



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN BROTE NOSOCOMIAL DE
ESCHERICHIA COLI, PRODUCTORA DE CARBAPENEMASAS, EN UN
HOSPITAL PÚBLICO DE QUITO.

Autora

Lizeth Estefanía Ortiz Terreros

Año
2018



FACULTAD DE INGENIERIAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN BROTE NOSOCOMIAL DE
ESCHERICHIA COLI, PRODUCTORA DE CARBAPENEMASAS, EN UN
HOSPITAL PÚBLICO DE QUITO.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

MSc. Andrea Paola Cordero Arroyo

Autora

Lizeth Estefanía Ortiz Terreros

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, "Caracterización molecular de un brote nosocomial de *Escherichia coli*, productora de carbapenemasas, en un hospital público de Quito", a través de reuniones periódicas con el estudiante Lizeth Estefanía Ortiz Terreros, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Andrea Paola Cordero Arroyo

Master en Células Madre y Medicina Regenerativa

CI. 171466982 5

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, "Caracterización molecular de un brote nosocomial de *Escherichia coli*, productora de carbapenemasas, en un hospital público de Quito", del Lizeth Estefanía Ortiz Terreros, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Carlos Andrés Bastidas Caldés
Master en Microbiología Avanzada
CI. 020161980 6

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

Declaro haber dirigido científicamente a la estudiante Lizeth Estefania Ortiz Terreros para la realización de su trabajo experimental de titulación “Caracterización molecular de un brote nosocomial de *Escherichia coli*, productora de carbapenemasas, en un hospital público de Quito” en base al método científico. Conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos.

Paúl Andrés Cárdenas Aldaz

Doctor en Genética y Genómica Molecular

CI: 1713149183

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Lizeth Estefanía Ortiz Terreros

CI: 1002363644

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Paul Cárdenas por su guía y conocimientos impartidos a lo largo de la investigación, a la MSc. María Belén Prado por el soporte, ayuda y momentos compartidos en todo este tiempo.

Al Dr. Manuel Baldeon y al Dr. Marco Fronasini por su conocimiento, tutela, e inspiración para quienes creemos en la investigación.

A mis padres Carlos y Sandra por su apoyo constante y sus consejos.

A Alejandra y Salome por ser esa voz que nos permite ver las cosas desde otro punto y por demostrar que los Km es solo una unidad de distancia y 4400 es el código.

A Alejandro Yáñez, por el amor, cariño, paciencia, ser un apoyo y respaldo en el transcurso de este tiempo

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a mis padres Carlos y Sandra por su apoyo y motivación, por creer en mí y no dejarme desmayar, mis hermanos Francisco y Ariana, por quienes deseo ser un ejemplo de perseverancia y trabajo. Y a todas esas estrellas fugaces que hoy ya no están conmigo, pero estarán siempre en la memoria. Para todos ustedes mí, trabajo, esfuerzo y dedicación.

RESUMEN

La palabra nosocomial es usada para definir a una enfermedad que fue adquirida por un paciente una vez que este ingresó al hospital, es un tipo de infección que se desarrolla en el periodo de 48 a 72 horas. La administración de una terapia antibiótica adecuada puede ser un mecanismo de acción frente a esas infecciones. Algunas infecciones nosocomiales son producidas por enterobacterias Gram negativas, entre las cuales se destaca *Escherichia coli*. El constante uso de antibióticos de forma desmesurada ha provocado que estas enterobacterias desarrollen resistencia a los antibióticos, lo que ha generado un gran problema de salud pública, ya que al poseer esta resistencia antibiótica su tratamiento y control es más difícil, incrementando el riesgo de morbilidad y mortalidad de los pacientes. Es por este motivo que la presente investigación tuvo como objetivo, analizar la clonalidad de aislados de *Escherichia coli* causantes de infecciones nosocomiales en el Hospital de Especialidades FFAA N°1, utilizando un sistema molecular de detección epidemiológico usando extracción de ADN, PCR, Electroforesis y Secuenciación.

Se pudo determinar que el brote que existía en el hospital era de origen policlonal, se identificaron 3 nódulos importantes de los cuales destacan las ST 43, 2 y 24. Las ST encontradas en su mayoría se encuentran reportadas en países de Asia y otras en Europa. Se pudo encontrar ST nuevas que no se encuentran reportadas en la base de datos del Instituto Pasteur (Francia), también se pudo evidenciar que el brote era variante en el tiempo, es decir que a lo largo del estudio este presentó meses con altos índices de infecciones y otros muy bajos.

