

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Médicas

Carrera de Laboratorio Clínico

“Detección del gen blaSHV en enterobacteriales productores de betalactamasas de espectro extendido en cepas procedentes de la Clínica Santa Ana y Hospital del Río, Cuenca 2024”

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


Autores:

Paulina Ivanova Quichimbo Tuza

Diego Sebastián Vicente Padilla

Director:

Ivanna Solmayra Agreda Orellana

ORCID:  0000-0002-3826-9596

Cuenca, Ecuador

2024-03-06

Resumen

Antecedentes: Las infecciones por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) representan un desafío para la salud pública debido a terapias alternativas costosas. Por esto, la detección del gen *bla*SHV en estas bacterias resulta relevante para comprender la epidemiología molecular, proporcionando una base científica sólida para diseñar estrategias que mitiguen su diseminación e impacto en la población. **Objetivo:** Detectar la presencia del gen *bla*SHV en *Enterobacterales* productores de betalactamasas de espectro extendido de cepas procedentes de la Clínica Santa Ana y Hospital del Río, Cuenca 2024. **Metodología:** Estudio descriptivo, donde el universo y muestra estuvo conformado por 85 cepas bacterianas del orden *Enterobacterales* del cepario de la Clínica Santa Ana y Hospital del Río, para su posterior confirmación fenotípica de producción de BLEE por test de doble disco y detección del gen *bla*SHV, mediante reacción en cadena de la polimerasa convencional. **Resultados:** El gen *bla*SHV fue detectado en 15 (17,60 %) cepas, principalmente en *Klebsiella pneumoniae* con 10 (11,80 %), seguido de *Escherichia coli* con 3 (3,50 %), %, *Proteus mirabilis* 1 (1,20 %) y *Morganella morganii* con 1 (1,20 %). La mayoría de aislamientos provenían de muestras de orina (17,60 %). **Conclusiones:** El gen *bla*SHV fue responsable del 17,6 % de la producción de BLEE en las cepas analizadas. El 100 % mostró resultados positivos en el test de doble disco, y *Klebsiella pneumoniae* fue el principal portador del gen con el 11,8 %.

Palabras clave del autor: resistencia bacteriana, antibióticos, enterobacterales, genes bacterianos, blee



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

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

Abstract

Background: Infection caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing bacteria represent a public health challenge due to expensive alternative therapies. Therefore, detection of the *bla*SHV gene in these bacteria is significant to understand the molecular epidemiology, since it may provide a solid scientific basis for designing strategies to mitigate its dissemination an impact on the population. Objective: To detect the presence of the blaSHV gene in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacterales* strains from Santa Ana Clinic and Del Rio Hospital and their subsequent phenotypic confirmation of ESBL production by double-disc test for detection of the blaSHV gene, through conventional polymerase chain reaction. Results: The blaSHV gene was detected in 15 (17,60%) strains, mainly in *Klebsiella pneumoniae* 10 (11,80%), followed by *Escherichia coli* 3 (3,50%), *Proteus mirabilis* 1 (1,20%), and *Morganella morganii* 1 (1,20%). Most isolates came from urine samples (17,60%). Conclusions: The blaSHV gene was responsible for 17.60% of ESBL production in the strains analyzed. 100% of them showed positive results in the double-disk test, and *Klebsiella pneumoniae* was the main carrier of the gene (11,80%).

Author Keywords: bacterial resistance, antibiotics, enterobacterales, bacterial genes, esbl



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

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

Índice de contenido

1. Capítulo I	12
1.1. Introducción.....	12
1.2. Planteamiento del problema de investigación.....	13
1.3. Justificación.....	14
2. Capítulo II	16
Marco teórico	16
2.1. Bacterias y sus generalidades.....	16
2.2. Antibióticos.....	17
2.3. Betalactámicos.....	18
2.4. Resistencia Bacteriana	18
2.5. Mecanismos de Resistencia.....	19
2.5.1. Permeabilidad de membrana	19
2.5.2. Bombas de eflujo	20
2.5.3. Modificación del sitio blanco	20
2.5.4. Inactivación enzimática.....	21
2.6. Resistencia enzimática mediada por BLEE	21
2.6.1. Clasificación	21
2.7. Genes de Resistencia.....	22
2.7.1. Mecanismos de transferencia genética.....	23
2.8. Gen <i>bla</i> SHV.....	24
2.8.1. Epidemiología	25
2.9. Pruebas de Detección	26
2.9.1. Detección fenotípica	26
2.9.1.1. Test de doble disco.....	26
2.9.2. Detección genotípica	26
3. Capítulo III	27
3.1. Objetivos del Estudio	27
3.1.1. Objetivo General.....	27
3.1.2. Objetivos Específicos	27
4. Capítulo IV	28
4.1. Metodología	28
Diseño de estudio.....	28
4.2. Área de Estudio	28

4.3.	Universo y Muestra	28
4.4.	Criterios de inclusión y exclusión	28
	Criterios de inclusión	28
	Criterios de exclusión	28
4.5.	Variables de estudio	28
4.6.	Operacionalización de las Variables (Anexo A)	29
4.7.	Métodos, técnicas e instrumentos	29
4.8.	Consideraciones bioéticas	39
5.	Capítulo V	41
5.1.	Resultados	41
6.	Capítulo VI	44
6.1.	Discusión	44
7.	Capítulo VII	47
7.1.	Conclusiones	47
7.2.	Recomendaciones	48
	Referencias	49
	Anexos	59
	Anexo A: Operacionalización de variables	59
	Anexo B: Formulario de recolección de datos	61
	Anexo C: Oficio de autorización	62

Índice de Figura

Figura 1. Crecimiento en medio de MacConkey	30
Figura 2. Test de doble disco positivo	34
Figura 3. Extracción y purificación de ADN	35
Figura 4. Interfaz del termociclador utilizado para PCR	37
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa.....	39

Índice de tablas

Tabla 1. Detección de la producción de BLEE mediante el test de doble disco.....	41
Tabla 2. Frecuencia del gen blaSHV en las cepas analizadas	41
Tabla 3. Distribución de género y especie bacteriana del orden Enterobacterales productoras de BLEE portadora del gen blaSHV	42
Tabla 4. Distribución del gen blaSHV según el tipo de muestra	43

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mis padres, Juan y Fabiola, quienes han sido el pilar fundamental en mi vida y mi carrera universitaria. Gracias por siempre guiarme con su infinito amor, por inculcarme valores como la responsabilidad, la empatía y el compromiso, que no solo definieron mi camino como estudiante, sino también mi vocación en el ámbito de la salud. Su ejemplo me ha inspirado a dedicarme con pasión a una profesión que me permitirá servir y ayudar a las personas en el futuro.

A mis hermanos, especialmente a Kevin, cuya alegría y ocurrencias fueron mi fortaleza en los días más difíciles. Gracias por ser más que un hermano, eres mi amigo fiel y compañero de travesías. Tu apoyo me demuestra que nunca estoy solo.

A mis abuelitos Carlos, Martha y Maya, quienes con su ejemplo de vida me enseñaron que la perseverancia y paciencia son la clave para superar cualquier obstáculo. Sus historias y enseñanzas me han inspirado a luchar por todo aquello que sueño alcanzar.

A Paulina, por todo su apoyo, compromiso y paciencia en el trabajo, el cual refleja todo el esfuerzo que dedicamos y el gran vínculo de amistad que hemos construido. A mis amigos Andrea, Doménica, Soraya y Ángel por el aliento, las risas y momentos compartidos que hicieron más llevadero todo este viaje.

A mis adorados canchijos, Bayle y Balto, que con su fidelidad, alegría y amor incondicional llenaron mis días de luz, incluso en los momentos más oscuros.

Este logro es de todos ustedes.

Diego Sebastián Vicente Padilla

Agradecimiento

Agradezco profundamente a Dios y a la Virgen por otorgarme la fortaleza, sabiduría y paciencia necesaria para culminar este trabajo, superando con su bendición todas las dificultades que se presentaron en el camino.

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento a nuestra tutora de tesis, Mgs. Solmayra Agreda, por su invaluable guía, paciencia y compromiso, así como su apoyo constante a lo largo del desarrollo de este trabajo. Su dedicación y generosidad al compartir sus conocimientos fueron fundamentales para alcanzar este logro. Que Dios la bendiga siempre.

Al Hospital Universitario del Río, en especial a la Lcda. Elizabeth Jiménez, jefa de Laboratorio Clínico, por su invaluable apoyo y apertura, que hicieron posible el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Gabriele Bigoni, quien nos brindó su apoyo en el desarrollo de esta tesis, compartiendo su amplio conocimiento y experiencia de manera desinteresada.

Un agradecimiento especial a la Mgs. Gabriela Garcés y a la Lcda. Kenny Guijarro, por su invaluable disposición para ayudar y compartir sus conocimientos con generosidad y excelencia en todo momento.

Diego Sebastián Vicente Padilla

Dedicatoria

La presente tesis está dedicada con profundo amor y gratitud a mis padres, Julio y Sonia, quienes han sido mi mayor fortaleza y guía a lo largo de este camino. Su apoyo incondicional, sus palabras de aliento, su ejemplo de perseverancia y amor me han inspirado a superar cada obstáculo y continuar avanzando hacia mis metas. Gracias por estar siempre a mi lado, confiando en mis capacidades y recordándome que los sueños se alcanzan con esfuerzo y determinación. Este logro no solo es mío, sino también de ustedes, sin sus sacrificios por verme salir adelante, esta meta no habría sido posible.

A mis sobrinos, Sebastián y Benjamín, quienes, con su amor y alegría, han sido mi inspiración constante. Aunque la distancia nos separa, cada videollamada suya iluminó mis días y llenó mi corazón de entusiasmo para seguir adelante.

A mis abuelitos, por cada una de sus oraciones y palabras de motivación, que han sido un constante incentivo para superarme cada día. A mi querido papito Juan y a mi adorada mamita María, quienes desde el cielo me cuidan y guían en cada paso que doy. Estoy segura de que se sienten profundamente orgullosos de verme alcanzar una meta más en mi vida.

A mi compañero de tesis y gran amigo Diego, quien ha hecho de esta etapa académica una experiencia más llevadera y divertida, por el carácter de compromiso en este proyecto, por la paciencia y por los memorables recuerdos que hemos creado juntos. A mis amigas Doménica, Andrea, Jacky y Soraya, quienes, con su alegría, apoyo y compañía, se han convertido en mi segunda familia siendo una fuente de fortaleza en este camino.

A mi prima Kerly, por su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera y por estar presente siempre que la he necesitado, su compañía ha hecho más llevadero este proceso.

A Jonnathan, por cada una de sus palabras de aliento, comprensión y cariño que me ha sabido brindar.

Paulina Ivanova Quichimbo Tuza

Agradecimiento

Agradezco profundamente a Dios y a la Virgen por otorgarme la fortaleza, sabiduría y paciencia necesaria para culminar este trabajo, superando con su bendición todas las dificultades que se presentaron en el camino.

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento a nuestra tutora de tesis, Mgs. Solmayra Agreda, por su invaluable guía, paciencia y compromiso, así como su apoyo constante a lo largo del desarrollo de este trabajo. Su dedicación y generosidad al compartir sus conocimientos fueron fundamentales para alcanzar este logro. Que Dios la bendiga siempre.

Al Hospital Universitario del Río, en especial a la Lcda. Elizabeth Jiménez, jefa de Laboratorio Clínico, por su invaluable apoyo y apertura, que hicieron posible el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Gabriele Bigoni, quien nos brindó su apoyo en el desarrollo de esta tesis, compartiendo su amplio conocimiento y experiencia de manera desinteresada.

Un agradecimiento especial a la Mgs. Gabriela Garcés y a la Lcda. Kenny Guijarro, por su invaluable disposición para ayudar y compartir sus conocimientos con generosidad y excelencia en todo momento.

Paulina Ivanova Quichimbo Tuza

1. Capítulo I

1.1. Introducción

Dentro del principal grupo de bacterias que desarrollan resistencia bacteriana se encuentra el orden Enterobacterales, pertenecientes al filo *Pseudomonadota* y a la clase *Gammaproteobacteria*, se localizan normalmente en el tracto digestivo tanto de humanos como de animales, donde pueden actuar como comensales o incluso pueden llegar a ser patógenos, dependiendo del lugar donde se localicen, el estado inmunológico de la persona y su capacidad de resistencia antimicrobiana (1).

