

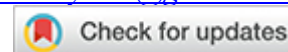
Resistencia antimicrobiana en bacilos Gram negativos clínicos: caracterización fenotípica y genotípica en Ecuador

Antimicrobial resistance in clinical Gram-negative bacilli: phenotypic and genotypic characterization in Ecuador

Sandra Balvina Tamami Tualombo  ^{*1}, María Fernanda Yauri Bucheli  ¹,
Iliana Del Rocío Alcocer Negrete  ¹

¹Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), Quito, Ecuador.
sbtamami@puce.edu.ec, iralcocer@puce.edu.ec, mfyaurib@puce.edu.ec

*Autor de correspondencia: sandrytatu@gmail.com



RESUMEN

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

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

ABSTRACT:

Antimicrobial resistance (AMR) is a major global public health threat, hampering the use of antimicrobials for the treatment of bacterial infections. In this study, we characterized the phenotypic and genotypic profiles of antimicrobial resistance determinants in clinically derived bacteria from infectious processes in patients treated in hospitals in Quito, Ecuador. Nine bacterial isolates selected from the Catholic Bacterial Collection - Quito (CB-QCA) of the Microbiology Laboratory of the Pontifical Catholic University of Ecuador, preserved at -20°C and -80°C, were analyzed. One *E. coli* isolate, three *Klebsiella pneumoniae* isolates, two *Proteus mirabilis* isolates, and three *Pseudomonas aeruginosa* isolates were analyzed. Phenotypic antibiotic

susceptibility testing and mCIM and eCIM tests were performed using the disk diffusion method. Genotypic characterization of beta-lactam and carbapenemase resistance genes was performed by polymerase chain reaction (PCR). The results revealed a high prevalence of resistance among isolates, with β -lactams, quinolones and aminoglycosides being the most commonly detected antibiotic classes. The findings highlight the need for continued surveillance of antimicrobial resistance patterns.

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

INTRODUCCIÓN

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

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

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

La transferencia horizontal de genes constituye una ruta altamente eficaz para la diseminación de genes de resistencia ya que, no solo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas mediante estas estructuras genéticas móviles. Donde juega un papel protagónico los plásmidos, transposones e integrones⁴ esto que permite la dispersión de la resistencia y favorece la aparición de brotes a nivel hospitalario. El uso indiscriminado e inapropiado de antibióticos, combinado con un control deficiente de infecciones intrahospitalarias, es uno de los factores que contribuyen a la diseminación de los mecanismos de resistencia^{5, 6}.

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

Las enterobacterias son un grupo diverso y ampliamente distribuido en la naturaleza. El 80% corresponden a los aislamientos Gram negativos en enfermedades humanas. En general, las enterobacterias causantes de infecciones han desarrollado mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos. El más importante

de estos mecanismos es la producción de enzimas betalactamasas; estas enzimas son de naturaleza proteica y son codificadas por genes de origen cromosómico o plasmidial ⁵.

Los antibióticos betalactámicos representan el principal grupo de antibióticos más seguros, eficaces y ampliamente utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas ⁸. Estos agentes actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana como resultado de su fuerte unión covalente a las proteínas ligadoras de penicilina PBP (por sus siglas en inglés “penicillin-binding-proteins”) ⁹ que catalizan una serie de reacciones de transpeptidación y carboxipeptidación necesarias para la síntesis de la pared celular y además activan una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano. ¹⁰

Los antibióticos betalactámicos tienen una estructura común llamada anillo betalactámico. La presencia de grupos sustitutivos unidos al anillo betalactámico establece su clasificación en: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactámicos. Las penicilinas han sido, por largo, tiempo el tratamiento de elección para infecciones humanas. Las cefalosporinas tienen un gran abanico de acción y pueden ser de primera, segunda, tercera, cuarta y quinta generación ¹¹. Los carbapenemes se usan en infecciones intrahospitalarias y en infecciones causadas por bacterias resistentes a quinolonas, aminoglucósidos y otros antibióticos de amplio espectro ¹².

Se han descrito alrededor de 8100 betalactamasas ¹³. Las betalactamasas son enzimas bacterianas que inactivan a los antibióticos betalactámicos por hidrólisis. Se han clasificado de acuerdo a dos esquemas generales; la clasificación molecular de Ambler y el sistema de clasificación funcional de Bush–Jacoby–Mideros ¹⁴. Para el presente estudio tomaremos en consideración la clasificación de Ambler.

"Ambler (1980) propuso una clasificación de betalactamasas en cuatro clases (A, B, C, D) basándose en similitudes aminoacídicas. Las clases A, C y D son serin-betalactamasas, mientras que la clase B son metalo-betalactamasas, diferenciándose por el mecanismo de hidrólisis del anillo betalactámico: serina en el sitio activo para las primeras y un ion zinc para las últimas ¹⁵.

"Las betalactamasas de clase A, como TEM, SHV, GES y CTX-M, se encuentran en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, codificadas en plásmidos y cromosomas." En la clase D, OXA-48 es común en enterobacterias. Las enzimas de clase C, BLEE y carbapenemasas son de mayor interés en Enterobacterias ¹⁶.

Las betalactamasas de clase A son las más diversas, incluyendo enzimas como KPC ¹⁷, que hidrolizan casi todos los betalactámicos. Las de clase B (metalo-betalactamasas) como IMP, VIM y NDM son inhibidas por quelantes metálicos ^{18,19}.

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

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio y aislados bacterianos

La población de estudio estuvo constituida por nueve aislados bacterianos de origen clínico, previamente seleccionados de la Colección Bacteriana – Quito Católica (CB-QCA) del Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Se incluyeron: *Escherichia coli* (n = 1), *Proteus mirabilis* (n = 2), *Klebsiella pneumoniae* (n = 3) y *Pseudomonas aeruginosa* (n = 3). Los aislados seleccionados habían sido caracterizados como productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), serin β -lactamasas y metalo- β -lactamasas (MBL).