Palabras Clave: Infección Nosocomial, *Escherichia coli*, multiresistencia, bacterias Gramnegativas

ABSTRACT

The word nosocomial is used to define a disease that was acquired by a patient once he was admitted to the hospital, it is a type of infection that develops in the period of 48 to 72 hours. The administration of an appropriate antibiotic therapy can be a mechanism of action against these infections. Some nosocomial infections are caused by Gram-negative enterobacteria, among which *Escherichia coli* stands out. The constant use of antibiotics in an excessive way has caused these enterobacteria to develop resistance to antibiotics, which has generated a great public health problem, since having this antibiotic resistance, treatment and control is more difficult, increasing the risk of morbidity and mortality of patients. It is for this reason that the present investigation aimed to analyze the clonality of *Escherichia coli* isolates causing nosocomial infections in the Hospital de Especialidades FFAA N ° 1, using a molecular system of epidemiological detection using DNA extraction, PCR, Electrophoresis and Sequencing

It was possible to determine that the outbreak that existed in the hospital was of polyclonal origin, 3 important nodules were identified, of which ST 43, 2 and 24 stand out. The TS found in most of them are reported in Asian countries and others in Europe. It was possible to find new ST that are not reported in the database of the Pasteur Institute (France), it was also possible to show that the outbreak was variant in time, that is to say that throughout the study it presented months with high rates of infections and others very low.

Keywords: Nosocomial infection, *Escherichia coli*, multiresistance, Gram-negative bacteria

INDICE

1.CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema	2
1.3 Objetivo general.....	3
1.4 Objetivos específicos	4
1.5 Justificación	4
2.CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	5
2.1 Infección nosocomial	5
2.2 Enterobacterias.....	7
2.2.1 Especie.....	7
2.2.2 Cepa	7
2.2.3 Clon.....	7
2.2.4 Escherichia coli (E. coli).....	8
2.3 β -lactamasas	9
2.4 Antibióticos β -lactámicos	11
2.4.1 Penicilinas.....	14
2.4.2 Cefalosporinas	14
2.4.3 Monobactámicos.....	15
2.4.4 Carbapenémicos,	16
2.4.5 Inhibidores de las β -lactamasas	16
2.5 Genes Housekeeping	17
2.6 Multilocus Sequence Typing (MLST)	18
3.CAPÍTULO III: DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ...	19
4.CAPÍTULO IV: PROCEDIMIENTOS	20
4.1 Población y muestra	20
4.1.1 Población.....	20
4.1.2 Muestras.....	20
4.2 Materiales y métodos para la obtención de datos	20
4.2.1 Obtención de las muestras.....	20

4.2.1.1 Tipos de muestras	21
4.2.1.2 Identificación.....	21
4.2.1.3 Formularios.....	22
4.2.2 Métodos Moleculares.....	23
4.2.3 Descongelamiento y siembra.....	23
4.2.4 Extracción de ADN.....	23
4.2.5 Cuantificación de ADN.....	23
4.2.6 Procedimiento para Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	24
4.2.6.1 Hidratación de primers.....	24
4.2.6.2 Parámetros para PCR.....	24
4.2.7 Electroforesis	25
4.2.8 Secuenciamiento	26
4.3 Evaluación estadística de los resultados	26
5.CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
5.1 Análisis de las características epidemiológicas del brote de infecciones nosocomiales.....	26
5.1.1 Servicios Hospitalarios.....	26
5.1.2 Tipo de muestra.....	28
5.1.3 EDAD.....	29
5.2 Determinación de un patrón de clonalidad en las infecciones nosocomiales.....	31
5.2.1 Genotipos encontrados.....	31
5.2.2 Identificación de genes	35
5.3 Relación entre resistencia o sensibilidad al antibiótico y sexo del paciente.	37
5.4 Determinar si los clones predominantes en los brotes epidémicos se mantienen durante el tiempo o son variables.	38
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	40
6.1 Conclusiones	40
6.2 Recomendaciones	41
REFERENCIAS.....	42
ANEXOS	49