Las bacterias pueden presentar resistencias intrínsecas en su material genético u obtenerlas de otras bacterias relacionadas mediante elementos genéticos móviles denominados plásmidos, bacteriófagos o transposones. Estos mecanismos de resistencia pueden afectar a una familia de antibióticos en específico o a varias, y generalmente incluyen procesos como la inactivación de antibióticos por enzimas como las betalactamasas, modificación del sitio blanco de acción, cierre de porinas y bombas de flujo, entre otros. Las betalactamasas son enzimas que tienen como finalidad hidrolizar el enlace amino en el anillo central betalactámico, llegando a desactivar pocos o varios antibióticos de este tipo, como lo hacen las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Las BLEE tienen la capacidad para descomponer las penicilinas, incluyendo las amino-, carboxi- y ureidopenicilinas y a todas las cefalosporinas incluyendo las de tercera y cuarta generación, con la excepción de las cefamicinas (2-6).

Entre los métodos dados por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (por sus siglas en inglés CLSI) en el documento “CLSI M100-Ed34: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility”, se encuentra el test de doble disco para evaluar la resistencia bacteriana, en conjunto con la reacción en cadena de polimerasa (PCR) como técnica complementaria para su detección molecular (7).

Desde la década de 1945 los estudios sobre resistencia bacteriana a los antibióticos aumentaron de manera considerable y se empezaron a comprender sus formas de adaptación frente a fármacos. Las BLEE se reportaron por primera vez en el año de 1983 y 1990 en diferentes países, donde los genes de beta-lactamasa de mayor importancia son aquellas que derivan de *bla*CTX-M, *bla*SHV, *bla*TEM, *bla*VEB, *bla*GES, *bla*PER, *bla*TLA y *bla*OXA (8, 9). Luria y Delbrück determinaron que las tasas de mutación heredables en las distintas generaciones bacterianas de su estudio eran constantes, este hallazgo explica la existencia

de más de 300 variantes naturales de BLEE, originadas por mutaciones en los genes responsables de la síntesis de estas enzimas, como *bla*SHV, *bla*TEM o *bla*CTX-M (10).

La enzima SHV, cuyo nombre proviene de “sulfhidrilo variable”, fue identificada inicialmente en *Klebsiella pneumoniae* con un origen cromosómico, aunque actualmente se ha detectado ampliamente en otros *Enterobacterales*. Se han documentado un total de 228 variantes del gen *bla*SHV a nivel global, siendo *bla*SHV-5 y *bla*SHV-12 las más comunes (11, 12). En estudios realizados en Ecuador y Perú, el gen *bla*SHV se encuentra entre los más frecuentes en aislados clínicos, lo que resalta la importancia de su detección, específicamente a partir de aislados clínicos de casas de salud privados como la Clínica Santa Ana y Hospital del Río, en la ciudad de Cuenca durante el año 2024.

1.2. Planteamiento del problema de investigación

La resistencia bacteriana es una de las mayores amenazas a la salud pública nivel mundial, con un impacto en la morbilidad, la mortalidad y los costos que genera al sistema de salud. En este contexto, las infecciones que tienen como causa a bacterias productoras de BLEE representan un desafío debido a la limitada efectividad de los antibióticos disponibles. Las enzimas que incluyen a variantes como SHV, confieren resistencia a un gran grupo de antibióticos betalactámicos, complicando la elección de tratamientos efectivos (7).

En la investigación realizada por Martins Da Silva (13) en Brasil denominada “Caracterización de *Enterobacterales* productores de BLEE aislado de la colonización comunitaria del tracto gastrointestinal” de un total de 195 cepas, de las cuales 161 presentaron producción de BLEE. Los genes identificados fueron *bla*CTX-M1/2 con 93,10 %, *bla*TEM con 38 %, *bla*CTX-M8 con 29,20 %, *bla*CTX-M9 con 23 % y *bla*SHV con 11,2 %, en 17 combinaciones diferentes.

Según la investigación de Cornejo et al. en Perú durante el año 2021 denominada “Genotipificación por PCR convencional de genes de resistencia en *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE aisladas de muestras clínicas del servicio de UCI de dos hospitales de Cajamarca”, se encontró que de 59 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, 54 (92 %) presentaban el gen *bla*SHV, 56 (95 %) el gen *bla*CTX-M en y 53 (90 %) el gen *bla*TEM del total de cepas analizadas (14).

De acuerdo al estudio realizado por Ullauri Carmen en la ciudad de Loja en el periodo 2017 - 2018 denominado “Resistencia enzimática a betalactámicos en *Enterobacterales* uropatógenos”, de 323 bacterias aisladas, 90 (27,86 %) fueron clasificadas como productoras

de BLEE y 13 (4,16 %) como productoras de carbapenemasas, entre los patógenos productores de BLEE, *Escherichia coli* fue el más frecuente con el 77,08 %. En cuanto a la prevalencia de genes relacionados con BLEE, se identificó que *bla*CTX-M tuvo una frecuencia de 67,77 %, *bla*TEM de 61,11 %, y *bla*SHV de 20 % (15).

Según el análisis del estudio elaborado por Mendieta Veronica et al. en Ecuador, durante el período de enero - abril de 2020 titulado “Frecuencia de BLEE, AmpC y Carbapenemasas en muestras de urocultivo, en cepas de *Escherichia coli* de origen comunitario”, el 7,62 % de las muestras procesadas eran productoras de BLEE positivas, 0,13 % presentaban AmpC y no se encontraron cepas productoras de carbapenemasas, se puede deducir que la producción de BLEE sigue siendo la forma más común de resistencia (16). En un estudio de revisión retrospectiva de base datos denominado “Genes involucrados con resistencia antimicrobiana en hospitales del Ecuador”, *Escherichia coli* BLEE ha sido reportada en infecciones de tracto urinario y sistémicas, con reportes de varios clones (ST131, ST10, ST23, ST14) que contienen los genes *bla*CTX-M, *bla*TEM y *bla*SHV (17).

En Ecuador, aunque se han realizado estudios relacionados sobre resistencia bacteriana asociada a la producción de BLEE, persiste una notable deficiencia de datos sistematizados sobre la distribución y frecuencia del gen *bla*SHV en aislados clínicos, particularmente en centros de atención médica privada como la Clínica Santa Ana y el Hospital del Río, en Cuenca.

La detección del gen *bla*SHV en aislados clínicos de *Enterobacterales* resulta fundamental para entender su rol en la diseminación de la resistencia bacteriana, así como para diseñar estrategias efectivas de control y prevención. La falta de estudios sobre este gen en Ecuador evidencia la necesidad de generar datos que permitan fortalecer la vigilancia epidemiológica. Con lo antes expuesto, surge la siguiente pregunta: ¿Cuál es la frecuencia del gen *bla*SHV en *Enterobacterales* productores de betalactamasas de espectro extendido de cepas procedentes de la Clínica Santa Ana y Hospital del Río, Cuenca 2024?

1.3. Justificación

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia a los antimicrobianos (RAM) está categorizada entre los diez principales riesgos para la salud pública que afronta la sociedad. A su vez, las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos provocan en todo el mundo un aproximado de 700 mil defunciones anualmente que podría ascender a 10 millones en los siguientes 25 años (18, 19).

Considerando la relevancia de los estudios realizados en otros países de la región sobre la detección de genes de resistencia bacteriana, resulta importante que los grupos de investigación ecuatorianos fortalezcan sus esfuerzos en esta línea. La generación de datos actualizados permitirá contribuir significativamente al desarrollo de protocolos terapéuticos efectivos para combatir estas cepas, minimizando el riesgo de hospitalizaciones prolongadas, procedimientos médicos adicionales y el uso innecesario de medicamentos de alto costo (20).

El propósito de detectar la presencia del gen *bla**SHV* mediante técnicas de biología molecular es determinar su frecuencia y generar datos epidemiológicos sobre bacterias del orden *Enterobacterales* productoras BLEE en la ciudad de Cuenca. Estos datos son fundamentales para profundizar la comprensión de los mecanismos de resistencia bacteriana y su propagación en la comunidad, contribuyendo así al diseño de estrategias efectivas de vigilancia y control. (21)

Asimismo, el estudio permite demostrar el compromiso de la Universidad de Cuenca con la excelencia académica, al participar activamente en la investigación científica en campos como la microbiología, biología molecular y salud pública.

En cuanto a la difusión de los resultados de este estudio, la tesis será ingresada al repositorio digital de la Universidad de Cuenca y publicada en la revista de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca, permitiendo así su acceso a investigadores, a la comunidad académica y a los profesionales de la salud tanto a nivel local como global, fomentando el intercambio de conocimiento en el área.

Esta investigación está directamente relacionada con las líneas de investigación establecidas por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP) dentro del área de investigación: Infecciones comunes, así como de las líneas de investigación: Enfermedades Infecciosas, establecidas por la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca. A partir de lo expuesto anteriormente, se presenta la siguiente investigación “Detección del gen *bla**SHV* en *Enterobacterales* productores de betalactamasas de espectro extendido en cepas procedentes de la Clínica Santa Ana y el Hospital del Río, Cuenca 2024”, convirtiéndose en un aporte para la epidemiología sobre la resistencia bacteriana nacional.

2. Capítulo II

Marco teórico

2.1. Bacterias y sus generalidades

Las bacterias son microorganismos procariotas caracterizadas por poseer un cromosoma circular cerrado de manera covalente que contiene todo su material genético, que es esencial para el funcionamiento, adaptación y evolución como, por ejemplo, las islas de patogenicidad y los genes de resistencia a los antimicrobianos. En el citoplasma celular se encuentran el nucleoide, lo que provoca que la transcripción y traducción se realicen al mismo tiempo, el ribosoma 70S (subunidades 30S y 50S) y la membrana plasmática conformada principalmente por lípidos y proteínas transportadoras (20, 22).

Ubicada en el exterior de la membrana plasmática, se encuentra la pared celular que protege a las estructuras internas del medio exterior y le proporciona a la bacteria su forma característica, que puede ser esférica (cocos), de bastón (bacilos) o en espiral (espirilos). La pared celular es una estructura tridimensional compleja y altamente conservada armada de manera similar a una malla, que se forma a partir de los precursores N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (MurNac), que al unirse a una molécula de bactoprenol forman al pentapéptido disacárido (GlcNAc-MurNac), para ser trasladado al exterior celular y suceda la transpeptidación, en donde estos GlcNAc- MurNac se entrecruzan mediante cadenas peptídicas (2-5 aminoácidos) gracias a las enzimas transpeptidasas y D-carboxipeptidasas, formando la red de peptidoglicano (23, 24). Basándose en la cantidad de peptidoglicano presente en su pared celular, las bacterias se pueden clasificar mediante la tinción de Gram como grampositivos o gramnegativos (25).

Entre los grupos taxonómicos de bacterias gramnegativas con mayor importancia en el ámbito de la salud pública está el orden *Enterobacterales*, que contiene a nueve familias, entre ellas las más destacadas son *Enterobacteriaceae* y *Morganellaceae*, caracterizadas por ser bacilos, no desarrollar esporas y por constituir parte de la microbiota intestinal de humanos y animales. Dentro de los géneros considerados clínicamente más relevantes por su asociación con infecciones en humanos encontramos a *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *Proteus* (26, 27).

2.2. Antibióticos

Para poder combatir a estos microorganismos los científicos se vieron en la necesidad de desarrollar herramientas efectivas, lo que llevó al descubrimiento y desarrollo de los antibióticos. Se trata de moléculas producidas de forma biológica por distintos microorganismos u obtenidos de forma sintética o semisintética, utilizados específicamente para combatir infecciones bacterianas y se dividen en dos categorías principales: los bacteriostáticos que inhiben el crecimiento y reproducción de las bacterias, y los bactericidas que las destruyen por completo (28).

Estos fármacos se pueden clasificar según sus mecanismos de acción, donde los más importantes son:

- Alteración de la membrana citoplasmática: Se basan en la alteración de la permeabilidad celular, al actuar sobre los canales y bombas de proteína, provocando la salida o entrada excesiva de electrolitos, afectando funciones vitales de la célula y conduciendo a la muerte bacteriana. Entre los antibióticos que utilizan este mecanismo está la polimixina y daptomicina. (29).
- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos: Se basan en la capacidad de actuar sobre enzimas fundamentales para la transcripción y replicación del ADN, como lo son las ADN polimerasas, topoisomerasas y ADN girasas, causando daños directos al ADN. Los antibióticos que actúan con este mecanismo son la rifampicina, las quinolonas, los nitroimidazoles y los nitrofuranos (29).
- Inhibidores de síntesis proteica: Este mecanismo se basa en la unión al ribosoma y la perturbación en etapas específicas del proceso de traducción. Su acción puede incluir la inhibición del inicio de la traducción, el bloqueo de la unión del ARNt al complejo ARNm-ribosoma o la interrupción de la translocación del ribosoma, lo que impide la producción de proteínas esenciales para la viabilidad bacteriana. Entre estos agentes se destacan los aminoglucósidos, que se fijan de manera irreversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, causando errores en la decodificación del ARNm, los macrólidos que actúan de forma reversible al unirse a la subunidad 50S del ARN ribosómico (rRNA) interfiriendo con las reacciones de transpeptidación y translocación, bloqueando así la elongación de la cadena polipeptídica durante la traducción (30).

