies de *Klebsiella* son bacilos inmóviles, aislados en pares o cadenas cortas, presentan una capsula haciendo que las colonias que se desarrollan en agar se vean grandes, húmedas y mucoides, se encuentra como microorganismo saprófito en la flora gastrointestinal como colonizante en la piel y la nasofaringe. Las heces son la fuente de infección más importante o por contacto con equipo contaminados en los hospitales como catéteres, equipos de transfusión, aditamentos de terapia respiratoria. (Herrera et al., 2017).

Es causa frecuente de infecciones hospitalarias urinarias, pulmonares se encuentra en heridas infectadas produce una infección secundaria en los pulmones en pacientes con enfermedad pulmonar crónica causa una infección entérica debido a su enterotoxina produce rinoscleroma. (Herrera et al., 2017).

Según (Danamirys et al., 2018), los serotipos de *Klebsiella*, son las siguientes, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella aerogenes*. Dentro de la resistencia natural de esta bacteria es BLEA, capaces de inactivar las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda generación, a las cefalosporinas y aztreonam.

4.3.5 *Yersinia spp*

Son bacilos aerobios y anaerobios facultativos tienen flagelos anfitricos o peritricos forman pilis y fimbrias no forman cápsulas de gran espesor ni esporas. Son infecciones zoonóticas que afectan roedores, animales pequeños y aves, por lo que el ser humano es un huésped accidental. Causa una enfermedad entérica aguda que se manifiesta por una diarrea intensa, enterocolitis, linfadenitis mesentérica aguda que se asemeja a una apendicitis, fiebre, dolor de cabeza, faringitis, anorexia, vómito, eritema nudoso, artritis, ulceración cutánea, abscesos hepatoesplénicos, osteomielitis y septicemia.(Leiva et al., 2018).

Según (Carrol, 2017), está el género *Yersinia*, compuesto por al menos 11 especies, de las cuales hay tres que son consideradas patógenos humanos, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, presentan resistencia natural a la ampicilina, cefalotina y a cefazolina.

4.3.6 *Enterobacter spp*

Es un patógeno oportunista de ambientes hospitalarios, este microorganismo a menudo puede encontrarse en infecciones de pacientes hospitalizados en unidad de cuidados intensivos y en neonatología, otras son descomponedores que viven en la materia orgánica muerta o viven en el ser humano como parte de una población microbiana normal.(Tufiño & Peñafiel, 2018).

Algunas enterobacterias patógenas causan principalmente infección del tracto urinario y respiratorio, en la actualidad se han descrito más de diez especies de *Enterobacter*, de estos los responsables de la mayoría de infecciones son *Enterobacter cloacae* con una mayor asociación a enfermedad en neonatos y lactantes y *Enterobacter sakazakii*. (Tufiño & Peñafiel, 2018).

La mayor parte de las cepas posee una β lactamasa cromosómica denominada ampC que las vuelve intrínsecamente resistentes a la ampicilina, cefalosporinas de primera y segunda generaciones. (Carrol, 2017).

4.3.7 *Serratia spp*

Se encuentran en el medio ambiente como el agua potable, cañerías y en los seres humanos pueden encontrarse colonizando la mucosa intestinal, el tracto respiratorio, el tracto urinario, heridas e insumos hospitalarios, son considerados como patógenos oportunistas la infección por estos microorganismos se da especialmente en salas de cuidados intensivos y de neonatología. (Lopardo et al., 2016).

La colocación de catéteres intravenosos, intraperitoneales, vía urinaria, vías respiratorias se han identificado como factores predisponentes entre los pacientes hospitalizados.(Lopardo et al., 2016). *Serratia marcescens*, suele tener resistencia a múltiples aminoglucosidos y

penicilinas, las infecciones se pueden tratar con cefalosporinas de tercera generación.(Carrol, 2017).

4.3.8 *Proteus spp*

Es un bacilo gran negativo inmóvil residente del tracto intestinal del ser humano hombre y algunos animales vive en el suelo degradando materia orgánica causan infecciones urinarias con complicaciones incluyendo cálculos y lesiones celulares del epitelio renal, enteritis, abscesos hepáticos, meningitis, otitis media y neumonía. Es un frecuente invasor secundario de quemaduras y heridas así como infecciones nosocomiales.(Leiva et al., 2018).

Las cepas *Proteus vulgaris*, *mirabilis*, *penneri*, tienen una sensibilidad muy variable a los antibióticos. *Proteus mirabilis* suele inhibirse con penicilinas, los antibióticos más activos de otros miembros del grupo son los aminoglucósidos y las cefalosporinas.(Carrol, 2017).

4.3.9 *Moraxella spp*

Está ampliamente distribuida en la naturaleza, en el suelo y aguas estancadas donde contribuye a la degradación de la materia orgánica gracias a su actividad proteolítica. No obstante su ubicuidad, es una causa poco común de infecciones adquiridas en la comunidad y es más frecuente encontrarla asociada a infecciones nosocomiales. (Gaudencio & La, 2017).

Este agente ha sido recuperado en forma ocasional en muy diversas infecciones, tales como meningitis, abscesos de cerebro, artritis, infecciones polimicrobianas asociadas a enfermedad hepatoiliar, teniendo 2 cepas *Moraxella catarrhalis* y *Moraxella lacunata*.(Carrol, 2017).

4.3.10 *Providencia spp*

Está presente en el intestino de varios animales y en fuentes medioambientales contaminadas, puede colonizar el tracto gastrointestinal humano que es un importante reservorio, *Providencia stuartii* son patógenos oportunistas en humanos y pueden causar infecciones urinarias, en particular en pacientes con catéteres urinarios por largo tiempo o aquellos con quemaduras extensas. (Carrol, 2017).

4.4 Mecanismos de resistencia en Enterobacteriaceae

El gran número de especies dentro de la familia de enterobacteriaceae produce una gran diversidad de mecanismos de resistencia como, cambios en proteínas de la membrana externa, bombas de eflujo inespecíficas, producción de enzimas tipo β -lactamasa y modificaciones del sitio blanco lo que hace que se incremente la posibilidad de adquirir genes de resistencia tanto de microorganismos de la misma especie como de otras. (Murray et al., 2017).

4.4.1 B-lactamasas

Las B-lactamasas, representan una forma importante de resistencia la cual puede encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, permitiendo fácilmente la transferencia de estos hacia otras bacterias, poseen enzimas capaces de romper el anillo B-lactámico de los antibióticos e inactivarlo, clasificándose en los siguientes grupos. (Tooke et al., 2019).

4.4.2 B-lactamasas tipo AmpC

Estas β -lactamasas, contienen residuos de serina en su sitio activo para la catálisis de cefalosporinas de espectro reducido, aztreonam e inhibidores de B-

lactamasas por lo general, producen estas enzimas en bajas cantidades sin alterar significativamente la sensibilidad a las cefalosporinas de tercera generación pero puede haber mutaciones lo cual lleva a la producción constitutiva de estas enzimas para hidrolizar a los antibióticos antes mencionados. (Microbiol & Uribe, 2017)

Según (Tamma et al., 2019), los mecanismos de resistencia a la β -lactamasa AmpC se pueden dividir en 3 categorías:

1. Resistencia inducible a través de genes *ampC* codificados cromosómicamente, por ejemplo, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Resistencia cromosómica no inducible debida a mutaciones del promotor o atenuador, por ejemplo, *Escherichia coli*, especies de *Shigella spp*, *Acinetobacter baumannii*.
3. Resistencia mediada por plásmidos por ejemplo, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, especies de *Salmonella spp*.

Se caracterizan en su mayoría por ser resistentes a inhibidores como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, son activas sobre aztreonam, cefamicinas como cefoxitina y cefalosporinas de primera, segunda generación y en menor medida a cefalosporinas de tercera, son inhibidas por aztreonam, cloxacilina, oxacilina y ácido borónico. (Gonzalo, 2021).

4.4.3 B-lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Son un grupo de enzimas mediadas por plásmidos que extienden su espectro de hidrólisis a cefalosporinas de tercera generación, cuarta generación y a monobactámicos, pero son incapaces de hidrolizar cefamicinas y carbapenems. Lo que las diferencia de las B-lactamasas de tipo AmpC, es que son inhibidas por los inhibidores de B-lactamasas como el ácido

Clavulánico, el sulbactam y el tazobactam. (Gonzalo, 2021).

4.4.4 B-lactamasas de tipo carbapenemasas.

Son capaces de hidrolizar la mayoría de los betalactámicos existentes incluidos los carbapenémicos, imipenem, meropenem, ertapenem, que se han asociado a elementos genéticos transferibles, clasificándose en 3 clases, aquellas de clase A sensibles al ácido clavulánico y tienen mayor acción sobre meropenem que imipenem, las de clase B que no tienen acción sobre aztreonam y las de clase D (OXA-48). (Gonzalo, 2021).

- **Clase A:** enzimas que contiene una serina en el sitio activo, denominada SME, son de naturaleza plasmidica, confiriendo resistencia a los carbapenemicos y un perfil hidrolítico que incluyen el Aztreonam, pero son inhibidas por el ácido clavulánico y aún mejor por el ácido borónico que se utiliza como estrategia de detección. (Gonzalo, 2021).
- **Metallo B-lactamasas (MBL):** estas enzimas tienen un perfil hidrolítico que incluye todos los antibióticos β -lactámicos con la excepción del aztreonam y no se inhiben por el ácido clavulánico, sulbactam ni tazobactam. (González Rocha et al., 2017).
- **Oxa-48:** Las enzimas tipo oxa presentan una gran capacidad hidrolítica contra carbapenemes pero además afectan cloxacilina y aminopenicilinas, no son inhibidas por ácido clavulánico por lo que complica su diagnóstico son capaces de conferir resistencia a los carbapenemes cuando la bacteria expresa otro mecanismo de resistencias como cierre de porinas y la expresión exagerada de bombas de expulsión. (González Rocha et al., 2017).