Reidentificación de los aislados

Los aislados preservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron reactivados en caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco™) e incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18–24 h. Posteriormente se subcultivaron en agar nutriente, agar eosina azul de metileno (EMB), agar cetramida o agar Hektoen (Difco™) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

La identificación de enterobacterias se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales: Citrato de Simmons, Sulfuro-Indol-Motilidad (SIM), Hierro triple azúcar (TSI), Rojo de metilo (RM), Voges-Proskauer (VP), Urea, Fenilalanina (FA) y Motilidad-Indol-Lisina (MILI).

En el caso de *P. aeruginosa*, la identificación incluyó la prueba de citocromo oxidasa (OxiStrips™, Hardy Diagnostics) y pruebas complementarias de motilidad, indol y descarboxilación de lisina (MIO, MILI).

Confirmación por espectrometría de masas

La identificación definitiva de los aislados se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization, time of flight), reconocida como una herramienta rápida y precisa para la identificación bacteriana²⁰. Los análisis se efectuaron en el Centro de Investigación Microbiológica (Guayaquil, Ecuador).

Confirmación fenotípica de β -lactamasas

- **β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).**

La detección de BLEE se realizó mediante el método de difusión en disco, siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2023)²¹. Se utilizaron discos de ceftazidima (30 μg) y cefotaxima (30 μg), así como sus combinaciones con ácido clavulánico (30/10 μg). Se interpretó como positivo un incremento $\geq 5\text{ mm}$ en el halo de inhibición en presencia del inhibidor.

- **Serin β -lactamasas (mCIM).**

La detección de serin β -lactamasas se llevó a cabo mediante el método *Modified Carbapenem Inactivation Method* (mCIM). Colonias bacterianas se incubaron en caldo TSB con un disco de meropenem (10 μg) durante 4 h a $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. El disco se transfirió luego a placas de MHA inoculadas con *E. coli* ATCC 25922 (0,5 McFarland). La interpretación de halos de inhibición se realizó de acuerdo con las guías CLSI, 2024.

• **Metalo β-lactamasas (eCIM).**

Los aislados con sospecha de carbapenemasa fueron confirmados mediante el método *EDTA-modified Carbapenem Inactivation Method* (eCIM), complementario al mCIM^{22,23}. Se consideró positivo un incremento ≥5 mm en el halo de inhibición en presencia de EDTA.

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

La detección molecular de genes de resistencia se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los genes analizados incluyeron **blaCTX-M**, **blaTEM** y **blaSHV**²⁴.

Las reacciones de PCR (25 µL) incluyeron: 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 µL de cada cebador (forward y reverse), 1 µL de ADN bacteriano y 9,5 µL de agua grado molecular. Los programas de amplificación siguieron las especificaciones previamente publicadas. Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con SYBR® Gold (Invitrogen).

Gen objetivo	Cebadores (F/R)	Secuencia (5'–3')	Tamaño del amplicón (pb)	Condiciones de amplificación	Ref
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M F	ATGGTTAAAAAATCACTG	900pb	DSNTi, 95 °C por 2 min 95 °C/ 30 s 43 °C/30 s a 35 ciclos 72 °C/30 s 72 °C / 5 min	25
	CTX-M R	TTACAAACCGTYGGTGAC			
<i>bla</i> _{SHV}	SHV F	TTTATCGGCCYTCCTCAAGG	990 pb	DSNTi, 94 °C por 2 min 94 °C/ 30 s 55 °C/30 s a 30 ciclos 72 °C/ 1min 72 °C / 7 min	26
	SHV R	GCTGCGGGCCGGATAACG			
<i>bla</i> _{TEM}	TEM F	ATAAAATTCTTGAAGACGAA	1000pb	DSNTi, 94 °C por 2 min 95 °C/ 30 s 54 °C/30 s a 30 ciclos 72 °C/ 30 s 72 °C / 5 min	27
	TEM R	GACACTTACCAATGCTTAATC			
<i>bla</i> _{KPC}	KPC F	CGGAACCATTCGCTAAACTC	700pb	DSNTi, 94 °C por 5 min 94 °C/ 30 s 55 °C/30 s a 30 ciclos 72 °C/ 30 s 72 °C / 7 min	26
	KPC R	GGCCTCGCTGTRCTTGTCAT			
<i>bla</i> _{GES}	GES R	CTATTTGTCCGTGCTCAGG	800pb	DSNTi, 95 °C por 2 min 95 °C/ 30 s 53 °C/30 s a 30 ciclos 72 °C/ 30 s 72 °C / 7 min	26
	GES F	ATGCGCTTCATTCACGCAC			
<i>bla</i> _{VIM}	VIM R	TGGGCCATTGAGCCAGATC	400pb	DSNTi, 95 °C por 5 min 94°C/ 1min 52 °C/ 1min a 30 ciclos 72 °C/ 1min 72 °C / 7 min	26
	VIM F	ATGGTGTTTGGTCGCATATC			

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

Confirmación genotípica de serin β -lactamasas

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

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

Confirmación genotípica de metalo β -lactamasas

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

Los cebadores empleados en el proceso de PCR fueron:

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

RESULTADOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se analizaron un total de **9 aislados bacterianos patógenos** procedentes de la Colección Bacteriana – Quito Católica (CB-QCA) del Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. La distribución fue la siguiente: *Escherichia coli* (1/9; 11.1 %), *Proteus mirabilis* (2/9; 22.2 %), *Pseudomonas aeruginosa* (3/9; 33.3 %) y *Klebsiella pneumoniae* (3/9; 33.3 %).

La identificación inicial se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales y posteriormente fue **confirmada por espectrometría de masas MALDI-TOF**, obteniéndose **valores de score ≥ 2.0 en todos los casos**, lo que garantizó la identificación confiable a nivel de especie. No se registraron discrepancias entre la identificación bioquímica y la obtenida por MALDI-TOF.