- Inhibición de las vías metabólicas: La vía de síntesis de folatos para producir purinas, es esencial para la formación de ácidos nucleicos, por lo que las sulfonamidas bloquean la dihidropteroato sintasa, inhibiendo esta vía, mientras que la trimetoprima bloquea la dihidrofolato reductasa, impidiendo la conversión de dihidrofolato a tetrahidrofolato. La combinación de ambos fármacos (trimetoprima-sulfametoxazol) tiene un efecto sinérgico al bloquear dos etapas clave, mejorando la eficacia contra bacterias sensibles (31).
- Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana: Se basa en la interrupción de la transpeptidación al unirse a las proteínas ligadoras de penicilina (PBP), lo cual provoca que el peptidoglicano no se forme y se activen las autolisinas, desencadenando la lisis celular y por ende la muerte de la bacteria. Los antibióticos que poseen este mecanismo de acción son los betalactámicos y glucopéptidos (31).

2.3. Betalactámicos

Los betalactámicos, caracterizados por su anillo betalactámico heterocíclico, constituyen una amplia familia de antibióticos con diferentes subgrupos. Las penicilinas incluyen las bencilpenicilinas, pioneras en el tratamiento de infecciones por *Streptococcus pyogenes* y *Treponema pallidum*, y las penicilinas sintéticas como ampicilina y amoxicilina, efectivas contra bacterias grampositivas y gramnegativas. Las cefalosporinas, clasificadas en cinco generaciones, muestran una actividad progresiva contra gramnegativos, pero menor contra grampositivos, destacando moléculas como ceftriaxona y cefepima en infecciones graves. Los monobactámicos, como aztreonam, son útiles frente a gramnegativos no productores de BLEE y en casos de alergia a penicilinas. Los carbapenémicos, liderados por imipenem, presentan el espectro más amplio, incluyendo bacterias resistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, aunque su uso puede generar resistencia. Finalmente, los inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico protegen a los betalactámicos frente a enzimas plasmáticas, aunque no son efectivos contra betalactamasas cromosómicas inducibles (32).

2.4. Resistencia Bacteriana

Con el pasar de los años las bacterias han adoptado mecanismos de resistencia definidos como la capacidad de una bacteria para sobrevivir y multiplicarse a pesar de la presencia de concentraciones terapéuticas de un medicamento específico. Esta resistencia puede clasificarse en intrínseca (o natural) que tiene un origen cromosómico, mientras que la

adquirida (o extrínseca) se debe a la transferencia de material genético mediada por plásmidos, bacteriófagos o transposones (33).

La resistencia intrínseca es una característica innata de la bacteria, presente de manera natural en ciertas especies, incluso en ausencia de exposición a antimicrobianos, debido a que está determinada genéticamente y es propia a la especie bacteriana. Por otro lado, la resistencia adquirida surge a partir de cambios en la composición genética de la bacteria, ya sea por mutaciones espontáneas o por la adquisición de genes de resistencia a través de mecanismos como la transferencia horizontal de genes. Este tipo de resistencia no está presente de manera natural en la especie y se desarrolla debido a la exposición a agentes antimicrobianos u otros factores de selección (28).

2.5. Mecanismos de Resistencia

Son aquellas formas bioquímicas, estructurales o genéticas que poseen las bacterias para poder evitar la actividad del antibiótico, y de esa manera sobrevivir, seguir creciendo y multiplicándose (34).

2.5.1. Permeabilidad de membrana

Las porinas son proteínas integrales de la membrana externa de bacterias gram negativas, las cuales están especializadas en facilitar el transporte pasivo de diversas sustancias hacia el interior celular. Algunos antibióticos aprovechan estas proteínas como vía de entrada al citoplasma bacteriano para ejercer su acción. Sin embargo, las mutaciones en los genes que codifican estas proteínas pueden dar lugar a cambios estructurales o una disminución en su expresión, dificultando o bloqueando el ingreso de los antibióticos. Este mecanismo de resistencia representa una estrategia adaptativa limitando la eficacia de ciertos antimicrobianos y contribuyendo al desarrollo de una resistencia (34).

La impermeabilidad a los betalactámicos en *Enterobacterales* es un mecanismo de resistencia que impide que estos antibióticos penetren adecuadamente en la membrana externa de las bacterias gramnegativas para alcanzar su sitio de acción: las proteínas de unión a penicilina (PBPs). Este fenómeno se relaciona principalmente con la modificación en las porinas. Algunas especies como *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* reducen la producción de porinas o alteran su estructura, restringiendo el paso de los betalactámicos, especialmente aquellos de mayor tamaño como los carbapenémicos (35).

Muchas bacterias combinan esta impermeabilidad con la producción de betalactamasas, como BLEE y carbapenemasas, que degradan los antibióticos que logran atravesar la membrana externa. Este sinergismo refuerza la resistencia, dificultando el tratamiento. En *Escherichia coli*, la reducción de porinas como OmpF genera resistencia a cefalosporinas, mientras que *Klebsiella pneumoniae* presenta niveles naturalmente bajos de expresión de porinas OmpK35 y OmpK36, potenciando su resistencia a carbapenémicos. En *Enterobacter spp.*, la combinación de pérdida de porinas y producción elevada de AmpC incrementa drásticamente la resistencia a betalactámicos (36).

Este mecanismo de impermeabilidad tiene importantes implicaciones clínicas, ya que limita la eficacia de los betalactámicos y, combinado con otros mecanismos de resistencia, reduce las opciones terapéuticas disponibles, obligando al uso de tratamientos más costosos y con mayor riesgo de efectos adversos. Para contrarrestarlo, se han desarrollado estrategias como combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas y el diseño de nuevas moléculas capaces de atravesar porinas alteradas. Además, es importante implementar métodos rápidos de detección genotípica y fenotípica para identificar estos mecanismos y optimizar el tratamiento de las infecciones (35, 36).

2.5.2. Bombas de eflujo

Las bombas de E-flujo son proteínas de transporte de membranas especializadas en transportar metabolitos y compuestos tóxicos desde el interior de las bacterias hacia el exterior. Estas proteínas en conjunto con el periplasma bacteriano son capaces de expulsar antibióticos, disminuyendo su concentración intracelular y, por ende, su eficacia terapéutica. Estas bombas de eflujo necesitan de energía para realizar su función y dependiendo de la fuente que utilizan se las clasifica: bombas de eflujo primarias que hidrolizan ATP y bombas de eflujo secundarias sustancias con gradientes químicos como el sodio (37).

2.5.3. Modificación del sitio blanco

Algunas bacterias poseen la capacidad de modificar la molécula diana a la que se une el antibiótico para ejercer su acción, reduciendo o eliminando su afinidad por el sitio de unión. Este mecanismo de resistencia se logra a través de alteraciones genéticas que afectan los genes que codifican las proteínas blanco del antimicrobiano. Un ejemplo, es la modificación del gen *mecA*, que codifica las PBP (proteínas fijadoras de penicilina), que generan variantes de las PBP con menor afinidad por los antibióticos betalactámicos. Además, un aumento en la producción de estas proteínas puede reducir significativamente, o incluso inhibir por

completo, la capacidad del fármaco para unirse a la pared celular bacteriana, bloqueando su acción antimicrobiana y favoreciendo la resistencia (34).

2.5.4. Inactivación enzimática

Las bacterias producen diversas enzimas capaces de hidrolizar o modificar los antibióticos, impidiendo que estos lleguen de forma activa a su sitio de acción. Uno de los principales mecanismos de resistencia bacteriana, especialmente en las bacterias gram negativas, es la producción de betalactamasas. Estas enzimas tienen la capacidad de inactivar antibióticos betalactámicos, como penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Se han identificado múltiples tipos de betalactamasas, algunas actúan específicamente sobre penicilinas (penicilinasas) o cefalosporinas (cefalosporinasas), mientras que otras, como las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), son capaces de inactivar varios antibióticos betalactámicos (38).

2.6. Resistencia enzimática mediada por BLEE

Las bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son microorganismos que generan enzimas betalactamasas, capaces de hidrolizar una amplia gama de antibióticos betalactámicos, incluyendo penicilinas, monobactámicos y cefalosporinas de tercera generación. Sin embargo, estas enzimas son susceptibles a la inhibición por compuestos como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (39).

Se han identificado más de 200 β -lactamasas diferentes a nivel mundial presentes en *Enterobacterales*, siendo los tipos SHV, TEM, CTX-M, PER y OXA los más destacados. Las primeras BLEE se describieron en 1983 en Alemania, en aislados de *Enterobacterales* que mostraban resistencia a cefotaxima y ceftazidima. Hasta finales de la década de 1990, la mayoría de las BLEE, de los tipos TEM y SHV, se aislaban en cepas de *Klebsiella pneumoniae*, procedentes de brotes hospitalarios, con mayor frecuencia en unidades de cuidados intensivos. En la actualidad, se ha observado un cambio epidemiológico, con un incremento en la prevalencia de tipos como CTX-M y una mayor distribución en *Escherichia coli*, lo que representa un desafío en el manejo de infecciones comunitarias y hospitalarias (40).

2.6.1. Clasificación

Existen 2 sistemas de clasificación de betalactamasas, la primera es aquella clasificación expuesta por Ambler en los años ochenta, la cual se fundamenta en la estructura molecular

de las betalactamasas con su respectiva secuencia de aminoácidos, donde se reconocen 4 tipos moleculares: el grupo A con penicilinasas serina, el grupo B con metalo-B-lactamasas, el grupo C con cefalosporinasas, y el grupo D con oxacilinasas (48, 49). La mayoría de las BLEE pertenecen a la clase A, destacando los tres tipos más comunes como son TEM, SHV y CTX-M. Además, existen variantes menos frecuentes como PER, GES, VEB, BES, BEL, TLA y SFO. Las BLEE de los tipos TEM y SHV fueron descritos inicialmente en la década de 1980 y se originaron a partir de sus predecesoras TEM-1, TEM-2 y SHV-1, mediante mutaciones puntuales que expandieron su espectro de actividad, permitiéndoles hidrolizar cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos. La segunda clasificación es la propuesta por Bush Jacoby y Medeiros en el año de 1995, la cual depende de los sustratos que la enzima betalactamasa hidroliza y en cuales reprimen su actividad por la presencia de compuestos como el ácido clavulánico, EDTA, aztreonam y/o oxacilina. Este método práctico de organización de las beta-lactamasas, describe cuatro grupos basados en sustratos hidrolizados y sus respectivos perfiles de inhibición; sin embargo, la clasificación por Ambler es la más utilizada (40, 41).

2.7. Genes de Resistencia

Son la unidad básica de la herencia y las bacterias contienen miles de ellos caracterizados por tener 1 kb aproximadamente y no poseer intrones. De manera puntual, entre el 80 a 90% del cromosoma de las bacterias codifican proteínas, mientras que el resto son fracciones ADN intergénico involucrado en secuencias reguladoras y elementos no codificantes como los diferentes tipos de ARN. Entre las diferentes bacterias existentes, el tamaño de sus genomas varía dependiendo del contenido de genes que estos poseen, incluso con el resto de su propio linaje. En un estudio realizado por Welch et al. (36) en 2002, se realizó una secuenciación del genoma de varias cepas de *Escherichia coli*, las cuales difirieron en su potencial patógeno, debido a que algunas integraron segmentos de ADN principalmente mediante fagos y llegaron a formar islas de genes particulares (42).

Existe evidencia que las bacterias resistentes a los antibióticos en conjunto con los genes de resistencia no se producen únicamente por el contacto con los antibióticos, ya que se ha encontrado núcleos de sedimentos congelados de 30.000 años de antigüedad con genes de resistencia a antibióticos para betalactámicos, tetraciclinas y vancomicinas. Entre las actividades que aceleran esta diseminación se encuentran el uso excesivo de antibióticos en centros de atención de la salud humana y veterinaria, en los hogares cuando se realiza de manera inadecuada, en actividades ganaderas y de agricultura para la prevención de

enfermedades y promover el crecimiento de animales de granja. Todos los residuos de estos antibióticos terminan en el suelo y agua, provocando que el conjunto de bacterias patógenas o no patógenas de una comunidad microbiana denominado resistoma tengan un contacto insuficiente para eliminarlas, pero idóneo para poder desarrollar una resistencia al antibiótico (43, 44).