4.4.5 Resistencia a Quinolonas

Son la clase de inhibidores de DNA girasa y topoisomerasa IV por mutaciones únicas, lo cual disminuye la capacidad de unión del antibiótico a su blanco molecular, antimicrobianos sintéticos cuyo compuesto inicial es el ácido nalidíxico, otro mecanismo descrito es la alteración en la permeabilidad de la pared celular explicado por el cierre de porinas y expresión de bombas de expulsión. (Bush et al., 2020).

4.4.6 Resistencia a AminoglucoSIDOS

Son antibióticos potentes de amplio espectro que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas, mediada por la producción de enzimas modificadoras de aminoglucoSIDOS, sus tres familias más importantes producen acetilación, fosforilación y adenilación alterando la permeabilidad como cierre de porinas o expresión de bombas de expulsión, modificación enzimática, modificación del sitio diana a través de una enzima o mutación cromosómica. (Krause et al., 2016).

4.5 Resistencia cromosómica a la colistina

La resistencia conocida a la colistina de naturaleza cromosómica, se produce por la modificación del lípido A de los lipopolisacárido (LPS) bacteriano regulado a través de un sistema de 2 componentes, implicando mutaciones en diferentes genes, cuyo resultado da lugar a variantes del LPS que dificultan el efecto bactericida que ejerce la colistina por disrupción de la membrana externa, entre ellos destacan los genes mgrB y pmrB en enterobacteriaceae, la mayoría de los aislados resistentes a colistina con mutaciones en al menos 1 de estos 2 genes se han descrito en *Klebsiella pneumoniae* y en menor medida en *Escherichia coli*. (Ugarte Silva et al., 2018). Otro mecanismo de resistencia de naturaleza cromosómica descrito en *Klebsiella pneumoniae* y menos estudiado que los anteriores son los cambios en la cápsula, estos

determinan un atrapamiento de la colistina, lo que da lugar a un incremento en los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI). (Ugarte Silva et al., 2018).

4.6 Resistencia plasmídica a la colistina

Se conocía que la resistencia a la colistina, se daba por mutaciones a nivel cromosómico que conducen a modificaciones en la capa de LPS, sitio de acción de esta molécula, no habiéndose informado acerca de la transferencia horizontal de genes que otorgaran resistencia a las mismas. (Wang et al., 2018). Sin embargo, en noviembre del 2015 se describió por primera vez en China, el gen *mcr-1* que confiere resistencia plasmática a colistina/polimixina, un estudio desarrollado en Italia demostró que el 57% de bacterias productoras de carbapenemasas también generaban resistencia a la colistina. (Blanco, y otros, 2016).

El gen *mcr-1* tenía similitud estructural con las enzimas LptA y EptC, estas enzimas con actividad fosfoetanolamina transferasa son capaces de adicionar una molécula de PEtN al ácido 3-desoxi-manooctulosónico del núcleo del LPS, disminuyen la carga negativa neta del lípido A, impidiendo la unión de la colistina, el hecho de que la colistina se haya utilizado de manera masiva en animales de producción, se planteó como teoría de que se originó primero en animales y se diseminó posteriormente a humanos. (Wang et al., 2018).

Las dos características de los genes *mcr* que más preocupan son su localización en plásmidos transferibles, que fácilmente pueden diseminarse por conjugación entre distintas especies bacterianas como enterobacterias tanto de animales como de humanos y su frecuente localización con otros genes de resistencia de importancia clínica, como betalactamasas de espectro ampliado, genes de resistencia a carbapenemasas, *blaCTX-M*, *blaNDM*, *blaKPC*, *blaOXA-48* o quinolonas. (Sun et al., 2016).

4.7 Gen *mcr-1*

El gen *mcr-1* se ha detectado ampliamente en enterobacterias aisladas de animales, muestras de seres humanos en todo el mundo y especialmente en entornos ambientales, este gen se ha observado en plásmidos que contienen otros genes de resistencia a los antimicrobianos, como las carbapenemasas y las betalactamasas de espectro extendido, puede diseminarse dentro de los entornos hospitalarios incluso en ausencia del uso de colistina y en la comunidad.(Wang et al., 2018).

4.8 Gen *mcr-2*

El gen *mcr-2* tiene 76,7% de identidad de nucleótidos con *MCR-1*, se encontró en aislados resistentes a colistina que no contenían *mcr-1*, se encuentran en plásmidos transferibles que no están restringidos a reservorios o huéspedes como el transposón IS1595, la variante *mcr-2* rara vez se ha identificado, y solo en cepas de *E. coli* de origen porcino y bovino en Bélgica. (Zhang et al., 2019).

4.9 Gen *mcr-3*

El gen *mcr-3* recientemente descubierto en cepas gramnegativas ya podrían estar ampliamente diseminado en humanos, animales y el medio ambiente, identificándose en *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* de Asia y los Estados Unidos, *mcr-3* mostró una identidad de secuencia de nucleótidos del 45.0% y 47.0% para *mcr-1* y *mcr-2*. (Yin, 2017).

4.10 Gen *mcr-4*

El gen *mcr-4* es mediado por un plásmido pequeño, no autoconjugativo con una amplia gama de huéspedes replicándose en diferentes especies y géneros bacterianos. Sin embargo, la

movilización del plásmido necesita un plásmido auxiliar para promover la conjugación.(Carattoli et al., 2017)

4.11 Gen *mcr-5*

El gen *mcr-5* es diferente de *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* y *mcr-4*, mostrando solo 34% -36% de identidad de secuencia de aminoácidos con las otras cuatro proteínas, solo se han reportado ampliamente *mcr-1* y *mcr-3* entre las Enterobacteriaceae, mientras que el gen *mcr-5* solo se ha encontrado en *Salmonella* spp, de aves de corral y productos alimenticios de origen animal en Alemania.(Long et al., 2019).

4.12 Técnicas de identificación de resistencia a las polimixinas

4.12.1 Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria.

La técnica de dilución en agar o en caldo es usado para medir la capacidad antimicrobiana in vitro de un antibiótico frente a un cultivo, esta técnica se basa en el uso de varios tubos o placas con caldo o agar a los cuales se añade el antibiótico en diferentes concentraciones, al igual que las concentraciones conocidas de microorganismos y luego de una incubación durante toda la noche a 37°C, es posible determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del antibiótico frente al microorganismo. Para el análisis del microorganismo a probar se realiza la preparación de una solución madre que sea diez veces más concentrada que la última concentración más alta, es decir, para el caso de la colistina la concentración más alta a probar es de 125 ug/ml, por la tanto la solución madre será de 1250 ug/ml, en el estudio de la resistencia a la colistina, se ha identificado como estándar de oro a la técnica de micro-dilución en caldo para estudio de esta resistencia. (Weinstein., 2020).

4.12.2 Prueba Rápida Polimixina-NP

Se basada en la detección de la metabolización de la glucosa asociado al crecimiento bacteriano en una concentración de colistina o polimixina B, la prueba tiene incorporado un indicador ácido-base que por la formación de metabolitos ácidos cambia de color demostrando la positividad o negatividad de la prueba. El ensayo descrito por Nordmann y otros, evaluó a 135 aislados que expresaban varios mecanismos de resistencia a la colistina, y 65 aislados susceptibles a la colistina. Demostrando al final una sensibilidad de 99,3% y especificidad de 95,4%. (Nordmann et al., 2016).

4.14.3 Microdilución en caldo

Es un sistema de identificación bacteriana y estudio de susceptibilidad que usa una tarjeta con reactivos colorimétricos en donde son inoculados los microorganismos puros y es interpretado el perfil de susceptibilidad automáticamente, trabaja con tarjetas reactivas de 64 pozos, cada pozo cuenta con una prueba individual para medir varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimática y desarrollo en presencia de sustancias inhibitoras, los cálculos se realizan con los datos obtenidos y la comparación con umbrales para las reacciones de cada prueba. (Belingard & Officer, 2016).

4.14.5 Detección molecular

La detección de resistencia de la colistina por PCR, se realiza con la determinación del gen *mcr-1* y sus variantes, es importante describir que debido al pronto desarrollo de la resistencia a la colistina no se han descrito aún todos los posibles genes que confieran esta resistencia, así mismo es significativo recalcar la asociación entre la resistencia a la colistina y a los carbapenémicos, puesto que por lo general cuando se encuentra el gen *mcr-1*, también se encuentra un gen que otorga resistencia a los carbapenémicos por lo que la reciente aparición del

gen *mcr-1* mediado por plásmidos capaz de transferir un fosfoetanolamina transferasa es motivo de preocupación. (Payne et al., 2016).

La PCR es un método molecular muy variable, hace múltiples copias de una secuenciación de ADN diana a través de un proceso de amplificación, se puede amplificar cualquier porción de ácido nucleico conocida siempre que esté ubicada entre dos secuencias conocidas sus componentes son: ADN molde a amplificar, ADN polimerasa, cebadores de secuencia específica, nucleótidos para la síntesis de nuevo ADN y el tapón de reacción.(Larrachea, 2017).

Según (Larrachea, 2017), los protocolos básicos de PCR incluyen los siguientes pasos fundamentales:

1. Desnaturalización térmica del ADN que se utiliza como molde.
2. Hibridación de cebadores sintético cuya secuencia les permite hibridar uno a cada lado de la secuencia diana.
3. Elongación de una nueva hebra complementaria.