En cuanto al **origen de las muestras clínicas**, se documentó la siguiente distribución: líquido sublingual (1/9; 11.1 %), líquido peritoneal (1/9; 11.1 %), aspirado traqueal (1/9; 11.1 %), orina (2/9; 22.2 %), hisopado cloacal de pollo (2/9; 22.2 %), herida (1/9; 11.1 %) y sonda (1/9; 11.1 %).

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

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

Aztreonam (ATM) (monobactámico), Tobramycin (Top) (aminoglucósido), Azitromicina (AZM) (nuevo macrólido) y Ciprofloxacina (Cip) (quinolona). De acuerdo a los 2 *Proteus mirabilis* se registraron resistencia: 2 a la Ampicilina (AMP)(penicilina), 2 a la Tobramycin (Top) (aminoglucósido), 2 a la Tetraciclina (TE), 2 a la Ciprofloxacina (CIP) (quinolona) y 1 a la Cefotaxime (CTX) (cefalosporina); y sensibilidad a: Amoxicilina/clavulánico (AMC) (agentes combiandos de β -lactámicos), meropenem (MEM), Imipenem (IMP) (carbapenemasa), Aztreonam (ATM) (monobactámicos) y Azitromicina (AZM) (nuevo macrólido).

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

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

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

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

Resistencia bacteriana en *Pseudomonas aeruginosa*

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

Confirmación fenotípica de la producción de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), serin β-lactamasas (mCIM) y metalo β-lactamasas (eCIM) para los 9 aislados estudiados.

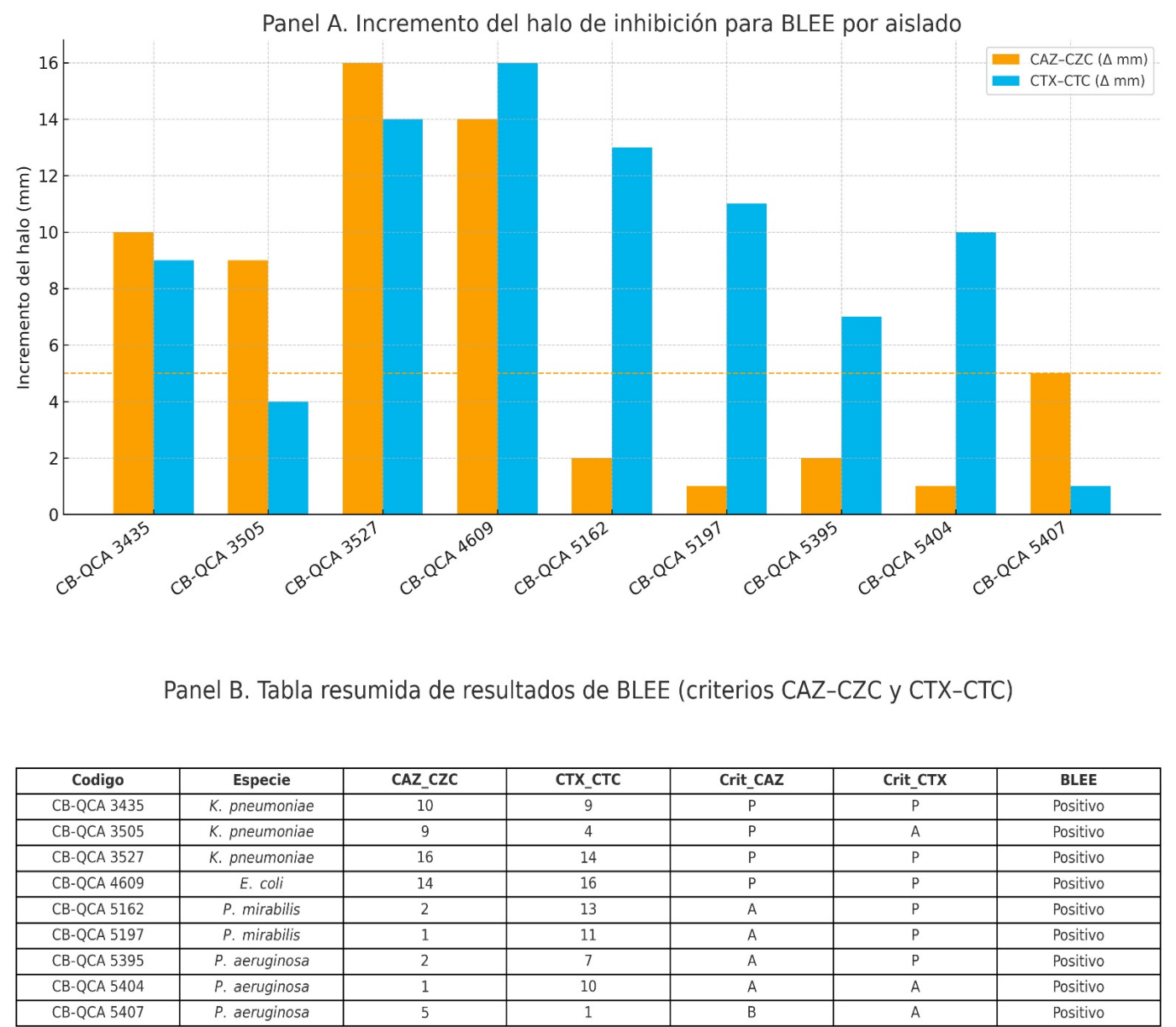


Figura 1. Confirmación fenotípica de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Panel A. Incremento del halo de inhibición (mm) en las pruebas CAZ–CZC y CTX–CTC por aislado bacteriano. La línea discontinua indica el umbral de 5 mm establecido por CLSI para considerar positividad. Los colores representan las diferentes especies bacterianas.