1.CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La palabra nosocomial se utiliza para denominar a una enfermedad adquirida por un paciente en un hospital, por lo que también se le conoce como intrahospitalaria. Se presenta cuando un paciente ingresa en una casa de salud por diferentes motivos y desarrollaba en un comienzo una infección en un lapso de 48 a 72 horas inicialmente, pero gracias a los factores que contribuyen a su desarrollo las estancias prolongadas, causadas por procesos quirúrgicos, cateterismos, uso de respiradores mecánicos, entre otros, también son causantes de infecciones nosocomiales. El emplear una terapia antibiótica poco adecuada también tiene relación con la aparición de este tipo de infecciones debido a que es determinante para que los microorganismos desarrollen resistencia antibiótica. (Breathnach, Nosocomial infections and infection control, 2013)

Una de las opciones de tratamiento frente a una infección es la correcta administración de los antibióticos adecuados en el momento preciso. Un hospital debe tener un sistema de vigilancia que permita obtener información de forma eficaz para una acción rápida, pero los métodos de epidemiología tradicional llevan tiempo, y no se puede conseguir un diagnóstico de manera oportuna, provocando que estas infecciones se propaguen de forma acelerada con consecuencias negativas para los pacientes. (Mejia, 2009)

Las infecciones nosocomiales pueden ser producidas por enterobacterias Gram negativas, entre las cuales se destaca *Escherichia coli*. El aumento de genes de resistencia en esta bacteria dificulta su control. Entre los principales mecanismos para la inhibición de la acción de los antibióticos se encuentra la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales son responsables de la resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta

generación y aztreonam lo cual ocasiona una amplia gama de resistencia y minimiza las opciones para un tratamiento exitoso (Guzmán Blanco, Labarca, Villegas, & Gotuzzo, 2014).

Las β -lactamasas al ser una de las enzimas con capacidad de producir hidrólisis del anillo β -lactámico genera la inactivación de los antibióticos pertenecientes a los carbapenémicos que son los de mayor uso en los hospitales. El aumento desmedido de bacterias productoras de β -lactamasas está generando problemas para el sistema de salud con lo que respecta a su control y tratamiento debido a que incrementan el índice de mortalidad de los pacientes.

1.2 Planteamiento del problema

Las infecciones nosocomiales generan repercusiones importantes en el ambiente hospitalario al producir complicaciones en los pacientes, incrementar el índice de mortalidad y costos tanto para el hospital como para el paciente que permanece estancias prolongadas. La incidencia de estas infecciones es mayor en países en vías de desarrollo, por ejemplo, en el Reino Unido la probabilidad de contraer estas infecciones es del 5%, mientras que en Latino América el índice llega a ser 10%. (Guzmán Blanco, Labarca, Villegas, & Gotuzzo, 2014).

En algunos casos el programa de control para infecciones nosocomiales llega a ser muy deficiente debido a que solo se le asigna un 5% del presupuesto general del hospital y este monto no llega a cubrir los costos causados por este tipo de infecciones que pueden variar según el tipo de hospital, infección contraída y país. En países desarrollados el costo por infección relacionada con el tracto urinario puede ser de \$560 a \$1200, pero en infecciones del torrente sanguíneo puede llegar hasta aproximadamente \$3000. (García M, Aragón V, & Rosero P, 2003). La distribución de los recursos llega a ser preocupante al evaluar los costos en países en vías de desarrollo, aunque si bien no se lograr tener una

cifra exacta, llega a ser preocupante al considerar la alta tasa de mortalidad existente (García M, Aragón V, & Rosero P, 2003).

A menudo se produce una colonización de bacterias patógenas en las superficies o en el interior de equipos médicos, los cuales se convierten en potenciales causantes de enfermedades infecciosas que pueden llegar a generar complicaciones para los pacientes y en ocasiones la muerte. La aparición y propagación de infecciones nosocomiales en el siglo XXI ha causado un aproximado de 13 millones de muertes por año, por lo cual se han buscado alternativas para combatirlas. Se empezó a utilizar nuevos tipos de antibióticos como fue el caso del Colistina, que en un comienzo fue una alternativa para contrarrestar las infecciones nosocomiales, pero con el paso del tiempo perdió efecto, debido a que los patógenos crearon resistencia a este antibiótico (Tan, et al., 2017).

La resistencia generada por el abuso de los antibióticos contribuye a que cada vez se encuentren con más frecuencia en las casas de salud, bacterias con multiresistencia antibiótica, creando inconvenientes al momento de tratar las infecciones. La rápida propagación y transmisión de los genes de resistencia, entre bacterias, complica más la forma de tratar de contrarrestar la propagación de las infecciones. (Onkar A. Naik, Characterization of multiple antibiotic resistance of culturable microorganisms and metagenomic analysis of total microbial diversity of marine fish sold in retail shops in Mumbai, India., 2017)

1.3 Objetivo general

Analizar la clonalidad de aislados de *Escherichia coli* causantes de infecciones nosocomiales en el Hospital de Especialidades FFAA N°1, utilizando un sistema molecular de detección epidemiológico.