En cualquier PCR es muy importante utilizar siempre un control negativo, un tubo que contenga todos los reactivos menos el ADN molde, para poder monitorear posibles contaminaciones, la manera más común de evaluar si se logró una amplificación exitosa es a través de la visualización del fragmento amplificado mediante electroforesis en geles de agarosa. (Larrachea, 2017).

5. Metodología

5.1 Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo cuantitativo con diseño retrospectivo, descriptivo y transversal.

5.2 Área de estudio

La investigación se realizó en la ciudad de Loja, ubicada en el sur del Ecuador; con cepas aisladas de pacientes del Hospital Isidro Ayora, unidad operativa de segundo nivel que recibe pacientes referidos de unidades operativas del primer nivel de la zona 7; cuenta con servicios de consulta externa en varias especialidades: Medicina interna, Cardiología, Gineco Obstetricia, Pediatría, Gastroenterología, Diabetología, Otorrinolaringología, Oncología, Oftalmología, Neumología, Psiquiatría, Psicología, Dermatología, Neurología Traumatología, Ortopedia, Audiología, Reumatología, Hemofilia, Hematología, Patología, Atención a discapacitados, Nefrología y Pacientes a prótesis; cuenta con los departamentos de hospitalización y apoyo diagnóstico como: Clínica, Cirugía, Pediatría, Ginecología, Unidad de Quemados, Laboratorio Clínico, Microbiológico, Anatómico Patológico, Laboratorio de Tuberculosis y VIH, Servicios de medicina transfusional, Imagenología, Endoscopia, Laringoscopia entre otros; dispone de 255 camas.

Durante la primera fase del estudio se reconstituyó las cepas aisladas durante el 2019 en el Laboratorio Clínico del Hospital Isidro Ayora – Loja y en una segunda fase se procesaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

5.3 Universo y muestra

El universo y muestra estuvo constituido por 32 cepas recuperadas de la familia Enterobacteriaceae resistentes a carbapenémicos aisladas de pacientes hospitalizados durante el año 2019 en el Hospital Isidro Ayora; dichas cepas ya fueron identificadas y determinado su perfil de susceptibilidad por métodos automatizados en el equipo Vitek Compact 2 de BioMerieux

5.4 Criterios de Inclusión

- Cepas identificadas por métodos automatizados como Enterobacteriaceae.
- Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados durante el año 2019.

5.5 Criterios de Exclusión

- Cepas productoras de carbapenemasas que no tuvieron crecimiento bacteriano al recuperarlas.
- Cepas productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados que no pertenezcan a la familia Enterobacteriaceae.

5.6 Materiales y Métodos

5.6.1 Fase Pre- analítica

- Se obtuvo la autorización para la ejecución del estudio (Anexo N°1).
- Elaboración de ficha de recolección de datos: Los datos se recolectaron de los registros de las muestras tomadas de pacientes hospitalizados en el Hospital Isidro Ayora, de las

cuales se aislaron las diferentes cepas de la familia de Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas (Anexo N°2).

5.6.2 Fase Analítica

- Protocolo de reconstitución de cepas. (Anexo N°3)
- Protocolo de extracción de ADN de cepas aisladas (Anexo N°4).
- Procesamiento molecular por reacción en cadena de la polimerasa convencional. (Anexo N°5).
- Secuenciación de los Primers utilizados (Anexo N°6)

5.6.3 Fase Pos-analítica

- Los datos obtenidos fueron registrados en una base de datos según la bacteria aisladas y el gen de resistencia (Anexo N°7).
- Evidencias Fotográficas (Anexo N° 8).

5.7 Tabulación y presentación de resultados

Los datos se tabularon y analizaron usando técnicas de estadística descriptiva para organizar los datos en tablas y gráficos, los cuales se presentaron de acuerdo a los objetivos planteados.

5.8 Consideraciones éticas

En el presente estudio se observaron los principios Bioéticos de confidencialidad y autonomía, salvaguardando la privacidad de los pacientes, los resultados fueron usados únicamente con fines académicos y científicos.

6. Resultados

Tabla N° 1

Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital General Isidro Ayora, Loja. 2019

MICROORGANISMO	ÁREA DE HOSPITALIZACIÓN													
	Medicina		Neonatólog		Cirugía		Hemodiálisis		UCI		Unidad de		TOTAL	
	Interna		ía								Quemados			
	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
<i>Escherichia coli</i>									1	3.12	1	3.12	2	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	21.8	3	9.3	6	18.7	3	9.3	5	15.6			24	75.0
<i>Enterobacter cloacae</i>							1	3.12					1	3.12
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	3.12	1	3.12									2	6.25
<i>Citrobacter freundii</i>									1	3.12			1	3.12
<i>Klebsiella aerogenes</i>									1	3.12			1	3.12
<i>Morganella morganii</i>					1	3.12							1	3.12
TOTAL	8	24.9	4	12.4	7	21.8	4	12.4	8	24.9	1	3.12	32	100

*UCI: Unidad de cuidado intensivos

Nota: Hoja de Registro de datos de pacientes hospitalizados durante el 2019.

Elaborado: Allison Loretho Ochoa Paz

Durante el año 2019 se aislaron 32 Enterobacterias productoras de carbapenemasas en pacientes hospitalizados, la más frecuente fue *Klebsiella pneumoniae* (n=24) que representó el 75% en total; de acuerdo al servicio la producción de carbapenemasas más frecuente en las 7 cepas fue en Medicina interna y Unidad de cuidados intensivos.

Tabla N° 2

Gen *mcr* y variantes en bacterias productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados.

Gen de Resistencia	<i>MCR 2</i>		<i>MCR 5</i>		TOTAL	
	F	%	F	%	F	%
<i>Citrobacter freundii</i>	1	50			1	50
<i>Klebsiella oxytoca</i>			1	50	1	50
TOTAL	1		1		2	100

Nota: Registro del estudio de investigación.

Elaborado: Allison Loretho Ochoa Paz

Después de tamizar las 5 variante del gen *mcr* (*mcr1*, *mcr2*, *mcr3*, *mcr4* y *mcr5*), se pudo identificar los genes *mcr 2* y *mcr 5* en las bacterias *Citrobacter freundii* y *Klebsiella oxytoca*.

Como se muestran en las siguientes figuras:

Figura 1: Gen *MCR 2* muestra de la 1 a la 18

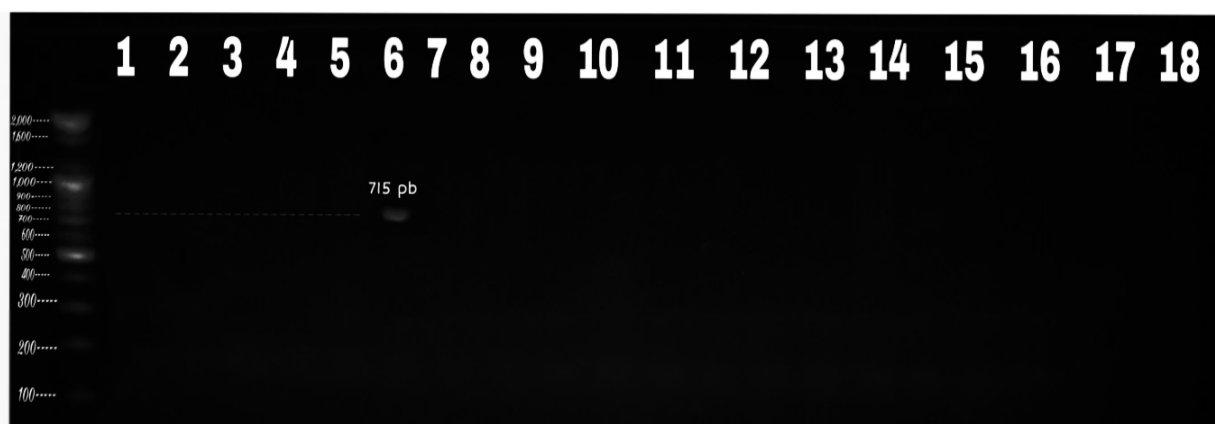


Figura 2: Gen *MCR 5* muestra de la 19 a la 33

De las 32 cepas en estudio se realizó dos corridas en el gel de electroforesis, una de ellas de la muestra 1 a 18 y otra de la muestra 19 a 32, utilizando en el primer carril el marcado de peso molecular de 100 pb y en el último carril 33 un control negativo, en la figura 1 el carril 6 muestra una banda correspondiente a la amplificación del gen *mcr 2* (715pb) y en el carril 25 de la figura 2 muestra una banda correspondiente a la ampliación del gen *mcr5* (1.644 pb) .

Tabla N° 3

Resistencia a colistín identificada por métodos moleculares y el resultado reportado por microdilución en caldo.

Resistencia en colistina	Gen <i>mcr</i>	CIM
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>mcr 5</i>	< 0.5

Nota: Hoja de Registro de datos de pacientes hospitalizados durante el 2019.

Elaborado: Allison Loretho Ochoa Paz.

De las 32 cepas en estudio, en la identificación por método automatizados sólo a 6 de ellas se testo colistina por microdilución en caldo procedimiento que se realizó antes de la recuperación de cepas, por lo tanto se obtuvieron los resultados del registro de hospital Isidro Ayora, dando resultados menores de 0.5 mg/L, según los establecido en el CLSI no habría resistencia para colistina por este método, sin embargo, en una cepa de *Klebsiella oxytoca* se identificó por biología molecular la presencia de la variante *mcr5*, verificando la falta de fiabilidad de los métodos automatizados para detectar la resistencia a colistina.