Panel B. Tabla resumen con los valores de incremento de halo y criterios interpretativos (P = positivo, A = ausente, B = borderline). Todos los aislados evaluados fueron positivos para BLEE.

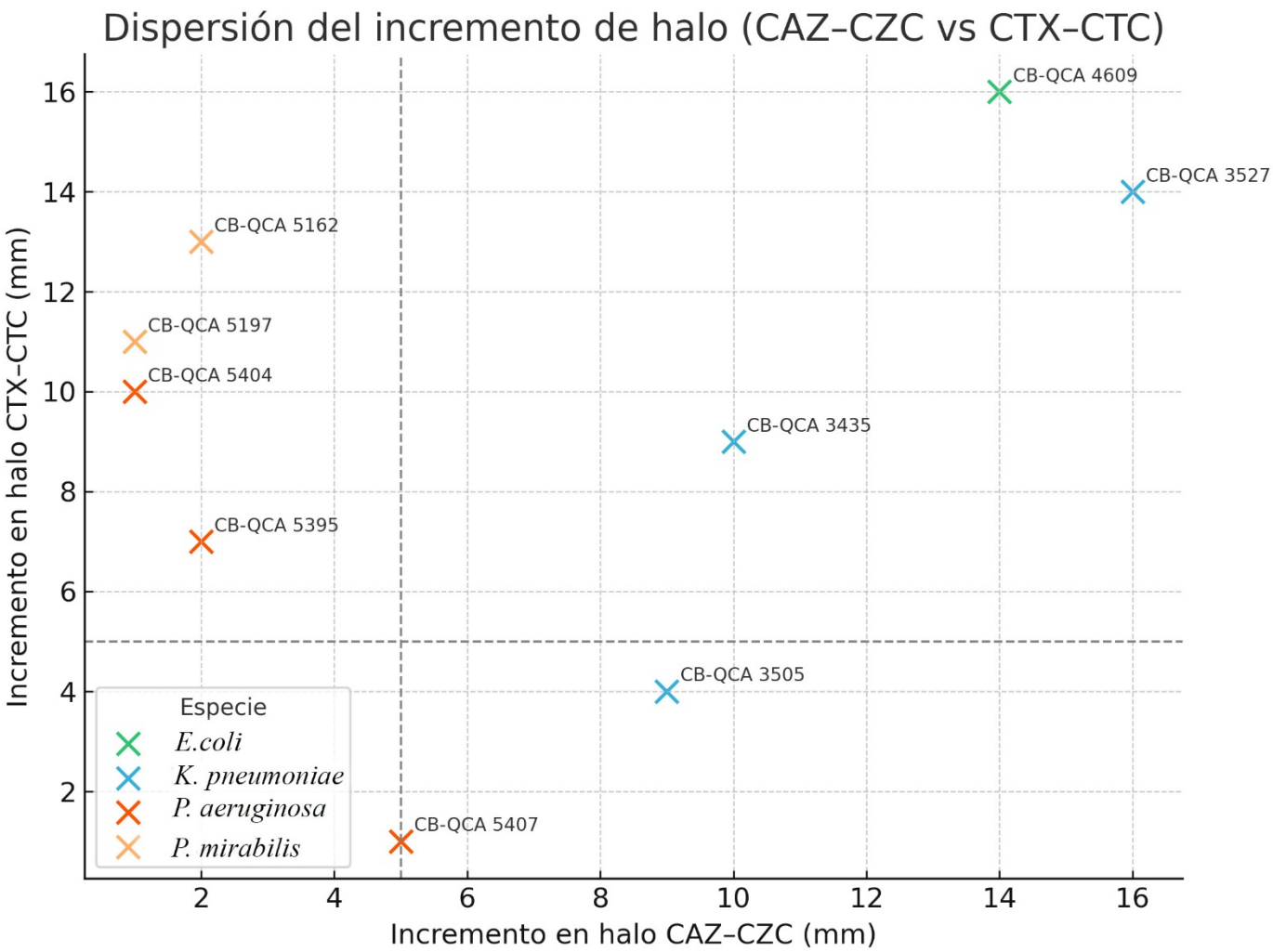


Figura 2. Diagrama de dispersión del incremento del halo de inhibición (mm) en pruebas de sinergia CAZ–CZC y CTX–CTC para la detección de BLEE. Cada punto corresponde a un aislado bacteriano, coloreado según la especie. Las líneas discontinuas marcan el umbral de ≥ 5 mm establecido por CLSI como criterio de positividad.