1.4 Objetivos específicos

Analizar las características epidemiológicas del brote de infecciones nosocomiales de *Escherichia coli* en el Hospital de Especialidades FFAA N°1.

Determinar si existe un patrón de clonalidad en las infecciones nosocomiales causadas por *Escherichia coli* empleando técnicas moleculares, como Extracción de ADN, PCR, Electroforesis y Secuenciación.

Determinar el tiempo de prevalencia de los clones predominantes en los brotes epidémicos.

1.5 Justificación

En el Ecuador son muy escasos los estudios realizados con respecto a esta problemática, es por ello que el presente estudio busca identificar las Secuencias Tipo (ST) de *Echerichia coli* que se encuentran presentes en el Hospital de Especialidades FFAA N°1, y las áreas con mayor incidencia. (Garcia M, Aragón V, & Rosero P, 2003)

Debido a que los brotes surgen de forma rápida es importante identificar la bacteria que los está causando. El Análisis de Secuencias Tipo Multilocus (MLST), es una herramienta que usa secuencias cortas y genes conservados para generar una relación y determinar si las secuencias analizadas son clones de una misma bacteria o son diferentes. También se puede establecer la filogenia. (Jans, et al., 2016).

La detección, seguimiento y control a tiempo de estas infecciones es de gran importancia, ya que los pacientes deben alargar su estadía en el hospital debido

a un retraso en su tratamiento, porque los microorganismos causantes no son detectados a tiempo por los mecanismos de análisis tradicional, es decir las pruebas de laboratorio de rutina lo que incrementa de manera significativa el costo de hospitalización y tratamiento por paciente. Esto representa una carga económica bastante fuerte que el presupuesto de salud debe afrontar y en muchos casos no es posible, incluso algunos hospitales públicos no cuentan con la capacidad presupuestaria extra para tratar este tipo de infecciones. (Custovic, et al., 2014).

2.CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Infección nosocomial

Una infección nosocomial es aquella que se desarrolla una vez que ha ingresado un paciente a una casa de salud. Las infecciones de este tipo son variadas pudiendo abarcar diversos órganos y tejidos como sangre, tracto urinario, piel, ojos, oídos, nariz, garganta, pulmones entre otras. Son causadas en su gran mayoría por bacterias, pero también agentes virales y fúngicos, y son responsables del incremento del riesgo de morbilidad y mortalidad de los pacientes. En países en desarrollo este riesgo es mayor debido a que se debe considerar los tipos de procedimientos a los que los pacientes son sometidos y que en algunos hospitales públicos puede haber una sobre población de pacientes, supervisión inadecuada y asignación de recursos limitada. (Doaa & Omnia S, 2014).

Otro de los aspectos a tomar en cuenta al momento del desarrollo de otras infecciones es el tiempo en el que este se manifiesta. Si bien se sabe que es contraída en una casa de salud el periodo en el cual puede presentarse es de 48 horas del ingreso del paciente o incluso posteriores al alta del mismo. Además, la fisiopatología de este tipo de infecciones no es el mismo que una infección

común, debido a que la clave para que una infección llegue a pasar a un estado de gravedad es la disminución de las defensas del paciente y que bacterias patógenas lleguen a colonizar. Es aquí cuando pacientes que requieren procedimientos invasivos que comprometan algunas de las barreras de mucosas, como son catéteres ya sean arteriales, urinarios o venosos centrales, y tubos traqueales. Conjuntamente los procedimientos de diagnóstico, terapia y alteraciones del sistema inmune del paciente, genera una mayor susceptibilidad al padecimiento de este tipo de infecciones. (Amer Custovic, 2014).