7. Discusión

La resistencia adquirida a los antibióticos se produce cuando las bacterias sufren cambios en su estructura, contenido o material genético al verse expuestas a los antibióticos que se prescriben para tratar distintas infecciones bacterianas (Ugarte Silva et al., 2018); estos cambios en las bacterias hacen que los antibióticos dejen de ser eficaces, constituyendo un problema global, creciente, preocupante en la actualidad, derivando en infecciones más graves que requieren esquemas de tratamiento más largos y complejos. (Higuera-Gutiérrez & Quiceno, 2017).

El estudio se realizó en 32 cepas de la familia de Enterobacteriaceae la identificación y determinación de la microdilución en caldo se realizó por métodos automatizados procedimiento realizado antes de la recuperación de cepas, por lo que se obtuvieron los datos del registro del hospital Isidro Ayora; la identificación de los genes se realizó según las condiciones descritas en el artículo científico por (Rebelo et al., 2018) titulado PCR multiplex para la detección de determinantes de resistencia a la colistina mediados por plásmidos, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5* con fines de vigilancia, en el cual se realizaron modificaciones empleado el método de PCR convencional para la identificación de cada gen con la observación de la presencia de bandas según el par de base de cada primer utilizado; la distribución de la muestra indicó que la bacteria que produjo carbapenemasa frecuentemente fue *Klebsiella pneumoniae* con un 75%, de las 32 cepas estudiadas se obtuvo 2 cepas portadoras del gen *mcr* variantes 2 y 5, a una de ellas por métodos automatizados se determinaron el perfil de susceptibilidad dando un resultado sensible a colistina, sin embargo, por métodos moleculares se detectó el gen *mcr5*; quizá por ello el CLSI recomienda en la actualidad medir la susceptibilidad de colistina por el método de elución en caldo.

En el año 2018 fue publicado en Perú un estudio realizado en 83 aislados de enterobacterias en pacientes hospitalizados, el 66.2% correspondió a *Klebsiella pneumoniae* como el patógeno con mayor frecuencia, portador de los genes de resistencia para carbapenémicos datos similares con los obtenidos en este estudio en el cual de 32 cepas aisladas *Klebsiella pneumoniae* representó el 75% en total, lo que indica que a pesar del menor número de muestras recolectadas en nuestra población el mecanismo de resistencia a carbapenémicos es predominante complicando el tratamiento con los antibióticos de primera línea, lo que sumaría la mortalidad y riesgo de transmisión cruzada. (Sacsquispe-Contreras & Bailón-Calderón, 2018).

En una investigación realizada en Italia en el año 2020 se realizó para determinar la presencia de genes de resistencia a colistina mediados por plásmidos (*mcr-1 a mcr-5*) por PCR en tiempo real con 1062 cultivos de *Escherichia coli*, determinaron siete muestras positivas para genes *mcr*, dos muestras fueron positivas para *mcr-3*, *mcr-4* y cuatro para *mcr-5*, tres de los aislados portadores de *mcr* también albergaban genes BLEE / AmpC, datos corroborados con los obtenidos en este estudio, a pesar de tener un menor número de muestras donde se determinaron 2 cepas con genes *mcr 2* y *mcr5* de 32 cepas en estudio, demostrando que la expresión de *mcr* ya se encuentra identificada en nuestra situación geográfica, por otro lado nos ayudó a afirmar que cepas que presente ya los genes de resistencia a colistina puede albergar otros genes de resistencia para otros antimicrobianos, conociendo que nuestras cepas identificadas con los genes *mcr* residen genes de resistencia a carbapenémicos, de manera que está circunscripta en el ámbito hospitalario la presencia de cepas multirresistentes. (Tolosi et al., 2020).

En varios estudios realizados en Latinoamérica por (Yauri-Condor et al., 2020), (Legarraga et al., 2018), (Melgarejo Touchet et al., 2018), en diferentes años en Perú, Paraguay y Chile, determinando ya casos de prevalencia del gen *mcr*, en especies involucradas como

Escherichia coli, *Klebsiella Pneumoniae* y *Salmonella spp*, las cuales también presentaban otros genes de resistencia a antibióticos, desde su primera descripción en 2016, *mcr-1* se ha detectado en los cinco continentes, en seres humanos, animales, alimentos y en el ambiente, reflejando su gran capacidad de diseminación dada su localización en un plásmido transferible, por lo tanto al relacionar los resultados con nuestro estudio, si bien el número de cepas en las que se ha confirmado la presencia de este gen es pequeño, este estudio demostró la circulación del gen *mcr* de resistencia a colistina en Enterobacterias en Loja- Ecuador, a partir de muestras clínicas de pacientes hospitalizados, con esto respalda la necesidad de implementar estudios de epidemiología molecular para prevenir el establecimiento de infecciones asociadas a la atención en salud por este tipo de microorganismos multirresistentes.

En un estudio comparativo por (Chew et al., 2017) en Singapur en el año 2017, de setenta y seis enterobacterias 21 fueron positivas para *mcr-1*, 18 aislamientos de *Escherichia coli* , 2 aislados de *Klebsiella pneumoniae* y 1 *Klebsiella aerogenes*, utilizaron métodos como Sensititre, MicroScan, Vitek 2 y Etest con microdilución en caldo para identificar que método tiene mayor sensibilidad utilizando una concentración mínima inhibitoria entre 0,25 y 0,5 mg / L de colistina, donde pudieron determinar que algunas cepas que presente el gen de resistencia a colistina puede presentar una concentración mínima inhibitoria sensible es decir menor del 0.5 mg/ L, datos semejantes con este estudio en donde la cepa identificada con el gen *mcr 5* tenía una concentración mínima inhibitoria menor del 0.5 mg/L, razones posiblemente atribuibles a las automedicación y el uso de tratamientos empíricos que permiten la creación de bacterias multirresistentes; sin embargo, no está clara la importancia clínica de las CIM para los aislados positivos para *mcr-1* que todavía se encuentran dentro del rango de susceptibilidad, por esta razón el método confirmatorio para colistina será PCR convencional o en tiempo real.

8. Conclusiones

- En 32 cepas recuperadas, se encontró dos genes de resistencia en dos de ellas, *Citrobacter freundii* con *mcr 2* equivalente al 50% y *Klebsiella oxytoca* con *mcr 5* igualmente con un 50%, obteniendo resultados favorables en la investigación, demostrando la circulación de cepas multirresistentes en nuestro medio que además de expresar enzimas carbapenemasas también poseen el gen *mcr* .
- En la investigación se logró identificar que los métodos automatizados no son confiables, puesto que las cepas recuperadas, mediante el método de biología molecular presentaron genes de resistencia a colistina aun teniendo valores de microdilución en caldo menores del 0.5 mg/L interpretándose como sensibles, por lo tanto es preferible implementar métodos como la elución en caldo en los casos específicos que se requiera.

9. Recomendaciones

- Fomentar la participación del personal de salud con laboratoristas clínicos, bioquímicos clínicos en las juntas de control epidemiológico, debido a que en un grupo multidisciplinario se puede llegar a plantear métodos de control muchas efectivos para este tipo de infecciones intrahospitalarias.
- Realizar investigaciones periódicas, prospectivas y retrospectivas, que pueden incluir otras variantes del gen a colistina, sobre todo en aquellos centros en los que no existe acceso a los nuevos antibióticos combinados que permitirían el tratamiento de bacterias portadoras de carbapenemasas y la opción sería el tratamiento combinado con polimixinas.

10. Bibliografía

- Abramo, J. M., Reynolds, A., Crisp, G. T., Weurlander, M., Söderberg, M., Scheja, M., Hult, H., Wernerson, A., Emacs, A., Distribution, U. E., Makes, W., Like, A., Text, O., Editors, O. T., Interface, T. A., Sets, D. C., Look, T. R., Veterans, E., Bindings, K., ... Rugg, G. (2018). Individuality in music performance. In *Current Trends in Antimicrobial Resistance of Escherichia coli* (Vol. 37, Issue October, p. 435). <https://doi.org/10.1007/82>
- Anselmo, R. J., Ojeda, P. A., & Barrios, H. A. (2020). Detección y susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella* spp. en ensaladas preparadas, listas para consumir. *Información Tecnológica*, 31(1), 13–20. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642020000100013>
- Barreto, M., Castillo-Ruiz, M., & Retamal, P. (2016). Salmonella enterica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 33(5), 547–557. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182016000500010>
- Basaldúa, I. Y. C. (2016). Las bacterias, estudio y cambios a lo largo de la historia. *Revista Digital Universitaria UNAM*, 17(5), 1–10. <http://www.revista.unam.mx/vol.17/num5/art38>
- Belingard, J., & Officer, C. E. (2016). *bioMérieux – 2015 Financial Results*. 1–15.
- Betancor, L., & Yim, L. (2016). Salmonella y salmonelosis. *Departamento de Bacteriología y Virología, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina, Udelar*, 1–11.
- Bush, N. G., Diez-Santos, I., Abbott, L. R., & Maxwell, A. (2020). Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(23). <https://doi.org/10.3390/molecules25235662>

- Canet, J. J. (2016). *Escherichia Coli: características, patogenicidad y prevención*.
<https://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>
- Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzotti, G., & Magistrali, C. F. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*, 22(31), 1–5. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589>
- Carrascoso, G. R. (2016). *CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y CLÍNICO- Guillermo Ruiz Carrascoso Bajo la dirección del doctor Jesús Mingorance Cruz*.
- Carrol, K. (2017). Jawetz, Melnick y Adelberg: Microbiología médica. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Chew, K. L., La, M. Van, Lin, R. T. P., & Teo, J. W. P. (2017). Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(9), 2609–2616. <https://doi.org/10.1128/JCM.00268-17>
- Corporation, B. (2018). *Guide AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit*.
- Cravioto, A., Trujillo, F., León, L., Hernández, J., & Eslava, C. (2020). Infecciones por *Escherichia coli* enteropatógena. *Gac. Méd. Méx*, 132(6), 611–615.
- Danamirys, Sosa Díaz, J., & Sosa Díaz, R. Y. (2018). *Klebsiella pneumoniae*, un patógeno de alta prioridad para la fabricación de nuevos antibióticos. *Revista Médica Electrónica*, 40(4),

12711273.http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S168418242018000400033&script=sci_arttext&tlng=pt

- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., & Vargas-Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*, 33(4), 438–450. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182016000400009>
- Gaudencio, G., & La, C. M. N. (2017). *Estudio de sensibilidad de fosfomicina en enterobacterias y microorganismos multidrogosresistentes de muestras de pacientes del Hospital General*. 64(3), 114–119.
- 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.
- Herrera, K. M., Vega, A. R., & Moreno, G. C. (2017). *Klebsiella* Productora de Carbapenemasa en Pediatría: Revisión de la Literatura. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 33(3), 107–115.
- Higueta-Gutiérrez, L. F., & Quiceno, J. N. J. (2017). Brotes hospitalarios de bacterias resistentes a colistina: Revisión sistemática de la literatura. *Infectio*, 21(4), 214–222. <https://doi.org/10.22354/in.v21i4.684>
- J. Gonzalo, M. (2021). *LA Red: Red Colaborativa Pediátrica de Latinoamérica Resistencia bacteriana en enterobacterias* (Issue 2).

- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6.
- Larrachea, E. (2017). Reaccion en cadena de la Polimerasa. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria*, 35(2), 247–249.
- Legarraga, P., Wozniak, A., Prado, S., Estrella, L., & García, P. (2018). Primera comunicación en Chile de la detección del gen mcr-1 en un aislado clínico de *Escherichia coli* resistente a colistín. *Revista Chilena de Infectología*, 35(4), 453–454. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000400453>
- Leiva, J., Alonso, M. F., Rubio, M., & Ruiz-Bravo, A. (2018). Infecciones por *Salmonella* y *Yersinia*. *Medicine (Spain)*, 12(50), 2941–2951. <https://doi.org/10.1016/j.med.2018.02.011>
- Long, H., Feng, Y., Ma, K., Liu, L., McNally, A., & Zong, Z. (2019). The co-transfer of plasmid-borne colistin-resistant genes mcr-1 and mcr-3.5, the carbapenemase gene bla_{NDM-5} and the 16S methylase gene rmtB from *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 9(1), 5–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37125-1>
- Lopardo, H. A., Predari, S. C., & Vay, C. (2016). MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA Bacterias de Importancia Clínica. *Manual de Microbiología Clínica de La Asociación Argentina de Microbiología*, 11–73. <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>
- Melgarejo Touchet, N., Martínez, M., Franco, R., Falcón, M., Busignani, S., Espínola, C., Takahasi, V., Meyer, I., Imada, S., Segovia, N., & Ortellado, J. (2018). Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-1 in Enterobacteriaceae in Paraguay. *Revista de Salud*

Publica Del Paraguay, 8(1), 44–48. <https://doi.org/10.18004/rspp.2018.junio.44-48>

Merino, L. a., & Lösch, L. S. (2015). Familia Enterobacteriaceae. *Universidad Nacional Del Nordeste (UNNE)*, 1–8. [http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE Enterobacterias.pdf](http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE%20Enterobacterias.pdf)

Microbiol, E. N. F. I. N. F., & Uribe, C. M. (2017). Enfermedades Infecciosas y Microbiología. *Rickettsiosis. Historia y Actualidades.*, 30(1), 25–31.

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

Nordmann, P., Jayol, A., & Poirel, L. (2016). Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 22(6), 1038–1043. <https://doi.org/10.3201/eid2206.151840>

Payne, M., Croxen, M. A., Lee, T. D., Mayson, B., Champagne, S., Leung, V., Bariso, S., Hoang, L., & Lowe, C. (2016). Mcr-1–positive colistin-resistant escherichia coli in traveler returning to Canada from China. *Emerging Infectious Diseases*, 22(9), 1673–1675. <https://doi.org/10.3201/eid2209.160177>

Pericacho-Gómez, F. J. (2015). Universidad Complutense de Madrid Un. *La Tesis Doctoral En Teorico y Empirico*, 1–55.

Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S. A., de Frutos, C., Escobar, Malhotra-Kumar, S., Villa, L., ... Hendriksen, R. S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin

resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance*, 23(6), 1–11. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>

Sacsquispe-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>

Stefaniuk, E. M., & Tyski, S. (2019). Colistin resistance in Enterobacterales strains – A current view. *Polish Journal of Microbiology*, 68(4), 417–427. <https://doi.org/10.33073/PJM-2019-055>

Sun, J., Yang, R. S., Zhang, Q., Feng, Y., Fang, L. X., Xia, J., Li, L., Lv, X. Y., Duan, J. H., Liao, X. P., & Liu, Y. H. (2016). Co-transfer of *bla*NDM-5 and *mcr-1* by an IncX3-X4 hybrid plasmid in *Escherichia coli*. *Nature Microbiology*, 1(December), 3–6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.176>

Tamma, P. D., Doi, Y., Bonomo, R. A., Johnson, J. K., & Simner, P. J. (2019). A Primer on AmpC β -Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-resistant World. *Clinical Infectious Diseases*, 69(8), 1446–1455. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz173>

Tolosi, R., Apostolakos, I., Laconi, A., Carraro, L., Grilli, G., Cagnardi, P., & Piccirillo, A. (2020). Rapid detection and quantification of plasmid-mediated colistin resistance genes (*mcr-1* to *mcr-5*) by real-time PCR in bacterial and environmental samples. *Journal of Applied Microbiology*, 129(6), 1523–1529. <https://doi.org/10.1111/jam.14738>

Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi,

- Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Tufiño, A., & Peñafiel, S. (2018). Enterobacter Cloacae Multiresistente causante de infeccion de heridas a nivel comunitario: reporte de casos. *Práctica Familiar Rural*, 1(7). <https://doi.org/10.23936/pfr.v0i7.204.g264>
- 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>
- Wang, R., Van Dorp, L., Shaw, L. P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., Jin, L., Zhang, Q., Liu, Y., Rieux, A., Dorai-Schneiders, T., Weinert, L. A., Iqbal, Z., Didelot, X., Wang, H., & Balloux, F. (2018). The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. *NATURE COMMUNICATIONS*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03205-z>
- Weinstein. (2020). M100Ed30 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition. In *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (Vol. 9, Issue January 2008). <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
- Yauri-Condor, K., Zavaleta Apestegui, M., Sevilla-Andrade, C. R., Piscocoya Sara, J., Villoslado Espinoza, C., Vicente Taboada, W., & Gonzales-Escalante, E. (2020). Enterobacteriales productores de betalactamasa de espectro extendido portadores del gen mcr-1 en Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 37(4), 711–715.

<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.374.5832>

Yin, A. et. (2017). crossm. *Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene Mcr-3 in Escherichia Coli Wenjuan*, 8(3).

Zhang, H., Hou, M., Xu, Y., Srinivas, S., Huang, M., Liu, L., & Feng, Y. (2019). Action and mechanism of the colistin resistance enzyme MCR-4. *Communications Biology*, 2(1).

<https://doi.org/10.1038/s42003-018-0278-1>

11. Anexos

11.1 Anexo 1

Autorización para la ejecución del estudio en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Loja



1959



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 MULTIPLEX, 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
BERNEO 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 Montros
tras el Hospital Isidro Ayora - Loja - Ecuador
072-57 3719 Ext. 302


11.2 Anexo 2

Ficha de recolección de datos del registro de muestras tomadas en el Hospital Isidro Ayora