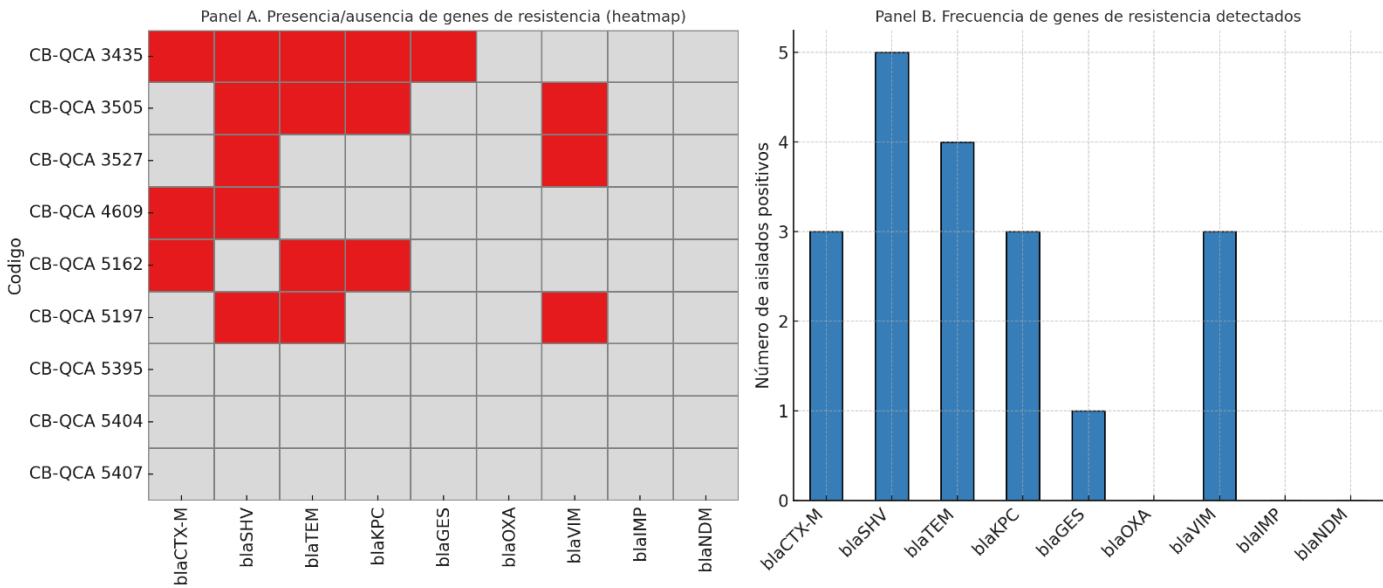


Figura 3. Detección genotípica de genes de resistencia en aislados bacterianos.
Panel A. Heatmap binario mostrando la presencia (rojo) o ausencia (gris) de genes codificantes de β-lactamasas (*bla*CTX-M, *bla*SHV, *bla*TEM, *bla*KPC, *bla*GES, *bla*OXA, *bla*VIM, *bla*IMP y *bla*NDM) en cada aislado bacteriano (CB-QCA).
Panel B. Frecuencia absoluta de aislados positivos para cada gen analizado.

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

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

De los 9 aislados presentando el gen *bla*CTX-M el 33,0 % (3/9); gen *bla*SHV 56,0 % (5/9); *bla*TEM 44,0 % (4/9); *bla*KPC 33,0 % (3/9); *bla*GES 11,0 % (1/9); *bla*VIM 33,0 % (3/9); los *bla*OXA 0,0 %; *bla*IMP 0,0 %; *bla*NDM 0,0 %.

Durante la amplificación de PCR no se visualizó la presencia de estos genes *bla*OXA 0,0 %; *bla*IMP 0.0 %; *bla*NDM 0,0 % .

En la **Tabla 2** se presentan los perfiles genotípicos de resistencia detectados en los aislados clínicos de la colección bacteriana CB-QCA. Se analizaron genes asociados a β-lactamasas de espectro extendido (*bla*CTX-M, *bla*SHV, *bla*TEM), serin β-lactamasas (*bla*KPC, *bla*GES, *bla*OXA) y metalo β-lactamasas (*bla*VIM, *bla*IMP, *bla*NDM) (Figura 4).

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

Tabla 2. Detección de genes de resistencia β-lactamasa en aislados de la colección bacteriana CB-QCA (Quito-Católica). *P*: gen presente; *A*: gen ausente.

Para visualizar de manera comparativa la detección de genes de resistencia, los resultados de PCR convencional fueron representados mediante un heatmap de presencia/ausencia y gráficos de barras de frecuencia. Esta aproximación reemplaza la presentación tradicional de geles de agarosa, permitiendo una interpretación más clara y cuantitativa de los datos.

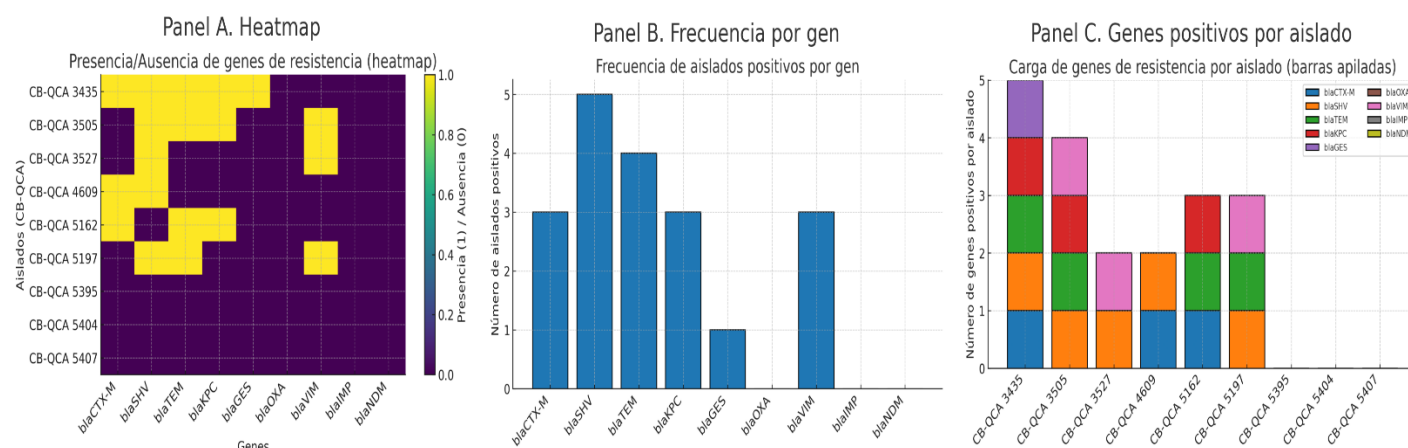


Figura 4. Representación gráfica de genes de resistencia detectados en aislados clínicos.

Panel A: Heatmap de presencia/ausencia de genes β -lactamasa (blaCTX-M, blaSHV, blaTEM, blaKPC, blaGES, blaOXA, blaVIM, blaIMP, blaNDM) en aislados de la colección CB-QCA.

Panel B: Frecuencia de aislados positivos por gen.