El índice de mortalidad en los pacientes hospitalizados llega a un aproximado del 4%, de los cuales el 50% es producido por enterobacterias Gram negativas. Considerando los factores en los que se encuentra el paciente, el momento y tipo de terapia utilizada, se genera un porcentaje de mortalidad más elevado en los pacientes con infecciones nosocomiales en comparación con otros. (Sligl, Dragan, & Smith, 2015). Uno de los factores determinantes para el contagio y propagación de este tipo de infecciones son los portadores asintomáticos, entre los que se considera al personal del hospital, como médicos, enfermeras, camilleros, auxiliares. Cerca del 75% de estas infecciones se encuentran en países en vías de desarrollo, mientras que en lugares como América del norte y Europa estarían entre el 5% y 10%. (Khan, Ahmad, & Menhboob, 2015)

En el Ecuador gracias a la metodología de recolección de datos generada por el personal de los hospitales como enfermeras que llegan a ser el primer punto de referencia para identificar una infección, este personal podrá detectar el 75% de infecciones al contar con una enfermera por 200 camas, esto puede variar dependiendo del hospital, si la infección es más compleja puede ser del 65% y si es más riesgosa del 80%. (Wagner, Macías, Varas, & Quiroz, 2006)

Un punto clave para comprender el desarrollo de estas infecciones, así como para prevenir su propagación es entender la epidemiología y los patrones de

susceptibilidad a antibióticos que son característicos de una Infección nosocomial producida por bacterias Gram negativas.

2.2 Enterobacterias

El 90% de las infecciones nosocomiales son causadas por bacterias mientras que el 10% restante es causado por hongos, virus, y protozoos. Los principales patógenos son enterobacterias Gram negativas, entre las que se encuentran *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* de las cuales se destaca *E. coli*, por ser la de mayor predominancia. (Khan, Ahmad, & Menhboob, 2015).

2.2.1 Especie

Es una de las definiciones más usadas para poder medir un espacio de diversidad, se puede definir como un grupo de organismos que demuestran gran similitud entre ellos y que estas características sirven también para diferenciarse de otros grupos. (Roselló Mora, 1999)

2.2.2 Cepa

Se considera una cepa a una variante fenotípica de una especie, que representan una parte de un organismo mucho mayor, son una derivación taxonómica, es decir con celular que proviene de una misma especie que usualmente contiene alguna característica de interés.

2.2.3 Clon

Se define como clon a un organismo que es una copia exacta de otro organismo, desarrollado a base de una o varias células de un organismo considerado como

progenitor sin la intervención sexual. (Ponce de León Garcia, Barbosa Martínez, & Jimenez Sierra, 2008)

2.2.4 *Escherichia coli* (E. coli)

Escherichia coli, es una bacteria que fue aislada en 1885 por el pediatra Escherich, esta bacteria tomo primero el nombre de *Bacterium coli commune*, por ser un huésped del intestino, años más tarde en 1919 tomaría el nombre de *Escherichia coli*, esta es una bacteria Gram negativa, oxidasa negativa y anaerobia facultativa más abundante que posee un metabolismo fermentador de lactosa, glucosa y sacarosa, productora de indol a través del triptófano, no producen esporas, están desprovistas de oxidasa, producen catalasa y β -galactosidasa. (Faleiro Naves , 2009)

Existen algunos tipos de clones de *E.coli* los cuales tienen o han adquirido características de virulencia, por este motivo *E.coli* puede llegar a generar gran cantidad de enfermedades, los factores que le dan esta característica de virulencia, son elementos o factores genéticos que con el paso del tiempo y la condiciones fueron modificados creando combinaciones con factores de virulencia específicos para *E.coli*, siendo los responsables de generar enfermedades como: enfermedad entérica o diarreica, infecciones del tracto urinario (ITU) y sepsis o meningitis, siendo estas las más predominantes. (Kaper, Nataro, & Mobley, 2004)

Es uno de los mayores colonizadores, posee flagelos móviles y no móviles y una gran capacidad para generar resistencia antibiótica. Es característico de infecciones urinarias sin embargo está fuertemente relacionada con infecciones nosocomiales. (Aguilar Zapata, 2015)

Los organismos productores de beta-lactamasas de espectro extendido constituyen un gran desafío para las prácticas hospitalarias alrededor del mundo por su aumento en proporciones epidémicas. Las *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido han tenido una rápida propagación en varias partes del mundo generando gran preocupación tanto para el sistema de salud pública como para la población en general al ser causantes de infecciones del tracto urinario, septicemia, neumonía, meningitis, gastroenteritis y peritonitis varias de ellas llegan a tener un rango mortal. (Morgand, et al., 2014).

2.3 β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas son producidas por las bacterias como método de defensa frente a los antibióticos. Estas enzimas poseen la capacidad de anular la actividad de los antibióticos de la familia de los β -lactámicos al romper la estructura de su anillo β -lactámico. (Garcia Morejon, 2013).