2.7.1. Mecanismos de transferencia genética

La transferencia horizontal de genes se refiere al intercambio de material genético entre organismos de especies no relacionadas, a través de mecanismos diferentes a la reproducción sexual o asexual. La transferencia horizontal de genes (HGT) juega un papel clave en la evolución, al proporcionar cambios fenotípicos adaptativos a las células procariontas y lograr sobrevivir. En este caso, la diseminación de elementos genéticos, como genes de resistencia a antibióticos, entre diferentes bacterias les permite adquirir varias resistencias a los antimicrobianos sin haber sufrido una exposición previa a estos. Los mecanismos más estudiados de HGT son:

- Transformación: Mediante este mecanismo la bacteria es capaz de captar ADN externo de su ambiente e integrarlo mediante recombinación homóloga. Este ADN externo tiene un tiempo de vida limitado, por lo tanto, la bacteria debe empaquetarlo rápidamente mediante vesículas de membrana.
- Conjugación: En este caso se necesita que las bacterias implicadas tengan un contacto estrecho y lograr el movimiento de plásmidos o elementos conjugativos integradores (ICEs), que son fragmentos de material genético libre que circula en la célula de bacterias de forma independiente del genoma. Estos elementos móviles genéticos poseen un sistema llamado “maquinaria de formación de pares de apareamiento” que ayudan a conectar a las dos bacterias implicadas. Dentro de este sistema existe una estructura llamada T4SS (sistema de secreción tipo 4) que transfiere el ADN de una bacteria donante a una receptora. Entre los plásmidos hallados frecuentemente en bacterias productoras de BLEE están:
 - Plásmidos IncF: Se encuentra mayoritariamente en *E. coli* y se los ha encontrado genes codificantes de BLEE y carbapenemasas.
 - Plásmidos IncI: Se encuentra mayoritariamente en *E. coli* y *S. enterica*, encontrando genes BLEE y AmpC.

- Plásmidos IncN: Se encuentra mayoritariamente en *E. coli* y el gen al que más se lo asocia es a *bla*CTX-M1.
- Plásmidos IncA/C: Se los asocia con bacterias multidrogoresistentes (MDR), codificando BLEE (especialmente *bla*TEM y *bla*SHV) y carbapenemasas (*bla*OXA, *bla*NDM, *bla*IMP).
- Plásmidos IncY: Se los relaciona con la resistencia a ampicilina y portan el gen *bla*SHV.
- Plásmidos IncL/M: Se lo vincula mundialmente al gen *bla*OXA-48, especialmente en *K. pneumoniae*. También puede portar los genes *bla*CTX-M-1, -3, -14, -15, *bla*TEM-1, -10, -52, *bla*SHV-1 y *armA* (45, 46).
- Transducción y lisogenia: A diferencia de la conjugación, este mecanismo le ayuda a la bacteria a intercambiar material genético a una distancia mayor, sin necesidad de tener contacto con otra. Esto lo logra mediante los bacteriófagos (virus que infectan bacterias), los cuales están constituidos por una cubierta proteica llamada cápside la cual contiene en su interior material genético que se integra al genoma bacteriano lo cual altera al mismo (47).

Además, también existen estructuras denominadas transposones, que son bloques de material genético que tiene la capacidad de saltar dentro y fuera del genoma (48, 49).

2.8. Gen *bla*SHV

El gen *bla*SHV codifica a la enzima sulfhidrilo variable (SHV), responsables de conferir resistencia a diversos antibióticos beta-lactámicos, como penicilinas, cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos, aunque son inhibidas por compuestos como el ácido clavulánico. Generalmente localizado en plásmidos, este gen se disemina entre diferentes especies bacterianas, especialmente entre *Enterobacterales* como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Las variantes más comunes incluyen a SHV-1, con actividad básica de penicilinas, y de las variantes BLEE (SHV-2 y SHV-5), que presentan resistencia ampliada hacia cefalosporinas avanzadas. Su relevancia clínica radica en su implicación en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) y en la resistencia a betalactámicos, complicando los tratamientos (50).

2.8.1. Epidemiología

Las betalactamasas de espectro extendido representan un creciente desafío a nivel mundial, debido al incremento en la incidencia y prevalencia de infecciones causadas por bacilos gramnegativos. Estas enzimas son producidas por bacterias que expresan genes específicos, como *bla*CTX-M, *bla*TEM y *bla*SHV, tradicionalmente las BLEE más comunes. En la última década se ha observado una expansión significativa de cepas que producen BLEE del tipo *bla*CTX-M en numerosos países. Actualmente, las CTX-M se han convertido en las variantes de BLEE predominantes a nivel global, reflejando un cambio epidemiológico significativo en la resistencia antimicrobiana (50, 51).

La mayoría de casos donde se aíslan bacterias con SHV es en infecciones de tracto urinario y brotes de neumonía causados por *Klebsiella spp.* y *Escherichia coli*, de las cuales se han reportado siete variantes de este gen en aislamientos clínicos: el primero por *bla*SHV-15 en el Reino Unido con contagio en la India, la segunda por *bla*SHV-24 en Japón, la tercera por *bla*SHV-102 en España, la cuarta por *bla*SHV-129 en Italia, la quinta por *bla*SHV-70 en China, la sexta por *bla*SHV-128 en Túnez, y la séptima por *bla*SHV-183 que no se ha descrito donde, donde las 3 últimas fueron en aislamientos de *Enterobacter cloacae* (52).

En un estudio realizado por Méndez (53) en Colombia en el 2021, de un total de 79 aislados bacterianos del área metropolitana de Bucaramanga, la prevalencia del gen *bla*SHV-2 fue del 54,7 % de los casos, evidenciando su alta distribución en esta región. Por otro lado, en Perú en el año 2021 se realizó un estudio de genotipificación para evidenciar la resistencia en 37 cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE procedentes de dos hospitales, donde concluyen que la presencia del gen *bla*SHV en promedio de ambos hospitales es del 92% del total de aislados (54).

La identificación y monitoreo de genes como *bla*SHV y su coexistencia con otros determinantes genéticos de resistencia resultan fundamentales para comprender la epidemiología de estas bacterias en la región. Además, el uso de métodos moleculares estandarizados en estos estudios proporciona datos confiables y comparables a nivel global, lo que fortalece las estrategias para enfrentar la resistencia bacteriana en contextos clínicos y comunitarios. Este tipo de investigaciones constituyen una herramienta clave para orientar decisiones en políticas de salud pública y optimizar el manejo de los antimicrobianos (55).

2.9. Pruebas de Detección

2.9.1. Detección fenotípica

La detección fenotípica desempeña un papel fundamental en el diagnóstico microbiológico dentro del laboratorio clínico. Por lo cual el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) ha establecido estándares para la identificación de resistencia a los antibióticos en *Enterobacterales*. Estas guías proporcionan metodologías confiables que permiten evaluar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana, lo que es esencial para un manejo clínico adecuado (6, 56).

2.9.1.1. Test de doble disco

La prueba de discos combinados con inhibidor es uno de los métodos recomendados por el CLSI-M100-Ed34 2024 para detectar betalactamasas de espectro extendido en *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*. Este ensayo consiste en comparar los halos de inhibición generados por un disco de papel filtro de 6 mm impregnado con una cefalosporina de tercera generación, frente a los obtenidos por la misma cefalosporina combinada con ácido clavulánico. Cuando existe una diferencia ≥ 5 mm entre el diámetro de la zona de inhibición del antimicrobiano/clavulanato con el diámetro de inhibición del antimicrobiano en solitario, se concluye que es una bacteria productora de BLEE (6, 56).

2.9.2. Detección genotípica

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT), como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es esencial para identificar determinantes genéticos de resistencia antimicrobiana. La PCR utiliza enzimas termoestables como la polimerasa Taq para replicar y amplificar ADN bacteriano a través de un ciclo repetido de desnaturalización (94 °C), alineación (56 °C) y elongación (72 °C), generando múltiples copias en 30–35 ciclos. Este método es rápido, sensible y reproducible, y los productos de amplificación se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa, donde se observan bandas específicas, de esta manera se logra evidenciar la presencia de genes como *bla*SHV (57).

3. Capítulo III

3.1. Objetivos del Estudio

3.1.1. Objetivo General

1. Detectar la presencia del gen *bla*SHV en *Enterobacterales* productores de betalactamasas de espectro extendido de cepas procedentes de la Clínica Santa Ana y Hospital del Río, Cuenca 2024.

3.1.2. Objetivos Específicos

1. Detectar la presencia de enzimas betalactamasas de espectro extendido en las bacterias del orden Enterobacterial, mediante el test de doble disco.
2. Identificar la presencia del gen de resistencia a betalactámicos *bla*SHV mediante reacción en cadena de la polimerasa convencional.
3. Analizar las cepas bacterianas portadoras del gen *bla*SHV con las variables de estudio.

4. Capítulo IV

4.1. Metodología

Diseño de estudio

El siguiente estudio es de tipo descriptivo y transversal.

4.2. Área de Estudio

Se trabajó con cepas del orden *Enterobacterales*, obtenidas del cepario de la Clínica Santa Ana y del Hospital del Río, las cuales cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión establecidos.

Lugar 1: Hospital del Río - Universidad de Cuenca

Dirección: Avenida 24 de Mayo y Autopista Cuenca-Azogues

Lugar 2: Clínica Santa Ana - Universidad de Cuenca

Dirección: Avenida Manuel J. Calle - Cuenca

4.3. Universo y Muestra

El universo correspondía a la totalidad de los ceparios de las dos casas de salud y, la muestra estuvo conformada por 85 cepas bacterianas procedentes de aislados clínicos recolectados durante los meses marzo - agosto 2024 que pertenecieron al orden *Enterobacterales* productores de betalactamasas de espectro extendido.

4.4. Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión

- Cepas bacterianas procedentes de aislados clínicos.
- Cepas bacterianas pertenecientes al orden *Enterobacterales*.
- Cepas bacterianas cuyos reportes señalan que son productoras de betalactamasas de espectro extendido.

Criterios de exclusión

- Cepas bacterianas con doble aislamiento.
- Bacterias productoras de otras enzimas (betalactamasas tipo AmpC y carbapenemasas).

4.5. Variables de estudio

Como variables de estudio se consideró:

- Género y especie bacteriana.
- Test de doble disco.
- Tipo de muestra.

- Gen *bla*SHV.

4.6. Operacionalización de las Variables ([Anexo A](#))

4.7. Métodos, técnicas e instrumentos

Métodos

Se llevó a cabo la viabilización de cepas bacterianas pertenecientes al orden *Enterobacterales* productoras de BLEE, aisladas en la Clínica Santa Ana y el Hospital del Río. Posteriormente, se confirmó la producción de BLEE mediante la prueba de doble disco y se realizó la detección del gen *bla*SHV utilizando la técnica de PCR convencional.

Técnicas

Los datos sobre la identificación y antibiograma de las cepas bacterianas se recolectaron a través del formulario de recolección de datos, utilizando los registros de los laboratorios generados por los equipos VITEK 2 compact 15 (Hospital del Río) y PHOENIX 100 (Clínica Santa Ana). Los resultados obtenidos fueron almacenados en Microsoft Excel, se analizaron y vincularon mediante el programa Statistical Package for the Science (SPSS).

Instrumentos

Se utilizó un formulario de recolección de datos para obtener la información del área de microbiología de la Clínica Santa Ana y Hospital del Río ([Anexo B](#)).

Autorización: Se solicitó el permiso para utilizar el laboratorio de microbiología y biología molecular de la Facultad de Ciencia Médicas, de la Universidad de Cuenca. Se solicitó la carta de interés a los directores de Investigación del Hospital del Río y de la Clínica Santa Ana, para el uso de las cepas de aislados clínicos ([Anexo C](#)).

Capacitación: Al ser estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico, estamos capacitados teniendo en cuenta la malla curricular, ya que se cursaron las asignaturas necesarias para el desarrollo de la investigación, teniendo el conocimiento óptimo para correlacionar e interpretar los resultados de Laboratorio Clínico apoyándonos en fuentes bibliográficas de amplitud científica.

Supervisión: El estudio se realizó bajo la supervisión de la Mgs. Solmayra Agreda, tutora de tesis.