Panel C: Distribución de genes de resistencia por aislado (barras apiladas).

Se observa que blaSHV, blaTEM y blaCTX-M fueron los genes más prevalentes, mientras que blaOXA, blaIMP y blaNDM no fueron detectados en los aislados analizados.

Para confirmar la presencia de genes de resistencia se realizaron amplificaciones mediante PCR específicas para diferentes determinantes de β -lactamasas. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % teñido con SYBR® Gold (Invitrogen), visualizados bajo luz UV. A continuación, se muestran geles representativos de algunos genes detectados en los aislados clínicos estudiados.

Los resultados obtenidos mediante PCR confirmaron la presencia de genes de β -lactamasas en varios de los aislados estudiados. En particular, blaGES y blaSHV fueron detectados en diferentes proporciones, lo cual concuerda con lo descrito en otros estudios sobre la diseminación de determinantes genéticos de resistencia en enterobacterias y *Pseudomonas spp.* Estos hallazgos refuerzan la importancia del análisis molecular complementario a las pruebas fenotípicas, permitiendo una caracterización más precisa de los mecanismos de resistencia presentes en los patógenos clínicos.

DISCUSIÓN

La presente investigación evidencia la preocupante realidad de la resistencia a antimicrobianos (RAM) en aislados bacterianos clínicos preservados en el laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). Se observó resistencia frente a múltiples familias de antibióticos de primera línea, incluyendo penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas. Este patrón coincide con los reportes internacionales de la OMS y la OPS, que advierten sobre la diseminación global de la RAM y el riesgo creciente de infecciones intratables^{1,5,6}.

En este estudio se incluyeron nueve aislados representativos: *Escherichia coli* (11%), *Proteus mirabilis* (22%), *Pseudomonas aeruginosa* (33%) y *Klebsiella pneumoniae* (33%). Todas las bacterias fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas convencionales y confirmadas por espectrometría de masas MALDI-TOF, técnica reconocida como estándar de alta precisión en microbiología clínica²⁰. Los perfiles de resistencia observados reflejan lo descrito en Latinoamérica, donde la prevalencia de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas se mantiene en aumento^{28,29}.

Particularmente, se identificaron altos niveles de resistencia en *K. pneumoniae* frente a ampicilina, cefotaxima, aztreonam, tobramicina y ciprofloxacina, lo cual concuerda con reportes de Cuba y Perú, donde cepas productoras de BLEE superan el 40% en algunos hospitales^{27,28}. En Ecuador, el INSPI documentó desde 2010 la emergencia de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos mediada por la enzima KPC, con una incidencia creciente en los reportes de vigilancia nacional^{3,30,31}. Estos hallazgos tienen gran relevancia, pues *K. pneumoniae* es uno de los principales reservorios de genes de resistencia transferibles por plásmidos¹⁴⁻¹⁶.

En *E. coli*, se detectaron resistencias múltiples pero también sensibilidades residuales frente a carbapenémicos, hallazgo similar al descrito en la región, donde la prevalencia de BLEE alcanza cifras de hasta 50% en infecciones urinarias^{9,27}. *P. mirabilis* mostró un perfil intermedio, mientras que *P. aeruginosa* presentó los mayores porcentajes de multirresistencia, con dos aislados resistentes a casi todos los antibióticos probados. Este comportamiento es consistente con otros estudios que identifican a *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* como los principales productores de carbapenemasas en entornos hospitalarios latinoamericanos^{17,34}.

La representación mediante heatmap y gráficos facilita la identificación de patrones de resistencia a nivel genómico. En este estudio, la combinación de blaCTX-M, blaSHV y blaTEM en varios aislados refuerza la hipótesis de que estos genes son los principales determinantes de β -lactamasas de espectro extendido en el contexto latinoamericano^{11,24,26-28}.

Además, la visualización comparativa permite identificar con claridad los perfiles multigénicos en cepas de *K. pneumoniae* y *P. mirabilis*, lo que podría explicar sus fenotipos multirresistentes descritos en la literatura^{16,27,29}. Este enfoque gráfico constituye una alternativa moderna y más informativa que la presentación de geles de agarosa, y facilita la comparación de resultados entre estudios y centros de vigilancia.

La confirmación genotípica de genes de resistencia reveló la presencia de blaCTX-M, blaTEM y blaSHV, enzimas ampliamente distribuidas en enterobacterias y consideradas los determinantes más prevalentes de BLEE a nivel mundial^{11,24,26}. Estos resultados subrayan la importancia de la transferencia horizontal de genes mediante plásmidos como mecanismo clave en la rápida diseminación de la resistencia^{14,15}. Sin embargo, no se detectaron genes blaOXA, blaIMP ni blaNDM, lo que puede atribuirse a variabilidad genética, mutaciones en sitios de unión de los cebadores o baja expresión génica, factores descritos previamente como limitaciones de la PCR³⁵⁻³⁸.

Los resultados de este estudio se enmarcan en una problemática de gran impacto en salud pública. La RAM se proyecta como una de las principales causas de mortalidad global hacia el año 2050, con cifras estimadas de hasta 10 millones de muertes anuales si no se implementan medidas efectivas^{1,32}. En España y Europa, se calcula que las infecciones por bacterias multirresistentes ocasionan más de 33 000 muertes al año, con un elevado costo sanitario^{32,33}.

En el contexto ecuatoriano, la vigilancia nacional ha mostrado que *E. coli* es el principal microorganismo resistente (61%), seguido de *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *P. aeruginosa*^{30,31}. Esta tendencia coincide con lo observado en este trabajo, donde *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron los aislados más representativos.

En conjunto, los hallazgos de esta investigación refuerzan la necesidad de fortalecer los programas de vigilancia microbiológica en Ecuador, promover el uso racional de antibióticos y articular esfuerzos bajo el enfoque *One Health*, integrando salud humana, animal y ambiental^{5,32}. La implementación de estrategias como los programas de administración de antimicrobianos (*antimicrobial stewardship*), la mejora de las prácticas de higiene hospitalaria y el desarrollo de nuevas moléculas antibacterianas resultan fundamentales para contener esta amenaza^{6,16,32}.