Codigo	Microorganismo	Perfil de Susceptibilidad																								Mecanismo de resistencia	Gen	Muestra	Serv																
		AK	CIM	AMC	CIM	AM	CIV	SAI	CIM	CL	CIM	CEP	CIM	FEP	CIM	FOX	CIM	CTX	CIM	CA2	CIM	CR	CIN	CXI	CIV					CIP	CIM	FF	CIM	CN	CIM	IPM	CIM	MEV	CIM	F	CIM	NOR	CIM	TZP	CIM
191103203	Klebsiella Pneumoniae	S	2		R	32	R	32		R	64	R	64						R	64	R	64		S	1		R	16		R	16	S	16	S	2	R	320			Carbapenemasa		Orina	Ciruj		
191103143	Klebsiella Pneumoniae	S	2		R	32							R	64	R	64		I	2				S	1	R	16	R	16	R	16				R	128			Carbapenemasa KPC		Exudado de cadera derecha	Medi				
190323083	Klebsiella Pneumoniae	S	2			R	32					R	4	R	16			R	16	R	64		R	4		S	1	R	16	R	16			R	128	S	0,5	S	0,5	Carbapenemasa KPC		Herida de Nefrostomia	Medi		
191025278	Klebsiella Pneumoniae	R	64		R	32	R	32		R	64	R	64						R	64	R	64		R	4		R	16		R	16	S	32			Carbapenemicos		Orina	Medi						
190313285	Escherichia Coli	S	4			R	>32						>64						R	>64	R	>64		R	>4		I	8	R	>16	R	>16			R	>32	S	<0,5	S	0,5	Carbapenemicos		Quemadura de torax	Unidi	
191018174	Cinetobacter freundii	S	<2			R							>64						R	>64	R	>64		S	1		R	>16	S	<0,25	S	0			R	>128			Carbapenemicos		Secrecion	UCI			
190521336	Klebsiella Pneumoniae																		R	R							S	R		R					R				SANGRE	Ciruj					
190411302	Morganella Morganii		R			R													R									R		R						R				Tejido oseco	Ciruj				
190729321	Klebsiella Pneumoniae	S	<2			R	>32						>64	R	16			R	>64	R	>64	R	>64	R	>4		R	>16	R	>16	R	>16			R	>128	S	<0,5	S	<0,5	Carbapenemasa		Heces	Neon	
190430328	Klebsiella Pneumoniae																		R	64	R	64		R	4		R	16		R	16	S	16	R	16	R	320			Carbapenemasa		Orina	Hemc		
190708020	Klebsiella Pneumoniae	R	2		R	32	R	32	R	64	R	64							R	64	R	64		R	4		R	16	R	16	R	16			R	128			Carbapenemasa		Orina	Medi			
190518066	Enterobacter cloacae	S	2			R	64						64						R	64	R	64		R	4		R	16	R	16	R	16			R	128			Carbapenemasa		Sangre	Hemc			
190731027	Escherichia Coli	S			R	R													R	R				I			S	R										Carbapenemasa (KPC)		Orina	UCI				
190426443	Klebsiella Pneumoniae																																							Orina	Hemc				
190605274	Klebsiella AEROGENES																																							Orina	UCI				
190607156	Klebsiella Pneumoniae	R	>64			R	>64						>64						R	>64	R	>64		R	>4		R	>16	R	>16	R	>16			R	>128	S	2		Carbapenemasa (KPC)		Herida Quirurgica	Ciruj		
190907021	Klebsiella Pneumoniae	S	2			R	32						8						R	64	R	64		S	1		R		R	16	R	16			R	128			Carbapenemasa		Exudado de Herida de Gluteo	Ciruj			
190803236	Klebsiella Pneumoniae	S	<2			R	>32						2	R	8				R	16	R	>64	R	>64	S	1		R	>		R	>16	S	32	S	2	R	>320			Carbapenemicos		Orina	UCI	
190720096	Klebsiella Oxytoca	S	<2			R	>32						>64	R	16				R	>64	R	>64		R	>4		R	>16	R	>16	R	>16			R	>128	S	<0,5	S	<0,5	Carbapenemasa		Orina	Neon	
190628406	Klebsiella Pneumoniae	R	>64			R	>32						>64	R	>64				R	>64	R	>64		R	>4		R	>16	R	>16	R	>16			R	>128	S	2	S	>0,5	Carbapenemicos		izquierda	Ciruj	
190427026	Klebsiella Pneumoniae	R	64	R	32	R	32	R	32				64						R	64	R	64		R	4		R	64	R	8	R	16			R	128	S	2			Carbapenemicos		Sangre	Medi	
190521366	Klebsiella Pneumoniae																																								Sangre	Ciruj			
190414068	Klebsiella Pneumoniae	S	<2			R	>32						>64	R	16				R	>64	R	>64		R	>4		R	>16	R	>16	R	>16			R	>128	S	1	S	<0,5	Carbapenemasa		Abceso de clavicula	Neon	
190605221	Klebsiella Pneumoniae	R	64			R	32						64						R	64	R	64		R	4		R	16		R	16	R	16	R	512	R	16	R	320			Carbapenemasa (KPC)		Orina	Medi
190508371	Klebsiella Oxytoca																																								ORINA	Medi			
190815111	Klebsiella Pneumoniae	R	>64			R	>32						>16						R	>32	R	>32		R	>1		R	>16	R	>4	R	>4								Carbapenemicos		Orina	UCI		
191227340	Klebsiella Pneumoniae	R																		R	R							R	R	R										Carbapenemicos		Sangre	UCI		
190610034	Klebsiella Pneumoniae	R	64			R	32						64						R	64	R	64		R	4		R	16	R	16	R	16			R	128	S	2			Carbapenemasa		Sangre	UCI	
190520354	Klebsiella Pneumoniae	R	>64			R	>32	R	>32				>64	R	>64	R	>64			R	>64	R	>64		R	>4		R	>16		R	>16	R	>512	R	>16	R	>320			Carbapenemasa (KPC)		Orina	Medi	
190606070	Klebsiella Pneumoniae	S	<2			R	>32	R	>32				16	R	>64				R	>64	R	>64		R	>4		R	>16		R	>16									Carbapenemicos (KPC)		Herida de Cateter	Hemc		
190516248	Klebsiella Pneumoniae																																								LCR	UCI			
190722260	Klebsiella Pneumoniae	S	<2			R	>32						>64	R	>64	R	>64			R	>64		R	>4			R	>16		R	>16	S	32	R	>16	S	<20			Carbapenemasa		Orina	Neon		


11.3 Anexo 3

Protocolo Reconstitución de cepas

 <p>1859</p>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico	Revisado/ Autorizado: Lic. Carmen Ullauri G. Mg. Sc.
	PROTOCOLO PARA RECONSTITUCIÓN DE CEPAS	Fecha de Elaboración: Marzo- 2021
		Versión: 001
		Paginas: 1
Área: Laboratorio		
Responsible: Estudiante		
Objetivo: Reconstitución de Cepas		
Indicaciones: Reconstitución de Cepas		
Materiales <ul style="list-style-type: none"> • Cajas de Agar Sangre • Hisopos • Medios con glicerina • Crioperlas para la conservación de cepas • Suero Fisiológico • Medios de infusión cerebro corazón 	Equipos <ul style="list-style-type: none"> • Incubadora 	
Procedimiento: <ul style="list-style-type: none"> • Se registró los datos de cepas congeladas • Se descongelo las cepas que se encontraban en las crio perlas de conservación de cepas o en glicerina. • Se incubaron las cepas en agar Sangre por 24 horas a 37°C. • Se trasladó las cepas en medios de infusión cerebro corazón rotulas has los laboratorios de Biología Molecular para su procesamiento. 		
Nota: Protocolo que indica pasos y recomendaciones para la reconstitución de cepas. Elaborado por la autora en base a los conocimientos adquiridos en la carrera de Laboratorio Clínico.		

11.4 Anexo 4

Protocolo de extracción de ADN de cepas aisladas

 <p>1859</p>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico	Revisado/ Autorizado: Lic. Carmen Ullauri G. Mg. Sc.
	PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS CEPAS AISLADAS	Fecha de Elaboración: Marzo- 2021
		Versión: 002
		Paginas: 2
Área: Laboratorio		
Responsable: Estudiante		
Objetivo: Extracción del ADN de las cepas aisladas		
Indicaciones: Extracción del ADN de las cepas aisladas		
Materiales <ul style="list-style-type: none"> • Tubos eppendorf de 1.5 ml • Tubos columna • TL Buffer • Proteinasa K • RNasa • Buffer GB • Etanol Absoluto • Tapón WA 1 • Tapón W2 • EA • Pipetas Graduadas • Puntas para pipetas 	Equipos <ul style="list-style-type: none"> • Incubadora • Centrifuga 	

Procedimiento:

- Se recogió las células bacterianas centrifugando a 8.000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante.
- Se agregue 180 µl de TL Buffer al sedimento celular recolectado y se resuspendio completamente usando un mezclador vórtex o por pipeteo. Se transfirió la suspensión celular a un tubo de 1,5 ml o 2 ml.
- Se añadió 20 µl de proteinasa K y 10 µl de RNasa, se mezcló en vórtex.
- Se incubaron a 60 ° C durante 1 hora.
- Luego se agregó 200 µl de Buffer GB y se mezcló inmediatamente en vórtex.
- Se Añadió 400 µl de etanol absoluto, mezclándose bien por pipeteo.
- Se transfirió con cuidado el lisado al depósito superior del tubo de la columna de unión se ajustó con un tubo de recolección.
- Se centrifugo a 8.000 rpm durante 1 min.
- Se desechó la solución del tubo de recolección y se reutilizo el tubo de recolección.
- Se añadió 500 µl de tampón WA1 sin mojar el borde, cierre el tubo y centrifugue a 8.000 rpm durante 1 min.
- Se desechó la solución del tubo de recolección y se reutilizo el tubo de recolección.
- Se añadió 500 µl de tampón W2 sin mojar el borde, se cierro el tubo y centrifugo a 8.000 rpm durante 1min.
- Deseche la solución del tubo de recolección y reutilice el tubo de recolección.
- Se centrifugo una vez más a 13.000 rpm durante 1 minuto para eliminar el etanol por completo y comprobar que no haya ninguna gota adherida al fondo del tubo de la columna de unión.
- Se transfirió el tubo de la columna de unión a un nuevo tubo de 1,5 ml para elución, agregando 50-200 µl de EA
- Se utilizó agua libre de nucleasas en el tubo de la columna de unión y esperamos al menos 1 minuto a temperatura ambiente 15 -25 °C 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, se esperó 5 minutos después de agregar el tampón EA. El volumen de EA agregado fue de µl. Un volumen menor dará como resultado una solución más concentrada.
- Se centrifugo a 8.000 rpm durante 1 minuto para eludir. (Corporation, 2018)