Procedimientos analíticos

La siguiente investigación fue realizada mediante los siguientes procedimientos:

Viabilización de cepas:

1. Se prepararon medios de cultivo MacConkey de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial (HIMEDIA) en cajas bipetri, utilizando 49,53 gramos de agar MacConkey para 1000 ml de agua destilada.
2. Se transfirió las cepas seleccionadas del ultracongelador (-20°C) al congelador (-2°C) durante una hora.
3. Se colocaron las cepas del congelador a temperatura ambiente para completar su descongelación progresiva durante una hora.
4. Se realizó la siembra de las cepas en las cajas bipetri MacConkey mediante la técnica de agotamiento, utilizando un asa en argolla desechable y rotular.
5. Se incubaron por 24 horas a 35°C ± 2.
6. Con base en las características macroscópicas como fermentación de lactosa, tamaño, bordes y crecimiento, se comprobó la pureza del cultivo mediante la observación directa (58, 59).

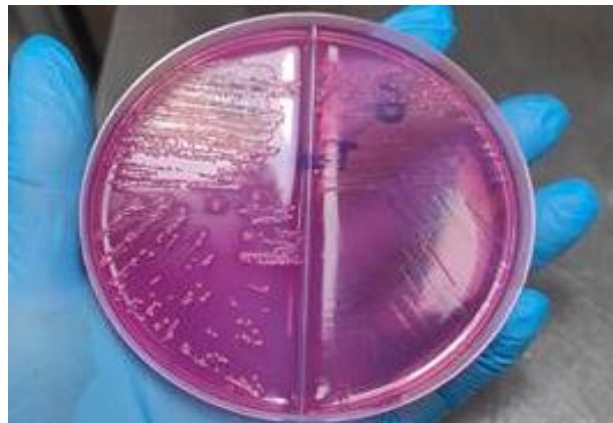


Figura 1. Crecimiento en medio de MacConkey

Estandarización del medio de cultivo Mueller-Hinton:

Profundidad

1. Se realizó el cálculo del agar según las instrucciones de la casa comercial (HIMEDIA) para seis cajas, donde llevarán 20, 21, 22, 23, 24, 25 ml respectivamente.
 - a. Se utilizaron 38,04 gr de agar para 1.000 ml de agua destilada.

2. Se colocó una luna de reloj sobre la balanza Electronic Balance, se llevó a cero y se pesaron los 5,70 gramos de agar y con una probeta se midió 150 ml de agua destilada.
3. En un frasco de tapa rosca se llevó a ebullición durante unos 5-10 minutos hasta que la mezcla se observó transparente. Tener en cuenta que durante este tiempo se homogeneizó la mezcla de manera constante.
4. Se llevó al autoclave la mezcla a una temperatura 121°C durante 45 minutos.
5. Con ayuda de una pipeta volumétrica y pera de absorción se dispensaron 20, 21, 22, 23, 24, 25 ml del agar en cada caja petri respectivamente.
6. Una vez solidificados los medios, se procedió a insertar una regla metálica en cada caja para evaluar la profundidad con los diferentes
7. Los valores más próximos a 4 mm de profundidad correspondieron a las cajas de 22, 23, 24 ml.
8. Se repitieron los pasos para preparar nuevamente agar Müller-Hinton para tres cajas petri.
 - a. Se utilizaron 2,85 gr con 75 ml de agua destilada.
9. Una vez solidificados los medios, se insertó nuevamente una regla metálica en cada una de las cajas, obteniéndose los siguientes resultados:
 - 22 ml = 3,80 mm
 - 23 ml = 4,10 mm
 - 24 ml = 4,50 mm
10. Se verificaron los resultados con un calibrador, y con ello se concluyó que el valor más próximo a 4 mm de profundidad corresponde a la caja de 23 ml (60).

Esterilidad

1. Se realizó el cálculo del agar según las instrucciones de la casa comercial (HIMEDIA) para tres cajas con 23 ml de medio, de manera similar a lo ya mencionado anteriormente.
2. Se colocó el agar y el agua destilada en un frasco de tapa rosca, se llevó a ebullición durante unos 5-10 minutos hasta que la mezcla se observó transparente. Tener en cuenta que durante este tiempo se homogeneizó la mezcla de manera constante.
3. Se llevó al autoclave la mezcla a una temperatura 121°C durante 45 minutos.
4. Con ayuda de una pipeta volumétrica y pera de absorción, se dispensaron 23 ml del agar en cada caja petri.
5. Una vez ya solidificados los medios, se llevaron a la cabina de bioseguridad para colocarles luz UV durante 10 minutos.
6. Se colocaron las cajas a incubación durante 72 horas a una temperatura de 37°C.
7. Pasado este tiempo, se observó si existe o no crecimiento bacteriano.
 - a. Cuando no existía crecimiento, se dejaban nuevamente las cajas Petri a una temperatura de 37°C durante 1 semana con la finalidad de descartar crecimiento fúngico.
 - b. Una vez terminado este tiempo, se observaron las cajas petri y si no existe ningún crecimiento, se concluye que el medio pasa el control de calidad en referencia a esterilidad (60).

pH

1. Se realizó el cálculo del agar según las instrucciones de la casa comercial (HIMEDIA) para dos cajas con 23 ml de medio, de manera similar a lo ya mencionado anteriormente.
2. Se colocó el agar y el agua destilada en un frasco de tapa rosca, se llevó a ebullición durante unos 5-10 minutos hasta que la mezcla se observó transparente. Tener en cuenta que durante este tiempo se homogeneizó la mezcla de manera constante.
3. Se dispensaron en tubos pequeños de tapa rosca solución salina esteril.

4. Se llevó al autoclave la mezcla y los tubos pequeños a una temperatura 121°C durante 45 minutos.
5. Con una pipeta volumétrica y pera de absorción se dispensaron 23 ml del agar en cada caja Petri.
6. Con ayuda de un hisopo esteril se procedió a tomar colonias de la cepa ATCC 25922 (*Escherichia coli*), se colocó en los tubos pequeños con solución salina esteril y se mezcló en el vortex durante 10 segundos.
7. En un turbidímetro Densimat se midió la turbidez del tubo, siendo lo óptimo un inóculo de 0,5 en escala de McFarland.
8. Se realizó la técnica de siembra masiva con un hisopo estéril y se esperó 5 minutos para la adaptación de la bacteria al medio.
9. Se colocó un disco de gentamicina (10 ug) y un disco de tetraciclina (30 ug) con una distancia de 20 mm entre ambos discos.
10. Se incubaron a una temperatura de 37°C durante 24 horas.
11. Después de este tiempo, se midió los halos de crecimiento con una regla metálica:
 - a. Lo ideal era obtener un rango de gentamicina de 19-26 mm y tetraciclina de 18-25 mm.
12. Si se encontraba dentro de estos rangos, se concluye que el pH del medio es óptimo (6.0).

Test de doble disco para detección de BLEE:

1. Se realizó un inóculo bacteriano de 0,5 en la escala McFarland, es decir, que exista $1,5 \times 10^8$ UFC/ml del microorganismo en estudio.
2. En un medio Müller-Hinton, se realizó una siembra masiva con ayuda de un hisopo estéril.
3. Se permitía que el microorganismo inoculado se adapte al medio durante 5 minutos.

4. Se dispensó un disco de ceftazidima (30 ug) a 24mm de un disco de ceftazidima/ácido clavulánico (30 / 10 ug), así mismo con los discos de cefotaxima (30 ug) y cefotaxima/ácido clavulánico (30 / 10 ug) con ayuda de una pinza.
5. Se incubó durante 16-18 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
6. Se realizó la lectura de los halos y se interpretaron los resultados:
 - a. Si la diferencia entre el diámetro del halo de inhibición de ceftazidima/ácido clavulánico o cefotaxima/ácido clavulánico y el halo de ceftazidima o cefotaxima era ≥ 5 mm, indicaba que se trata de una BLEE.
 - b. Si la diferencia entre el diámetro del halo de inhibición de ceftazidima/ácido clavulánico o cefotaxima/ácido clavulánico y el halo de ceftazidima o cefotaxima era ≤ 5 mm, indica que no se trata de una BLEE (56, 61).

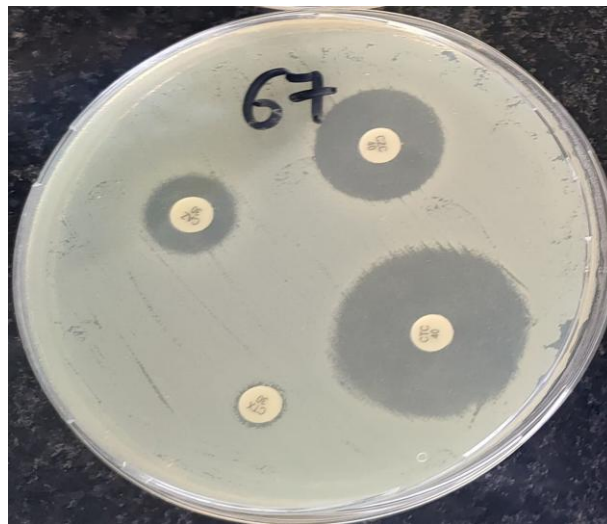


Figura 2. Test de doble disco positivo

Extracción y purificación de ADN bacteriano a partir de las cepas analizadas:

Lisis por calor:

1. Para una extracción rápida del ADN, se suspendieron 5 colonias de la cepa de interés en 75 μL de agua destilada ultrapura.
2. Se calentó a 95°C durante 10 minutos.

3. Se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante se colocó en un nuevo eppendorf (este se guardaba).
5. Se almacenaba a -20° o -80° hasta su uso.

Purificación de ADN:

1. Se agregó en 1 eppendorf 50 μ L del ADN extraído y 100 μ L de etanol puro (el etanol debía estar frío, mínimo 30 min antes en congelación a -20° C).
2. Se incubó a -20° C durante 30 minutos.
3. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos.
4. Se eliminó el sobrenadante.
5. Se añadió 500 μ L de etanol al 70 %.
6. Se centrifugaba a 10.000 rpm durante 5 minutos.
7. Se elimina el sobrenadante.
8. Se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Almacenar a -20° C hasta su uso (62, 63).



Figura 3. Extracción y purificación de ADN

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

La PCR para el gen *bla*SHV consta de 35 ciclos, los cuales están conformados por una serie de etapas sucesivas y repetitivas. El protocolo para la realización de la PCR es el siguiente:

1. Tomando en cuenta el número de reacciones a realizar, se preparó la Mastermix en un tubo de microcentrífuga Eppendorf de 1,5 ml libre de nucleasas, que tendrá como volumen final 45ul:
 - a. Buffer 10x: 5ul
 - b. MgSO₄: 2ul
 - c. Primers: 1ul de Forward + 1ul de Reverse
 - d. DNTP's: 1ul
 - e. Agua grado molecular: 34ul
 - f. Taq polimerasa: 1ul
2. Se colocó 5ul de muestra, para dar un volumen final de PCR de 50ul.
3. Se rotularon los tubos de las muestras a analizar con el código correspondiente.
4. Se colocaron los tubos en el termociclador, en las siguientes condiciones:
 - a. Desnaturalización: En esta etapa la cadena de ADN se calienta a una temperatura de 94°C por 23 segundos para provocar la separación de las dos hebras complementarias al romper las uniones de hidrógeno entre las bases nitrogenadas.
 - b. Alineamiento: En esta etapa, los primers (oligonucleótidos cortos de ADN complementarios a un segmento específico de la hebra de ADN) se unen a las hebras de ADN a una temperatura de 56°C por 30 segundos. Las secuencias de los primers a utilizar son:
 - c. *bla*SHV Forward: AGC CGC TTG AGC AAA TTA AAC
 - d. *bla*SHV Reverse: ATC CCG CAG ATA AAT CAC CAC
5. Elongación: En esta etapa, la enzima ADN polimerasa acelera la incorporación de los nucleótidos a la cadena de ADN en desarrollo, desde el lugar donde se encuentran los primers. Este proceso ocurre generalmente a una temperatura de 72°C por 2 minutos, ya que el ADN polimerasa trabaja de manera óptima a esa temperatura (64, 65).

Consideraciones:

Se realizó una PCR previa de las muestras para poder evaluar la presencia del gen ribosomal 16S, puesto que al estar presente en todas las bacterias nos ayuda a confirmar la presencia de DNA bacteriano.

1. Las condiciones para la PCR de este gen son similares a aquellas del gen *bla*SHV. Sin embargo, la cantidad de reactivo cambia ligeramente, donde para tener un volumen final de la Master Mix de 45 ul:
 - a. Buffer 10x: 5ul
 - b. MgSO4: 2ul
 - c. Primers: 1,5ul de Forward + 1,5ul de Reverse
 - d. DNTP's: 1ul
 - e. Agua grado molecular: 33ul
 - f. Taq polimerasa: 1ul
2. Se colocó 5ul de DNA de muestra, para alcanzar los 50ul finales de PCR.