Limitaciones

Este estudio presenta algunas limitaciones. En primer lugar, el tamaño de la muestra fue reducido ($n = 9$ aislados), lo que limita la posibilidad de extrapolar los hallazgos a la población bacteriana circulante en otras regiones del país. En segundo lugar, si bien la PCR permitió identificar genes de resistencia clave, la ausencia de detección de genes como *blaOXA*, *blaIMP* y *blaNDM* podría deberse a mutaciones en las secuencias diana, baja expresión génica o variabilidad regional, lo que puede generar falsos negativos^{35–38}. Finalmente, no se evaluaron variables clínicas asociadas, como la respuesta terapéutica de los pacientes o los desenlaces clínicos, lo cual restringe la correlación de los hallazgos microbiológicos con el impacto clínico real.

Perspectivas

Futuros estudios deberían incluir un mayor número de aislados y abarcar diferentes centros de salud del país para obtener un panorama más representativo. Además, se recomienda el empleo de técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) y paneles multiplexados, que ofrecen una mejor resolución en la identificación de variantes genéticas y permiten superar las limitaciones de la PCR convencional^{35–37}. Integrar la caracterización microbiológica con información clínica de los pacientes fortalecerá la aplicabilidad de los resultados en el manejo terapéutico y en las políticas de control de infecciones.

A pesar de estas limitaciones, este trabajo constituye un aporte novedoso en la vigilancia de la RAM en Ecuador, al combinar pruebas fenotípicas, genotípicas y confirmación por MALDI-TOF. Los hallazgos obtenidos proporcionan una base sólida para diseñar estudios multicéntricos de mayor escala y para apoyar los programas nacionales de vigilancia y control de resistencia antimicrobiana en concordancia con el enfoque *One Health*.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación confirman la elevada prevalencia de resistencia a antimicrobianos (RAM) en bacterias patógenas de importancia clínica. La resistencia se observó principalmente frente a antibióticos de las familias de los β -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos, lo que representa una amenaza significativa para el tratamiento de infecciones comunes y refuerza la necesidad de una vigilancia continua en el contexto local y regional.

El análisis de los nueve aislados clínicos seleccionados permitió caracterizar la distribución de especies con un predominio de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, seguidas de *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli*. Todas las bacterias fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas convencionales y confirmadas por espectrometría de masas MALDI-TOF, lo que asegura la precisión de la identificación y constituye un aporte metodológico relevante en la caracterización de la RAM en Ecuador.

Un aspecto novedoso de este trabajo es el enfoque integral empleado para la caracterización de los aislados. A nivel fenotípico, se corroboró la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), serin β -lactamasas y metalo β -lactamasas, confirmando la capacidad de los patógenos para inactivar diferentes

familias de antibióticos. A nivel genotípico, la detección de genes de resistencia como *blaCTX-M*, *blaTEM* y *blaSHV* mediante PCR aporta una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares que sustentan la resistencia en los aislados estudiados.

En conjunto, este estudio constituye uno de los primeros esfuerzos en Ecuador en integrar métodos fenotípicos, genotípicos y de espectrometría de masas para la caracterización de bacterias multirresistentes. Esta aproximación multidimensional no solo consolida los objetivos planteados, sino que también ofrece una base sólida para futuras investigaciones multicéntricas y para el fortalecimiento de los programas de vigilancia de la resistencia antimicrobiana en el país bajo un enfoque *One Health*.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). La OMS publica un informe sobre el estado de desarrollo de antibacterianos [Internet]. OMS; 2024 [cited 2024 Sep 3]. Available from: <https://www.who.int/es/news/item/14-06-2024-who-releases-report-on-state-of-development-of-antibacterials>
2. Camacho-Silvas LA. Resistencia bacteriana, una crisis actual. Rev Esp Salud Publica. 2023;97:e202311123.
3. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI). Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador 2014–2018. Ministerio de Salud Pública; 2018. p. 1–10.
4. da Silva JD, Bens L, Santos AJ do C, Lavigne R, Soares J, Melo LDR, et al. Isolation and characterization of the Acadevirus members BigMira and MidiMira infecting a highly pathogenic *Proteus mirabilis* strain. Microorganisms. 2023;11(9):2141.
5. Organización Mundial de la Salud. Semana Mundial de Concientización sobre el Uso de los Antimicrobianos 2021 [Internet]. OMS; 2021 [cited 2024 Sep 3]. Available from: <https://www.paho.org/es/campanas/semana-mundial-concientizacion-sobre-uso-antimicrobianos-2021>
6. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Un informe pone de relieve el aumento de la resistencia a los antibióticos en infecciones bacterianas que afectan al ser humano. OPS; 2022 Dec 9 [cited 2024 Sep 3]. Available from: <https://www.paho.org/es/noticias/9-12-2022-informe-pone-relieve-aumento-resistencia-antibioticos-infecciones-bacterianas>
7. Espinoza González AG, Pineda Sánchez DE. 95 años del descubrimiento de la penicilina. Rev Med Hondur. 2023;91(Supl.2):54–8.
8. Zurita J. Resistencia bacteriana en el Ecuador. Rev Panam Infectol. 2012;14(2):75–81.
9. Sosa Flores JL, Chapañan Mendoza JF. Resistencia antibiótica de *Escherichia coli* según producción de betalactamasas de espectro extendido en urocultivos, Hospital III-1 Chiclayo, Perú 2020. Rev Cuerpo Med HNAL Almanzor Aguinaga Asenjo. 2023;15(4):598–603.
10. Shlaes DM. Antibiotics: The perfect storm. Springer; 2010.
11. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(1):1–14.