Bibliografía

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

11.5 Anexo 5

**Protocolo de procesamiento molecular por reacción en cadena de la polimerasa
convencional**

 <p align="center">1859</p>	<p align="center">UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico</p>	<p>Revisado/ Autorizado: Lic. Carmen Ullauri G. Mg. Sc.</p>														
	<p align="center">PROTOCOLO PARA PROCESAMIENTO MOLECULAR POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CONVECCIONAL</p>	<p>Fecha de Elaboración: Marzo- 2021</p>														
		<p>Versión: 002</p>														
		<p>Páginas: 2</p>														
<p>Área: Laboratorio</p>																
<p>Responsable: Estudiante</p>																
<p>Objetivo: Procesamiento molecular por reacción en cadena de la polimerasa convencional</p>																
<p>Indicaciones: Reacción en cadena de la polimerasa convencional</p>																
<p>Materiales Tubos eppendorf GoTaq® Green Master Mix 2X ADN Primers Agua Ultra pura Agarosa TBE 0.5X</p>	<p>Equipos Balanza Termociclador Cámara de electroforesis Fotodocumentador</p>															
<p>Procedimiento: Preparación del Master Mix Se agregó 12.5 ul de master mix, 3.5 de agua ultra pura, 0.5 primer rev, 0.5 primer fw de cada uno de los genes y 3 ul de ADN completando un total de 21 ul. Se llevó al termociclador mediante las siguientes temperaturas según (Rebelo et al., 2018).</p> <table border="1"> <tr> <td>Desnaturalización inicial</td> <td>94°C por 15 minutos</td> <td rowspan="5">Ciclado de 25 ciclos</td> </tr> <tr> <td>Desnaturalización</td> <td>94°C por 30 segundos</td> </tr> <tr> <td>Hibridación</td> <td>58°C por 90 segundos</td> </tr> <tr> <td>Extensión</td> <td>72°C por 60 segundos</td> </tr> <tr> <td>Extensión final</td> <td>72°C por 10 minutos</td> </tr> <tr> <td>Enfriamiento</td> <td>4°C</td> <td></td> </tr> </table>			Desnaturalización inicial	94°C por 15 minutos	Ciclado de 25 ciclos	Desnaturalización	94°C por 30 segundos	Hibridación	58°C por 90 segundos	Extensión	72°C por 60 segundos	Extensión final	72°C por 10 minutos	Enfriamiento	4°C	
Desnaturalización inicial	94°C por 15 minutos	Ciclado de 25 ciclos														
Desnaturalización	94°C por 30 segundos															
Hibridación	58°C por 90 segundos															
Extensión	72°C por 60 segundos															
Extensión final	72°C por 10 minutos															
Enfriamiento	4°C															

Preparación del gel de electroforesis

Se preparó suficiente cantidad de tampón de electroforesis para llenar el tanque de Electroforesis y para moldear el gel.

Se pesó la cantidad apropiada de polvo de agarosa 1.5 g en un matraz Erlenmeyer.

Se agregó 100 ml de tampón TBE 1X a temperatura ambiente, taparlo ligeramente el cuello del matraz con un tapón.

Se calentó el matraz en el microondas hasta verificar la disolución completa de la agarosa, logrando una solución transparente.

Se añadió 500ul de Sybr Safe al matraz y homogenizamos.

Se preparó la cámara de electroforesis colocando los peines para formar las ranuras de muestra en el gel.

Se vertió la agarosa enfriada en la bandeja de gel y se esperó 10 minutos hasta que solidifique.

Se retiró las dos reglas de separación de ambos extremos con los peines, desmontando la bandeja que contiene el gel en el tanque de electroforesis y se agregó el tampón de electroforesis suficiente (TBE 1X) para cubrir.

En cada ranura se colocó 10 ul de cada muestra, para los extremo del gel se situó el marcado de peso molecular 4 ul.

Se cargó lentamente la mezcla de muestra en las ranuras del gel usando una pipeta.

Se cierra la tapa del tanque de gel y se acoplo las flexiones eléctricas para que el ADN migre hacia el ánodo positivo, aplicándose un voltaje de 130 V) durante 1 hora o hasta que el tinte azul haya migrado a una distancia adecuada a través del gel.

Se apagó la corriente eléctrica al final de la corrida, se retiró las flexiones y la tapa del tanque.


Se examinó el gel y la fotografía bajo luz ultravioleta.

Bibliografía

Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S. A., de Frutos, C., Escobar, Malhotra-Kumar, S., Villa, L., ... Hendriksen, R. S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance*, 23(6), 1–11. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>

11.6 Anexo 6

Secuenciación de los primers utilizados para la identificación de los 5 genes de *mcr*

 <p>1859</p>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico	Revisado/ Autorizado: Lic. Carmen Ullauri G. Mg. Sc.
	Secuenciación de Primers	Fecha de Elaboración: Marzo- 2021
		Versión: 001
		Paginas: 1
Área: Laboratorio		
Responsable: Estudiante		
Objetivo: Secuenciación de los primers		
GEN Secuencia del Primer		
<i>mcr-1</i>	REV: 5'- AGATCCTTGGTCTCGGCTTG-3' FW: 5'- AGATCCTTGGTCTCGGCTTG-3'	
<i>mcr-2</i>	REV: 5'- CAAGTGTGTTGGTTCGCAGTT-3' FW: 5'- TCTAGCCCGACAAGCATACC-3'	
<i>mcr-3</i>	REV: 5'- AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG-3' FW: 5'- AATGGAGATCCCCGTTTTT-3'	
<i>mcr-4</i>	REV: 5'- TCACTTTCATCACTGCGTTG-3' FW: 5'- TTGGTCCATGACTACCAATG-3'	
<i>mcr-5</i>	REV: 5'- ATGCGGTTGTCTGCATTTATC-3' FW: 5'-TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG -3	
Bibliografía		
Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S. A., de Frutos, C., Escobar, Malhotra-Kumar, S., Villa, L., ... Hendriksen, R. S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> , <i>mcr-4</i> and <i>mcr-5</i> for surveillance purposes. <i>Eurosurveillance</i> , 23(6), 1–11. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672		

11.7 Anexo 7

Base de datos según la bacteria aislada y el gen de resistencia identificado

Codigo	Microorganismo	Mecanismo de resistencia	Gen	Muestra	Servicio	Infección	Edad	Sexo		Bacteria Aislada
								H (hombre)	M (mujer)	
191103203	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemasa		Orina	Cirugia		73	H		Gram Negativa
191103143	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemasa KPC		Exudado de cadera derecha	Medicina Interna		60	M	Gram Negativa	Gram Negativa
190929083	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemasa KPC		Herida de Nefrostomia	Medicina Interna		79	M		Gram Negativa
191025278	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemicos		Orina	Medicina Interna		81	H		Gram Negativa
190913285	Escherichia Coli	Carbapenemicos		Quemadura de torax	Unidad de Quemados		25	H		Gram Negativa
191018174	Cinetobacter freundii	Carbapenemicos	MCR 2	Secrecion	UCI		65	H		
190521396	Klebsiella Pneumoniae			SANGRE	Cirugia		94	H		
190411302	Morganella Morganii			Tejido oseco	Cirugia		16	H		
190729321	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemasa		Heces	Neonatologia		12 D	H		Gram Negativa
190430328	Klebsiella Pneumoniae			Orina	Hemodialisis		39	M		
190708020	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemasa		Orina	Medicina Interna					
190518066	Enterobacter cloacae	Carbapenemasa		Sangre	Hemodialisis		24	M		Gram Negativa
190731027	Escherichia Coli	Carbapenemasa (KPC)			UCI		61	H		Gram Negativa
190426443	Klebsiella Pneumoniae			Orina	Hemodialisis		64	M		
190605274	Klebsiella aerogenes				UCI		80	H		
190607156	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemasa (KPC)		Herida Quirurgica	Cirugia		49	M		Gram Negativa
190907021	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemasa		Exudado de Herida de Gluteo	Cirugia		41	H		Gram Negativa
190809236	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemicos		Orina	UCI		44	H		Gram Negativa
190720096	Klebsiella Oxytoca	Carbapenemasa	MCR 5	Orina	Neonatologia		18 D	M		Gram Negativa
190628406	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemicos		izquierda	Cirugia		67	H		Gram Negativa
190427026	Klebsiella Pneumoniae			Sangre	Medicina Interna		64	M		
190521366	Klebsiella Pneumoniae	KPN		Sangre	Cirugia		94	H		
190414068	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemasa		Absceso de clavícula	Neonatologia		21 D	H		Gram Negativa
190605221	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemasa (KPC)		Orina	Medicina Interna		80	H		Gram Negativa
190508371	Klebsiella Oxytoca			ORINA	Medicina Interna		78	M		
190815111	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemicos		Orina	UCI		21	M		Gram Negativa
191227340	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemicos		Sangre	UCI					
190610034	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemasa		Sangre	UCI		51	H		Gram Negativa
190520354	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemasa (KPC)		Orina	Medicina Interna		83	M		Gram Negativa
190606070	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemicos (KPC)		Herida de Cateter	Hemodialisis		71	H		Gram Negativa
190516248	Klebsiella Pneumoniae			LCR	UCI		69	M		
190722260	Klebsiella Pneumoniae	Carbapenemasa		Orina	Neonatologia		8 D	H		Gram Negativa