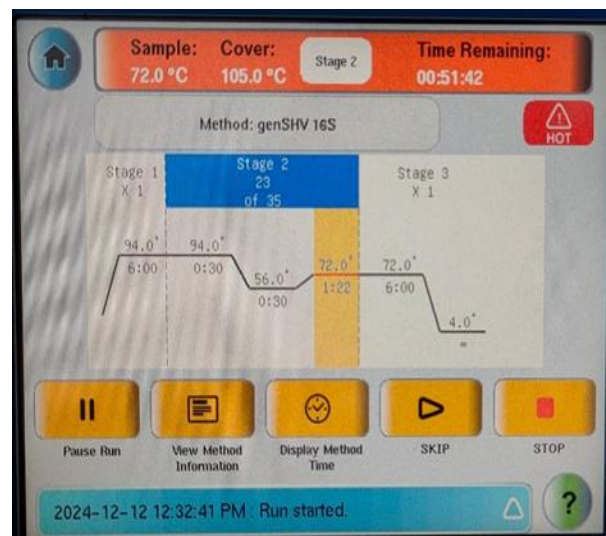


Figura 4. Interfaz del termociclador utilizado para PCR

Electroforesis y visualización de resultados:

1. Se preparó TAE 1X al mezclar 980 ml de agua destilada con 20 ml de TAE 50X.
2. El gel de agarosa se obtuvo al mezclar 160 ml de buffer TAE 1X con 2,4 gr de agar en un matraz, y con ayuda del microondas disolver completamente en intervalos de 1

minuto o 30 segundos hasta que se haya disuelto por completo el agar (debe quedar transparente).

3. Se dejó enfriar ligeramente para colocar 20ul de SafeView Classic (visualizador).
4. Se colocó el agar en la cámara de electroforesis previamente alistada con los soportes y peines.
5. Dejar solidificar completamente por aproximadamente 20 minutos.
6. Se debía retirar los soportes y peines.
7. Cubrir el gel con el resto de TAE 1X.
8. Se debía pipetear en los diferentes pocillos 5ul de DNA Loading Dye con 20ul de la muestra, control positivo o control negativo.
9. Se debía pipetear 15ul del marcador de peso molecular.
10. Colocar la tapa en la cámara y conectar la cámara con la fuente de poder al colocar los tornillos.
11. Iniciaba la electroforesis por aproximadamente 40 minutos con 100v.
12. Una vez terminado el proceso, apagar la fuente de poder y desconectar los tornillos.

Visualización de resultados

13. Se retira el gel de agarosa de la cámara de electroforesis.
14. Se colocó en el transiluminador.
15. Prender el transiluminador en un cuarto oscuro
16. Visualizar todos los componentes de la electroforesis:
 - a. Marcador de peso molecular
 - b. Control positivo
 - c. Control negativo
 - d. Muestras
17. Fotografía de los resultados (65, 66).

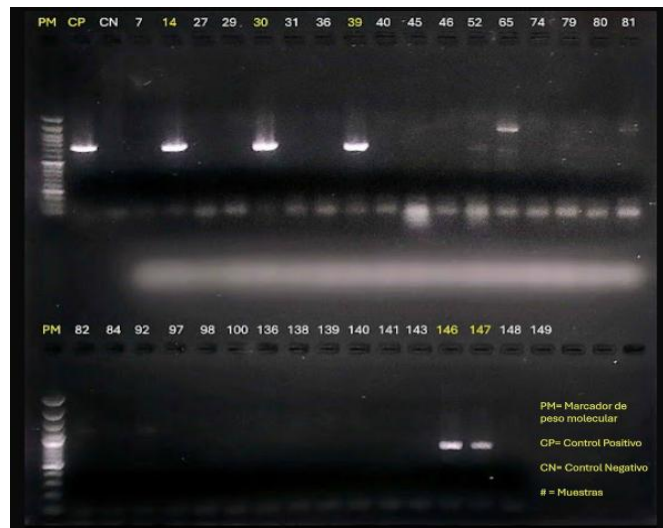


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa

4.8. Consideraciones bioéticas

Aspectos éticos

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

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

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

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

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

5. Capítulo V

5.1. Resultados

Tabla 1. Detección de la producción de BLEE mediante el test de doble disco

Test de doble disco	Frecuencia	Porcentaje
Positivo	85	100
Negativo	0	0
Total	85	100

Fuente: Formulario de recolección de datos.

Autores: Diego Sebastián Vicente Padilla – Paulina Ivanova Quichimbo Tuza.

El 100 % de las cepas bacterianas estudiadas resultaron positivas para la prueba de BLEE, utilizando el método de doble disco.

Tabla 2. Frecuencia del gen *blaSHV* en las cepas analizadas

Gen <i>blaSHV</i>	Frecuencia	Porcentaje
Detectado	15	17,60
No detectado	70	82,40
Total	85	100,00

Fuente: Formulario de recolección de datos.

Autores: Diego Sebastián Vicente Padilla – Paulina Ivanova Quichimbo Tuza.

El gen *blaSHV* se detectó en 15 (17.6 %) de las 85 cepas aisladas en el estudio, mientras que en 70 (82,40 %) no se detectó el gen.

Tabla 3. Distribución de género y especie bacteriana del orden Enterobacterales productoras de BLEE portadora del gen blaSHV

Género y especie bacteriano	Gen <i>blaSHV</i>		
	Detectado	No detectado	Total
<i>Escherichia coli</i>	3 (3,50 %)	65 (76,50 %)	68 (80,00 %)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10 (11,80 %)	2 (2,40 %)	12 (14,10 %)
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (1,20 %)	2 (2,40 %)	3 (3,50 %)
<i>Morganella morganii</i>	1 (1,20 %)	1 (1,20 %)	2 (2,40 %)
Total	15 (17,60 %)	70 (82,40 %)	85 (100 %)

Fuente: Formulario de recolección de datos.

Autores: Diego Sebastián Vicente Padilla – Paulina Ivanova Quichimbo Tuza.

De las 15 cepas portadoras del gen *blaSHV*, *Klebsiella pneumoniae* representó el 11,8 %, seguida de *Escherichia coli* con el 3,5 %.

Tabla 4. Distribución del gen *blaSHV* según el tipo de muestra

Tipo de muestra	Gen <i>blaSHV</i>		
	Detectado	No detectado	Total
Orina	15 (17,60 %)	55 (64,70 %)	70 (82,30 %)
Sangre	0 (0,00 %)	3 (3,50 %)	3 (3,50 %)
Secreción de piel y tejidos blandos	0 (0,00 %)	8 (9,40 %)	8 (9,40 %)
Secreción vaginal	0 (0,00 %)	2 (2,40 %)	2 (2,40 %)
Líquidos	0 (0,00 %)	2 (2,40 %)	2 (2,40 %)
Total	15 (17,60 %)	70 (82,40 %)	85 (100 %)

Fuente: Formulario de recolección de datos.

Autores: Diego Sebastián Vicente Padilla – Paulina Ivanova Quichimbo Tuza.

El 100 % de los aislamientos bacterianos que presentan el gen *blaSHV* provienen de muestras de orina.

6. Capítulo VI

6.1. Discusión

La resistencia bacteriana es el resultado del impacto del ser humano al utilizar de manera inapropiada los antibióticos en campos como la medicina humana, veterinaria, agricultura y ganadería, provocando de esta manera el desarrollo de mecanismos genéticos de resistencia y acelerando su transferencia (67).

En el presente estudio, se trabajó a partir de los ceparios de dos casas de salud privadas (Clínica Santa Ana y Hospital del Río), utilizando 85 cepas pertenecientes al orden *Enterobacterales*, previamente reportadas como positivas para la presencia de BLEE mediante métodos fenotípicos a través de los sistemas automatizados VITEK II Compact 15 del Hospital del Río y PHOENIX 100 de la Clínica Santa Ana.

El test de doble disco es una herramienta empleada en la detección de bacterias productoras de BLEE mediante la observación de la diferencia de halos entre el inhibidor de betalactamasas y el betalactámico (68). Como se demuestra en el estudio realizado por Ajani T. et al. denominado "Evaluation of phenotypic and molecular technique in the detection of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing gram negative bacilli in Ogun State, Nigeria" el método de doble disco demostró que tiene una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 98,3 % (69). Por otra parte, la investigación de Sedlakova M. et al. coincide que la sensibilidad de este método fenotípico es del 100 % al estudiar 85 cepas identificadas previamente por el sistema automatizado Phoenix como BLEE (70). En el presente estudio, la utilización del test de doble disco permitió confirmar que el 100 % de las cepas analizadas eran productoras de BLEE, demostrando ser herramientas clave para la detección y confirmación de resultados.

El gen *bla*_{SHV} es uno de los determinantes genéticos más frecuentes en bacterias productoras de BLEE (71). En el estudio de Shoja S. et al., titulado "Bacteriological characteristics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* rmpA gene (hvKp-rmpA)- harboring strains in the south of Iran", se reportó una frecuencia del 87,50 % de este gen en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas clínicamente, destacando su elevada frecuencia en infecciones asociadas al cuidado de la salud (72). Así también Beltrán P. et al., en su estudio "Determinación de la presencia de los Genes β -lactámicos tipo *TEM-SHV-CTX-M* en bacterias betalactamasas de espectro extendido en muestras de cultivo del área de microbiología procedentes de los distintos servicios del Hospital Carlos Andrade Marín en el

periodo diciembre 2018 – mayo 2019”, reporta una frecuencia de 33,6 % en un total de 112 cepas estudiadas (73). El presente estudio encontró una frecuencia del gen *bla*SHV del 17,60 %, donde existe una variación que, aunque sea menor que las frecuencias reportadas en los estudios mencionados, este resultado subraya la necesidad de continuar monitoreando este gen como un indicador clave en la vigilancia de la resistencia bacteriana.

La distribución de bacterias en aislados clínicos varía según la región y el contexto epidemiológico (74). En el estudio realizado por León D. et al., titulado “Caracterización molecular de Enterobacterias multirresistentes en dos departamentos de la selva peruana”, se reportó que, de las 61 cepas estudiadas, el gen *bla*SHV estaba presente en *Escherichia coli* con una frecuencia de 9,8 % y en *Klebsiella pneumoniae* con un 6,56 % (75). Por su parte, Coral D. et al., en su estudio “Caracterización molecular de genes de resistencia a β-lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia Enterobacteriaceae”, encontraron que *Escherichia coli* fue la bacteria más frecuente en los aislamientos con 86,40 % y seguida de *Klebsiella oxytoca* con 13,40 %, pero en ningún caso se detectó el gen *bla*SHV (76). Los datos obtenidos en el presente estudio difieren de los presentados previamente, mostrando una frecuencia del gen *bla*SHV de 3,50 % en *Escherichia coli*, del 11,80 % en *Klebsiella pneumoniae*, y del 1,20 % en *Proteus mirabilis* y *Morganella morganii*, respectivamente. En este contexto, *Klebsiella pneumoniae* destaca como la bacteria con mayor frecuencia de este gen, lo cual podría estar relacionado con diferencias en las prácticas clínicas, el uso de antibióticos o las características particulares de la población estudiada. Un ejemplo, es el estudio realizado por Al-Sheboul S. et al. en pacientes con neoplasias hematológicas, donde se demostró que el gen *bla*SHV fue el tipo de BLEE dominante en el 100% de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas (77).

La frecuencia de cepas productoras de BLEE varía considerablemente según el tipo de muestra y la región de estudio (78). En un análisis realizado por Ballén V. et al., sobre bacterias productoras de BLEE en cuatro hospitales de España, se reportó que el 44,88 % de las cepas provenían de muestras de orina, seguidas por muestras respiratorias 29,13 % y sangre 25,98 %, siendo el gen *bla*SHV el más frecuente con el 85,45 % (79). Por su parte, el estudio de Sakaeda K. et al., titulado “The genotypic and phenotypic characteristics contributing to flomoxef sensitivity in clinical isolates of ESBL-producing *E. coli* strains from urinary tract infections”, reportó que, entre los años 2008 y 2018, se aislaron 911 cepas de *E. coli* de muestras de orina, de las cuales solo 158 fueron productoras de BLEE (80). En comparación, el presente estudio demostró que la orina constituye la única fuente de aislados clínicos portadores del gen *bla*SHV, detectado en el 100 % de los casos. Esto se puede atribuir

a la existencia de un reservorio extrarrenal en la microbiota del tracto gastrointestinal, que podría contaminar la región periuretral debido a la proximidad anatómica, especialmente en mujeres. Este mecanismo ha sido analizado por Forde B. et al., en su estudio "Population dynamics of an Escherichia coli ST131 lineage during recurrent urinary tract infection", donde se demuestra esta etiología a través de casos clínicos (81, 82).