12. Otoyá Durand E, García-Mostajo JA, Rivera-Morón P. Tendencia en el consumo de carbapenems en un hospital de asociación público-privada. *Rev Cuerpo Med HNAL Almanzor Aguinaga Asenjo*. 2021;14(2):92–8.
13. Anderson R, Groundwater P, Todd A, Worsley A. Antibacterial agents: chemistry, mode of action, mechanisms of resistance and clinical applications [Internet]. Wiley; 2012 [cited 2024 Sep 3]. Available from: <https://www.wiley.com/en-us/Antibacterial+Agents%3A+Chemistry%2C+Mode+of+Action%2C+Mechanisms+of+Resistance+and+Clinical+Applications-p-9780470748214>
14. Ambler RP, Coulson AFW, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem J*. 1991;276(1):269–70.
15. Astocondor-Salazar L. Betalactamasas: la evolución del problema. *Rev Peru Investig Salud*. 2018;2(2):42–9.
16. Lepe JA, Martínez-Martínez L. Mecanismos de resistencia en bacterias gramnegativas. *Med Intensiva*. 2022;46(7):392–402.
17. Pintos-Pascual I, Cantero-Caballero M, Rubio EM, Sánchez-Romero I, Asensio-Vegas Á, Ramos-Martínez A. Epidemiología y clínica de las infecciones y colonizaciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital de tercer nivel. *Rev Esp Quimioter*. 2020;33(2):123–30.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 33rd ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: CLSI; 2023.
19. Lasko MJ, Gill CM, Asempa TE, Nicolau DP. EDTA-modified carbapenem inactivation method (eCIM) for detecting IMP metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: an assessment of increasing EDTA concentrations. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):308.
20. Di Conza JA. Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la microbiología clínica. *Rev Argent Microbiol*. 2022;54(3):163–5.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 34th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: CLSI; 2024.
22. Tsai YM, Wang S, Chiu HC, Kao CY, Wen LL. Combination of modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):315.
23. Koul N, Kakati B, Agarwal S. Use of the combined modified carbapenem inactivation method and EDTA-modified carbapenem inactivation method for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae causing ventilator-associated respiratory infections. *J Pure Appl Microbiol*. 2022;16(2):1239–44.
24. El Aila NA, Al Laham NA, Ayesh BM. Prevalence of extended spectrum β -lactamase and molecular detection of blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genotypes among Gram-negative bacilli isolates from pediatric patients in Gaza Strip. *BMC Infect Dis*. 2023;23(1):99.
25. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server):W43–6.
26. Yauri Bucheli MF, Alcocer I, Duncan C. Caracterización molecular de genes de resistencia a β -lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia Enterobacteriaceae. *Rev Ecuat Med Cienc Biol*. 2021;42(1):45–54.

27. Gonzales-Rodriguez AO, Infante Varilla SF, Reyes-Farias CI, Ladines Fajardo CE, Gonzales Escalante E. β -lactamasas de espectro extendido y factores de virulencia en *Escherichia coli* uropatógenas en asilos de ancianos en Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2022;39(1):98–103.
28. Valdez Fernandez-Baca LM. *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), un problema creciente en nuestros pacientes. *Rev Med Hered*. 2017;28(3):180–6.
29. Monté Cepero L, Martínez CR. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido en un hospital de La Habana. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 2022;60(2):e1754.
30. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI). Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador 2014–2018 [Internet]. Ministerio de Salud Pública; 2019 [cited 2024 Sep 9]. Available from: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf
31. Mendieta Astudillo V, Gallegos Merchan JD, Peña Cordero SJ. Frecuencia de BLEE, AmpC y carbapenemasas en urocultivos de *Escherichia coli* de origen comunitario. *Rev Vive*. 2021;4(11):387–96.
32. Ministerio de Sanidad, España. One Health High-Level Meeting on Antimicrobial Resistance. Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN). 2023.
33. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Informe técnico COVID-19. 2022.
34. Quiroz R, Sánchez A, Ramos L, Delgado C. Resistencia a carbapenémicos y producción de carbapenemasas en bacilos Gram negativos aislados en el hospital Belén de Trujillo, Perú (2018–2019). *Rev Cuerpo Med HNAL Almanzor Aguinaga Asenjo*. 2020;14(3):201–9.
35. Opazo A, et al. Diagnóstico molecular para la detección genotípica de la resistencia a los antibióticos: Panorama actual y direcciones futuras. *J Antimicrob Chemother*. 2023;78(5):1123–35.
36. Antibiotics (Basel). Tecnologías actuales y futuras para la detección de bacterias resistentes a los antibióticos. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(4):456.
37. Journal of Clinical Microbiology. Detección rápida de Enterobacterales productoras de carbapenemasas: una revisión sistemática de los métodos de diagnóstico y su impacto clínico. *J Clin Microbiol*. 2021;59(12):e02534–21.
38. Zhang Y, Chen H, Li Q. Structure-based primer design minimizes PCR failures caused by SARS-CoV-2 mutations. *Pathogens*. 2021;10(6):748.

Received: May 14, 2025 / **Accepted:** August 20, 2025 / **Published:** September 15, 2025

Citation: Tamami Tualombo SB*, Alcocer Negrete IR, Yauri Bucheli MF. Resistencia antimicrobiana en bacilos Gram negativos clínicos: caracterización fenotípica y genotípica en Ecuador. *Bionatura Journal*. 2025;2(3):13. doi:10.70099/BJ/2025.02.03.13

Additional Information

Correspondence should be addressed to: sandrytatu@gmail.com

Peer Review Information. *Bionatura Journal* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work using Reviewer Locator.

ISSN: 3020-7886

All articles published in *Bionatura Journal* are freely and permanently accessible online immediately after publication, with no subscription charges or registration barriers.

Editor's Note: *Bionatura Journal* remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).