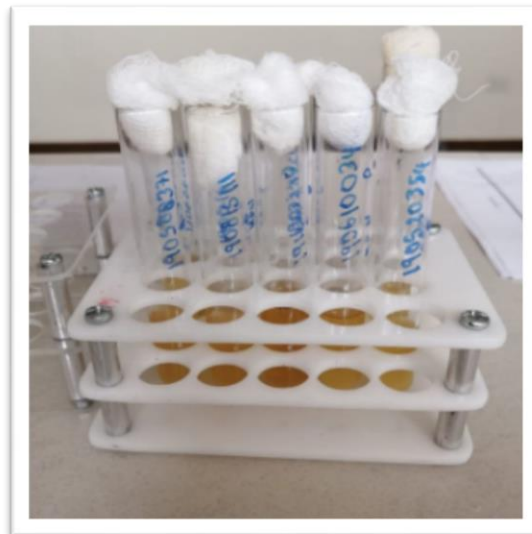
11.8 Anexo 8

Evidencias Fotográficas

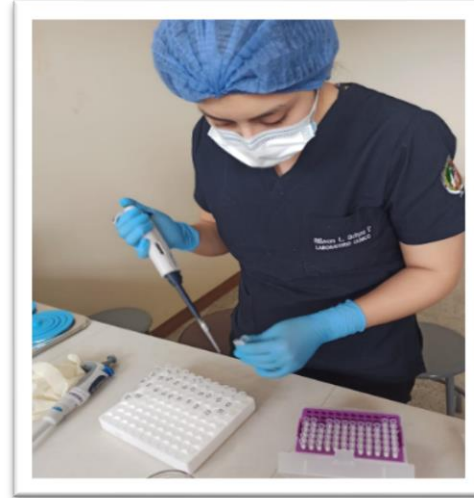
Preparación de medios de cultivo



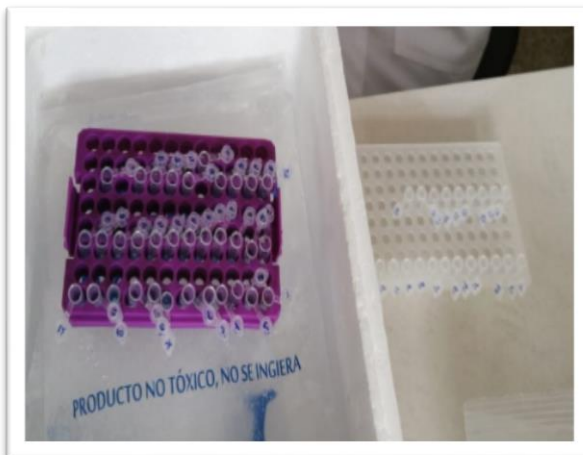
Cepas recuperadas, enriquecidas en infusión cerebro-corazón.



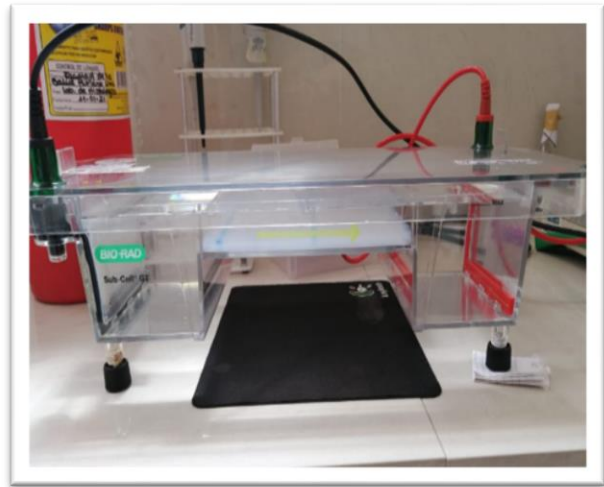
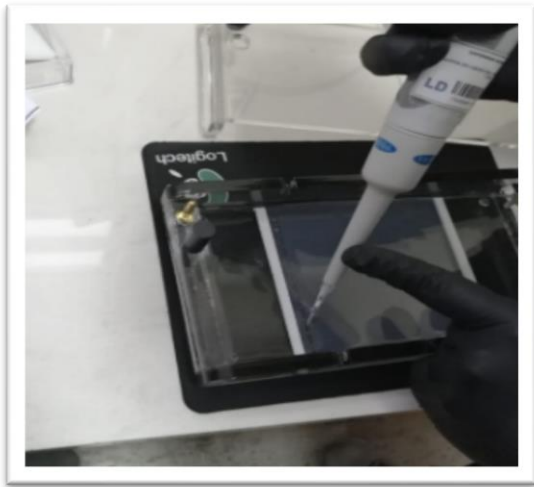
Extracción de ADN de las cepas en estudio



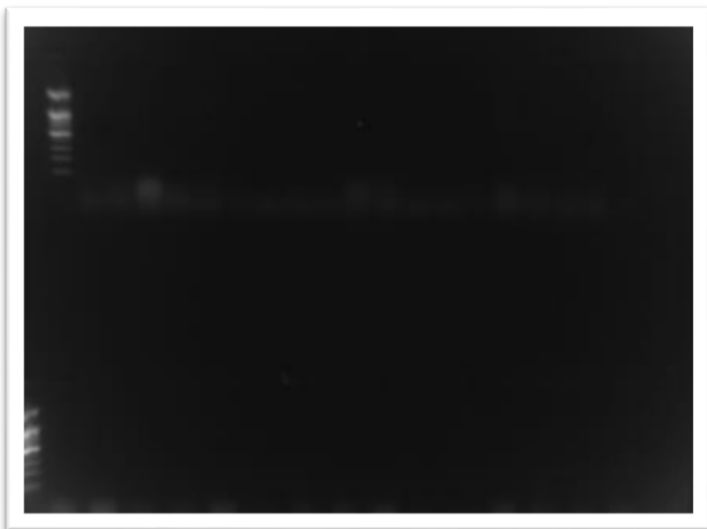
PCR convencional



Gel de electroforesis



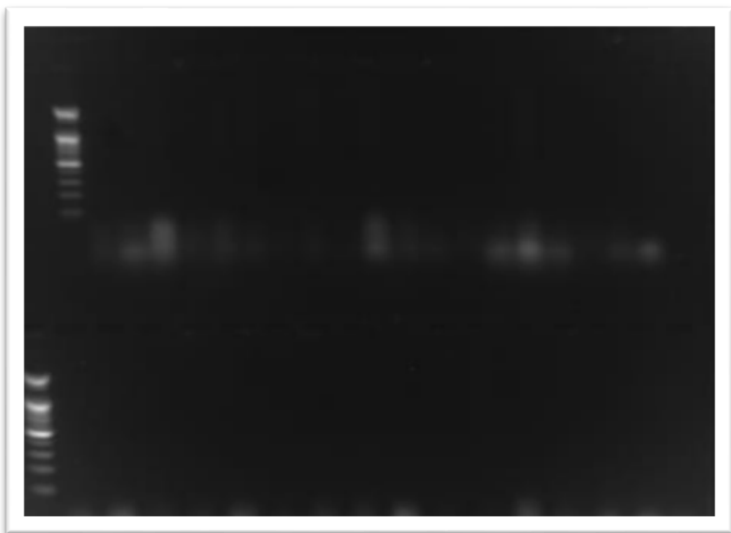
Resultados de cada Gen *mcr*



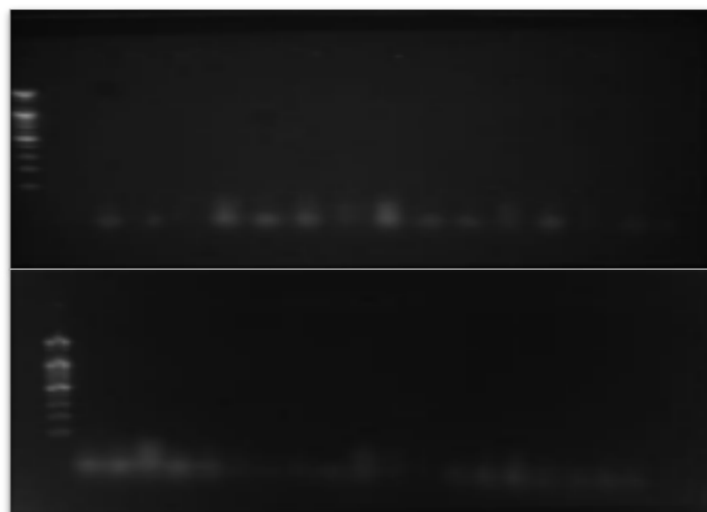
Gen *mcr-1*



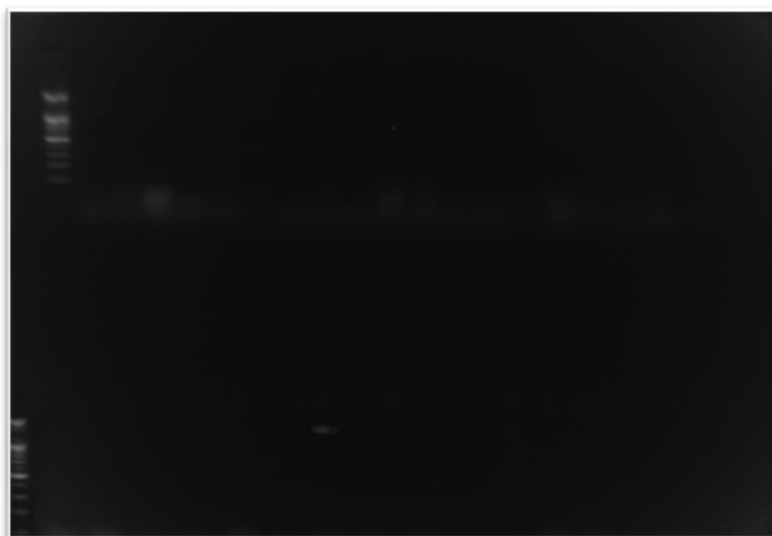
Gen *mcr-2*



Gen *mcr-3*



Gen *mcr-4*



Gen *mcr-5*

11.9 Anexo 9

Certificado de Traducción

Loja, 22 de noviembre del 2021

Bq. F

María Cristina Cueva

PROFICIENTE EN EL IDIOMA INGLÉS

CERTIFICO:

Que he realizado la traducción de español a inglés del resumen derivado de la tesis denominada **“Colistin resistencia en Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes hospitalizados”**, de autoría de la Srta. **Allison Loretho Ochoa Paz** portadora de la cedula de identidad número **1150352514**, egresada 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 dirección de la Mg Sc. Carmen Ullauri G, previo a la obtención del título de Licenciada en laboratorio Clínico.

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

Bq.F. María Cristina Cueva C

Proficiente en el idioma Inglés

Res. Min. 034-SD-DINEPP