7. Capítulo VII

7.1. Conclusiones

- De las 85 cepas estudiadas se detectó la presencia del gen *bla*SHV responsable de la producción de BLEE en un 17,60 %.
- *Klebsiella pneumoniae* fue la bacteria con mayor frecuencia de detección del gen *bla*SHV, registrando el 11,80 % de los casos.
- El gen *bla*SHV fue detectado en las muestras de orina en el 17,60 %.
- Los resultados obtenidos reflejan la situación local respecto a la diseminación de genes de resistencia como *bla*SHV, enfatizando la importancia de vigilar bacterias resistentes a los betalactámicos.

7.2. Recomendaciones

- Realizar nuevos estudios con un mayor número de aislados clínicos bacterianos, preferiblemente de hospitales del sector público.
- Realizar la extracción de DNA bacteriano a través de métodos automatizados, ya que esta metodología permite optimizar recursos.
- Incluir en futuros estudios aislados clínicos de bacterias productoras de AmpC, considerando la presencia y relevancia de este tipo de resistencias en diversos patógenos bacterianos.

Referencias

1. Resistencia a los antibióticos [Internet]. Who.int. [citado el 23 de enero de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
2. Gauba A, Rahman KM. Evaluation of antibiotic resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Antibiotics (Basel)* [Internet]. 2023;12(11):1590. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics12111590>
3. Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules* [Internet]. 2020;25(6):1340. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25061340>
4. Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC Antimicrob Resist* [Internet]. 2021;3(3):dlab092. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>
5. Estudio: Hospital Oncológico “Dr. Julio Villacreses Colmont Solca” YSURALAC. Las infecciones bacterianas [Internet]. Sld.cu. [citado el 23 de enero de 2025]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rus/v10n5/2218-3620-rus-10-05-219.pdf>
6. Calvo J, Cantón R, Fernández F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos [Internet]. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. [citado el 23 de enero de 2025]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>
7. Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” I. Guía para la vigilancia por Laboratorio de la Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. 2024. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/943601/Gu_a_para_la_Vigilancia_p_or_Laboratorio_de_la_Resistencia_a_los_Antimicrobianos.pdf
8. Chaudhary MK, Jadhav I, Banjara MR. Molecular detection of plasmid mediated bla(TEM), bla(CTX-M,) and bla(SHV) genes in Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) *Escherichia coli* from clinical samples. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2023;22(1):33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12941-023-00584-0>
9. Abrar S, Ain NU, Liaqat H, Hussain S, Rasheed F, Riaz S. Distribution of bla(CTX - M) , bla(TEM) , bla(SHV) and bla(OXA) genes in Extended-spectrum- β -lactamase-producing Clinical isolates: A three-year multi-center study from Lahore, Pakistan.

- Antimicrob Resist Infect Control [Internet]. 2019;8:80. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13756-019-0536-0>
10. Celis Y, Rubio V, Camacho M. Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. Rev Colomb Biotecnol [Internet]. 2017;19. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v19n2/0123-3475-biote-19-02-00105.pdf>
 11. Arce Z, Llontop J, Alarcón E, López E. Detección de los genes SHV, TEM Y CTX-M en cepas de Escherichia coli β -lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo- Perú. Rev Cuerpo méd [Internet]. 2014; Disponible en: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/03/1052079/rcm-v7-n3-2014_pag27-30.pdf
 12. Vera G. Tipos de Betalactamasas de Espectro Extendido en aislados de Escherichia coli, obtenidos de muestras de heces de pacientes con gastroenteritis en Quito-Ecuador. [Quito-Ecuador]: Universidad Central del Ecuador; 2020. Disponible en: <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/795182cc-9262-4a04-bb6d-fa0fdc752240/content>
 13. Martins Da Silva S. Caracterização de Enterobacterales produtores de ESBL isolados de colonização comunitária do trato gastrointestinal. [Rio de Janeiro-Brasil]: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2023.
 14. Vista de Genotipificación por PCR convencional de genes de resistencia en Klebsiella pneumoniae productora de BLEE aisladas de muestras clínicas del servicio de UCI de dos hospitales de Cajamarca [Internet]. Edu.pe. [citado el 23 de enero de 2025]. Disponible en: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/view/3826/4447>
 15. González C. Resistencia enzimática a betalactámicos en Enterobacterales uropatógenos. Kasmera. 49:e49234109–e49234109.
 16. Astudillo VM, Merchan J, Cordero S. Frecuencia de (BLEE) (AmpC) y carbapenemasas en muestras de urocultivo, en cepas de Escherichia coli de origen comunitario. Revista de Investigación en Salud VIVE. 2021;4(11):387–96.
 17. Genes involucrados con resistencia antimicrobiana en hospitales del Ecuador [Internet]. Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín; 2023. Disponible en: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2023/02/1416089/art_15_dra_ana_karina_zambrano.pdf
 18. Organización Panamericana de la Salud (OPS) OP. La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial [Internet]. Paho.org. [citado el 23 de enero de 2025]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>

19. Giono-Cerezo S, Santos-Preciado JI, Morfín-Otero MDR, Torres-López FJ, Alcántar-Curiel MD. Antimicrobial resistance. Its importance and efforts to control it. *Gac Med Mex* [Internet]. 2020;156(2):171–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.24875/GMM.M20000358>
20. Camacho L. Resistencia bacteriana, una crisis actual. *Rev Esp Salud Pública* [Internet]. 2023;97. Disponible en: https://www.sanidad.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/resp/revista_cdrom/VOL97/C_ESPECIALES/RS97C_202302013.pdf
21. Muteeb G, Rehman MT, Shahwan M, Aatif M. Origin of antibiotics and antibiotic resistance, and their impacts on drug development: A narrative review. *Pharmaceuticals (Basel)* [Internet]. 2023;16(11):1615. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16111615>
22. Goodall DJ, Warecka D, Hawkins M, Rudolph CJ. Interplay between chromosomal architecture and termination of DNA replication in bacteria. *Front Microbiol* [Internet]. 2023;14:1180848. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2023.1180848>
23. Garde S, Chodiseti PK, Reddy M. Peptidoglycan: Structure, synthesis, and regulation. *EcoSal Plus* [Internet]. 2021;9(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2020>
24. Kumar S, Mollo A, Kahne D, Ruiz N. The bacterial cell wall: From lipid II flipping to polymerization. *Chem Rev* [Internet]. 2022;122(9):8884–910. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00773>
25. Liu B, Zheng D, Zhou S, Chen L, Yang J. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2022;50(D1):D912–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkab1107>
26. Janda JM, Abbott SL. The changing face of the family Enterobacteriaceae (order: “Enterobacterales”): New members, taxonomic issues, geographic expansion, and new diseases and disease syndromes. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2021;34(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00174-20>
27. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, S. Gupta R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacterales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and

- Budviciaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2016;66(12):5575–99. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
28. Camacho Silvas LA. Resistencia bacteriana, una crisis actual. *Rev Esp Salud Pública*. 2023; 97: 20 de febrero e202302013.
 29. Natalia T. Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana [Internet]. *Edu.ar*. [citado el 23 de enero de 2025]. Disponible en: https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/136280/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 30. Patel PH, Hashmi MF. *Macrolides*. En: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025.
 31. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2009;27(1):44–52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
 32. Hernández-Torres EG-VA. Los betalactámicos en la práctica clínica [Internet]. *Seq.es*. [citado el 23 de enero de 2025]. Disponible en: <https://seq.es/seq/0214-3429/28/1/gomez.pdf>
 33. Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, Zidan BRM, Mitra S, Emran TB, et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *J Infect Public Health* [Internet]. 2021;14(12):1750–66. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
 34. Quichimbo P. Resistencia bacteriana: La guerra contra las bacterias [Internet]. *PULSO*. 2021 [citado el 23 de enero de 2025]. Disponible en: <https://pulso.news.blog/2021/07/26/resistencia-bacteriana-la-guerra-contra-las-bacterias/>
 35. Correa A, De la Cadena E. Resistencia bacteriana a los antibióticos beta- lactámicos [Internet]. *Edu.co*. 2020 [citado el 23 de enero de 2025]. Disponible en: <https://libros.usc.edu.co/index.php/usc/catalog/download/113/158/2213?inline=1>
 36. Lepe JA, MartínezL. Mecanismos de resistencia en bacterias gramnegativas. *Med Intensiva* [Internet]. 2022;46(7):392–402. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medin.2022.02.004>
 37. Angarita M, Di Filippo-Iriarte G, Mora DP, Ferrebuz AJ. Efecto del bloqueo de bombas de eflujo en el tratamiento antimicrobiano en cepas con multiresistencia tipo BLEE de origen clínico en Boyacá, Colombia. *Rev médicas UIS* [Internet]. 2024;37(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18273/revmed.v37n1-2024001>
-

38. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, et al. B-lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st century. *J Mol Biol* [Internet]. 2019;431(18):3472–500. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
39. Astocondor L. Betalactamasas: la Evolución del Problema. *Revista Peruana de Investigación en Salud* [Internet]. 2018 [citado el 23 de enero de 2025]; Disponible en: <https://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/100/100308007/html/>
40. Martínez-Martínez L. Asociación de BLEE con otros mecanismos de resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2007 [citado el 23 de enero de 2025];25:38–47. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-asociacion-blee-con-otros-mecanismos-13112087>
41. Pishtiwan AH, Khadija KM. Prevalence of blaTEM, blaSHV, and blaCTX-M Genes among ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolated from Thalassemia Patients in Erbil, Iraq. *Mediterr J Hematol Infect Dis* [Internet]. 2019;11(1):e2019041. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4084/MJHID.2019.041>
42. Keim P. Bacterial Variable Number Tandem Repeats Author links open overlay panel [Internet]. *Scencedirect.com*. 2013 [citado el 23 de enero de 2025]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123749840016302>
43. Zhuang M, Achmon Y, Cao Y, Liang X, Chen L, Wang H, et al. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environ Pollut* [Internet]. 2021;285(117402):117402. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402>
44. Polianciuc SI, Gurzău AE, Kiss B, Ștefan MG, Loghin F. Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Med Pharm Rep* [Internet]. 2020;93(3):231–40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15386/mpr-1742>
45. Coluzzi C, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, Rocha EPC. Evolution of Plasmid mobility: Origin and fate of conjugative and non conjugative plasmids. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2022;39(6). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msac115>
46. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2018;73(5):1121–37. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkx488>
47. Perú I. La Transferencia Horizontal de Genes El Peligro Oculto de la Ingeniería Genética [Internet]. Instituto de Desarrollo y Medio Ambiente. 2022 [citado el 23 de

- enero de 2025]. Disponible en: <https://idmaperu.org/la-transferencia-horizontal-de-genes-el-peligro-oculto-de-la-ingenieria-genetica/>
48. Kumar A. Jump around: transposons in and out of the laboratory. *F1000Res* [Internet]. 2020;9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.21018.1>
 49. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2010;54(3):969–76. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
 50. Sonola VS, Katakweba A, Misinzo G, Matee MI. Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes and virulence factors in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from rodents, humans, chicken, and household soils in karatu, northern Tanzania. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2022;19(9):5388. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph19095388>
 51. El Aila NA, Al Laham NA, Ayesh BM. Prevalence of extended spectrum beta lactamase and molecular detection of blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genotypes among Gram negative bacilli isolates from pediatric patient population in Gaza strip. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2023;23(1):99. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-023-08017-1>
 52. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2020;33(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00047-19>
 53. Méndez, I. (2021). Análisis Molecular de Metalobetalactamasa (blaVIM-2) y Betalactamasa (blaSHV-2) en Patotipos de *Escherichia coli* y *Escherichia coli* Comensales, Aislados de Niños del Área Metropolitana de Bucaramanga [Internet]. Edu.co. 2021 [citado el 23 de enero de 2025]. Disponible en: <https://repositorio.udes.edu.co/server/api/core/bitstreams/9ca2589a-d907-4a23-a19f-8762cfd21794/content>
 54. González E, Patiño L, Ore E, Martínez V, Moreno S, Cruzado NB, et al. Extended spectrum type CTX-M β -lactamases in clinical infections caused by *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* at the Instituto Nacional de Salud del Niño-Breña, Lima, Peru. *Rev Medica Hered* [Internet]. 2020 [citado el 23 de enero de 2025];30(4):242–8. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2019000400005
 55. Logan LK, Rispens JR, Medernach RL, Domitrovic TN, Hujer AM, Marshall SH, et al. A multicentered study of the clinical and molecular epidemiology of TEM- and SHV-

- type extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacterales infections in children. *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. 2021;40(1):39–43. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0000000000002916>
56. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 34th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: CLSI; 2024.
 57. Boutal H, Moguet C, Pommès L, Simon S, Naas T, Volland H. The revolution of lateral flow assay in the field of AMR detection. *Diagnostics (Basel)* [Internet]. 2022 [citado el 23 de enero de 2025];12(7):1744. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2075-4418/12/7/1744>
 58. Quintero Rodríguez MP, Montoya Arango D, Restrepo Posada DC, González Gil DM. Conservación de bacterias por liofilización en la Colección de Microorganismos CM-EM-UDEA, Medellín, Colombia. *Biota Colomb* [Internet]. 2023 [citado el 23 de enero de 2025];24(2):e1127. Disponible en: <https://revistas.humboldt.org.co/index.php/biota/article/view/1127>
 59. Raju, R., Bryant, S. J., Wilkinson, B. L., & Bryant, G. (2020). The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability. *Biochimica et Biophysica Acta. General Subjects*, 1865(1), 129749. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129749>
 60. Araya, I., Prat, S., Ramírez, V. (2015). *Recomendaciones para el control de Calidad en Bacteriología: Estudio de susceptibilidad antimicrobiana mediante difusión por disco*. Ispch.cl. Recuperado el 23 de enero de 2025, de https://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendacion_Contro_Calidad_Bacteriologia.pdf
 61. Silago, V., Kovacs, D., Samson, H., Seni, J., Matthews, L., Oravcová, K., Lupindu, A. M., Hoza, A. S., & Mshana, S. E. (2021). Existence of multiple ESBL genes among phenotypically confirmed ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* concurrently isolated from clinical, colonization and contamination samples from neonatal units at Bugando medical center, Mwanza, Tanzania. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050476>
 62. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr Protoc Mol Biol* [Internet]. 2001;Chapter 2(1):Unit 2.4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>

63. Dashti, A., Jadaon, M., Abdulsamad, A. M., & Dashti, H. (2009). Heat treatment of bacteria: A simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Medical Journal*, 41(2), 117–122.
https://applications.emro.who.int/imemrf/kmj_2009_41_2_117.pdf
64. Applied Biological Materials (ABM). (s/f). *Taq DNA Polymerase*. Abmgood.com. Recuperado el 23 de enero de 2025, de https://www.abmgood.com/uploads/document/g009_datasheet_v1_final.pdf
65. The Biotechnology Education Company. Principios y práctica de la electroforesis en gel de agarosa [Internet]. Edvotek.com. [citado el 23 de enero de 2025]. Disponible en:
<https://www.edvotek.com/site/pdf/101sp.pdf?srsId=AfmBOopkOKMmd8zsFQK0M8kEYUhzZHMkafzZQh3Dozwxq4FyPKxrbbGG>
66. Método: Gel de electroforesis Agarosa [Internet]. Conogasi. 2017 [citado el 23 de enero de 2025]. Disponible en: <https://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa/>
67. Barrantes Jiménez K, Chacón Jiménez L, Arias Andrés M. El impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo sostenible. *Poblac Salud Mesoam* [Internet]. 2021 [citado el 23 de enero de 2025];19(2):305–29. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-02012022000100305
68. Kazemian H, Heidari H, Ghanavati R, Ghafourian S, Yazdani F, Sadeghifard N, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of ESBL-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolates. *Med Princ Pract* [Internet]. 2019;28(6):547–51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1159/000500311>
69. Ajani TA, Elikwu CJ, Anaedobe CG, Onwuzo CN, Tayo B, Okangba CC, et al. Evaluation of phenotypic and molecular technique in the detection of Extended Spectrum beta-lactamase (esbl)-producing gram negative bacilli in Ogun state, Nigeria. *Ann Ib Postgrad Med*. 2022;20(2):160–8.
70. Sedlakova M, Hanulik V, Chroma M, Hricova K, Kolar M, Latal T, et al. Phenotypic detection of broad-spectrum beta-lactamases in microbiological practice. *Med Sci Monit* [Internet]. 2011;17(5):BR147-52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.12659/msm.881761>
71. Estaleva CEL, Zimba TF, Sekyere JO, Govinden U, Chenia HY, Simonsen GS, et al. High prevalence of multidrug resistant ESBL- and plasmid mediated AmpC-producing

- clinical isolates of *Escherichia coli* at Maputo Central Hospital, Mozambique. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2021;21(1):16. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-020-05696-y>
72. Shoja S, Ansari M, Bengar S, Rafiei A, Shamseddin J, Alizade H. Bacteriological characteristics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* rmpA gene (hvKp-rmpA)-harboring strains in the south of Iran. *Iran J Microbiol* [Internet]. 2022;14(4):475–83. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18502/ijm.v14i4.10233>
73. Bastidas-Caldes C, Cisneros-Vásquez E, Zambrano A, Mosquera-Maza A, Calero-Cáceres W, Rey J, et al. Co-Harboring of Beta-Lactamases and mcr-1 Genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Healthy Carriers and Backyard Animals in Rural Communities in Ecuador. *Antibiotics* (Basel) [Internet]. 2023;12(5):856. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics12050856>
74. Choonara FE, Haldorsen BC, Janice J, Mbanganga J, Ndhlovu I, Saulosi O, et al. Molecular epidemiological characterisation of ESBL- and Plasmid-mediated AmpC-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at kamuzu central hospital, Lilongwe, Malawi. *Trop Med Infect Dis* [Internet]. 2022;7(9):245. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/tropicalmed7090245>
75. León-Luna D, Fajardo-Loyola A, Yareta-Yareta J, Burgos-Espejo A, Peralta-Siesquen C, Galarza-Pérez M, et al. Caracterización molecular de enterobacterias multirresistentes en dos departamentos de la selva peruana. *Biomedica* [Internet]. 2021;41(Sp. 2):180–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.5720>
76. Coral D, Yauri M, Alcocer L. Caracterización molecular de genes de resistencia a β -lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia Enterobacteriaceae. *Rev Ecuat Med Cienc Biol* [Internet]. 2021;42(1). Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/8575337.pdf>
77. Al-Sheboul SA, Al-Madi GS, Brown B, Hayajneh WA. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Jordanian hospitals. *J Epidemiol Glob Health* [Internet]. 2023;13(2):180–90. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s44197-023-00096-2>
78. Dioli C, Pappa O, Siatravani E, Bratakou S, Tatsiopoulos A, Giakkoupi P, et al. Molecular characterization and prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates derived from clinical specimens and environmental habitats. *Microorganisms* [Internet]. 2023;11(6):1399. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms11061399>

79. Ballén V, Gabasa Y, Ratia C, Ortega R, Tejero M, Soto S. Antibiotic resistance and virulence profiles of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical sources. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021;11:738223. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2021.738223>
80. Sakaeda K, Sadahira T, Maruyama Y, Iwata T, Watanabe M, Wada K, et al. The genotypic and phenotypic characteristics contributing to flomoxef sensitivity in clinical isolates of ESBL-producing *E. coli* strains from urinary tract infections. *Antibiotics (Basel)* [Internet]. 2023;12(3). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics12030522>
81. Neugent ML, Hulyalkar NV, Nguyen VH, Zimmern PE, De Nisco NJ. Advances in understanding the human urinary microbiome and its potential role in urinary tract infection. *MBio* [Internet]. 2020;11(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00218-20>
82. Forde BM, Roberts LW, Phan M-D, Peters KM, Fleming BA, Russell CW, et al. Population dynamics of an *Escherichia coli* ST131 lineage during recurrent urinary tract infection. *Nat Commun* [Internet]. 2019;10(1):3643. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11571-5>

Anexos

Anexo A: Operacionalización de variables

Variable	Definición	Dimensión	Indicador	Escala
Género y especie bacteriana	Es un conjunto de poblaciones clonales que presentan un elevado grado de similitud fenotípica entre sí y que a su vez difieren de otros conjuntos de poblaciones clonales.	Cultivo	Formulario de recolección de datos	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Escherichia coli</i> ● <i>Klebsiella pneumoniae</i> ● <i>Klebsiella oxytoca</i> ● <i>Klebsiella ozaenae</i> ● <i>Proteus vulgaris</i> ● <i>Proteus mirabilis</i> ● <i>Morganella morganii</i>
Test de doble disco	Prueba fenotípica de disco combinado para detección de BLEE.	Presencia o ausencia del halo de inhibición	Diferencias entre los diámetros de los halos de inhibición.	Positivo ____ Negativo ____

Tipo de muestra	Materiales de origen biológico que se recolectan y utilizan para realizar análisis, investigaciones y diagnósticos.	Muestra o fluido biológico	Formulario de recolección de datos	<ul style="list-style-type: none"> ● Orina ● Sangre ● Secreciones de piel y tejidos blandos ● Líquidos ● Secreción vaginal
Gen de Resistencia	Segmento de ADN que posee la información para la resistencia a determinados antibióticos.	Expresión del gen	Resultado de PCR.	Presencia del gen <i>bla</i> <i>SHV</i> Detectado ____ No detectado ____

Anexo B: Formulario de recolección de datos



Universidad de Cuenca
Facultad de Ciencias Médicas
Carrera de Laboratorio Clínico

Detección del gen blaSHV en enterobacteriales productores de betalactamasas de espectro extendido en cepas procedentes de la Clínica Santa Ana y Hospital del Río, Cuenca 2024.

DATOS				
Género bacteriano:		Especie:		
Tipo de muestra				
Sangre <input type="checkbox"/> Orina <input type="checkbox"/> Líquidos <input type="checkbox"/> Secreciones de piel y tejidos blandos <input type="checkbox"/> Secreción vaginal <input type="checkbox"/>				
Pruebas fenotípicas de resistencia bacteriana				
Test de doble disco:	Positivo	<input type="checkbox"/>	Negativo	<input type="checkbox"/>
Pruebas genotípicas de resistencia bacteriana: <i>bla</i> SHV: Positivo ____ Negativo ____				
Investigadores: Paulina Quichimbo y Diego Vicente				

Anexo C: Oficio de autorización



OFICIO AL DIRECTOR DEL HOSPITAL DEL RÍO

Cuenca, 10 de junio de 2024

Dr. Óscar Miguel Chango

DIRECTOR DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DEL RÍO

Presente

De nuestra consideración:

Luego de un cordial y atento saludo, yo Paulina Ivanova Quichimbo Tuza con CI 1900762533, yo Diego Sebastián Vicente Padilla con CI 0106607674, estudiantes de la **Universidad de Cuenca, Carrera de Laboratorio Clínico**, mediante el presente, solicitamos de la manera más comedida a usted como Director del Hospital Universitario del Río, la carta de interés de la institución a fin de continuar con el trámite para la aprobación necesaria para desarrollar el proyecto de investigación con el tema: **Detección del gen *m-SHV* en enterobacteriales productores de betalactamasas de espectro extendido en cepas procedentes de la Clínica Santa Ana y Hospital del Río, Cuenca 2024.**

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

Atentamente



Paulina Ivanova Quichimbo Tuza

Diego Sebastián Vicente Padilla
HOSPITAL UNIVERSITARIO DEL RIO
LABORATORIO CLÍNICO
Leda Elizabeth Jimena
LABORATORISTA
REG. M.S.P. 10074111999
CP 445 C.I.: 0104120940
13/06/2024

UCUENCA
CIENCIAS MÉDICAS

OFICIO AL DIRECTOR DE LA CLÍNICA SANTA ANA

Cuenca, 19 de junio de 2024

Dra. Verónica Jiménez
DIRECTORA DE LA CLÍNICA SANTA ANA

Presente

De nuestra consideración:

Luego de un cordial y atento saludo, yo Paulina Ivanova Quichimbo Tuza con CI 1900762533, yo Diego Sebastián Vicente Padilla con CI 0106607674, estudiantes de la **Universidad de Cuenca, Carrera de Laboratorio Clínico**, mediante el presente, solicitamos de la manera más comedida a usted como Directora de la Clínica Santa Ana, la carta de interés de la institución a fin de continuar con el trámite para la aprobación necesaria para desarrollar el proyecto de investigación con un tiempo de intervención Marzo-Agosto 2024, con el tema: **Detección del gen *SHV* en enterobacteriales productores de betalactamasas de espectro extendido en cepas procedentes de la Clínica Santa Ana y Hospital del Río, Cuenca 2024.**

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

Atentamente


Paulina Ivanova Quichimbo Tuza
Diego Sebastián Vicente Padilla

Dirección: A.v El Paraíso s/n. junto la Hospital Vicente Corral Moscoso. Telf: 593-7-4051000 Ext.: 3165 Web:
www.ceish.ucuenca.edu.ec
Correo: ceish@ucuenca.edu.ec
Cuenca - Ecuador

*Recibido
20/06/2024*