Las enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido más conocidas como (BLEE) son las responsables de uno de los problemas más controversiales en la actualidad al tener resistencia a los β -lactámicos son los antibióticos comúnmente usados para el tratamiento de infecciones en hospitales. (Wollheim, et al., 2010)

La producción de β -lactamasas de espectro extendido producida por organismos Gram negativos presentes en los hospitales, ayudados por la gran presión selectiva a la que se encuentran sometidos por la exposición desmesurada a los antibióticos, ha incrementado considerablemente la manifestación de bacterias con multiresistencia antibiótica. Estas bacterias generan enzimas capaces de inactivar las funciones de las cefalosporinas de tercera generación (Figura 1) incrementando con ello la estadía hospitalaria, expansión de la infección y el riesgo de muerte. Es muy frecuente que las BLEE tengan relación con plásmidos

portadores de los genes que le confieren la resistencia a varios tipos de antibióticos, como aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, fluoroquinolonas, sulfametoxazol-trimetoprina y carbapenémicos (Sibhghatulla, et al., 2015)

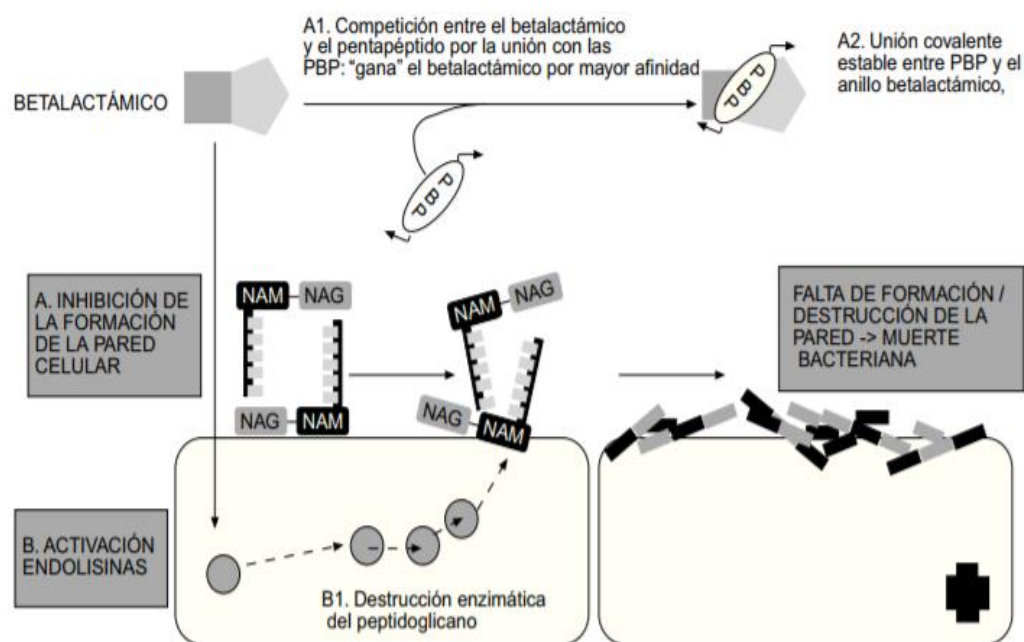


Figura 1 Mecanismo de acción de los betalactámico,
Tomado de (Suárez & Gudiol, 2009)

La aparición de las BLEE se produjo después de que las cefalosporinas de tercera generación aparecieran y ocasionaran una mutación en los genes bla_{TEM} y bla_{SHV} causando la resistencia a las familias de cefalosporinas, monobactámicos, carbapenímicos, penicilinas. (Wollheim, et al., 2010)

Un tipo de terapia antibiótica que suele ser usada en infecciones del tracto urinario son las fluoroquinolonas, pero su función se vio afectada por la

resistencia que las bacterias empezaron a presentar. Por ello se buscaron nuevas formas de tratar este tipo de infecciones llegando al uso de carbapenémicos, estos empezaron a ser usados cuando las infecciones eran más graves, pero nuevamente la resistencia provocada por las BLEE están limitando su uso. Esto ocasiona que la terapia antibiótica se vuelva cada vez más complicada agotando las opciones de tratamiento e incrementando el riesgo de muerte por causa de este tipo de infecciones (M M, et al., 2017).

2.4 Antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos, es la familia más grande de antibióticos, y por lo tanto la más utilizada en la terapia clínica, son antibióticos que poseen una buena distribución y baja toxicidad, su acción es lenta y dependiente del tiempo. (Suárez & Gudiol, 2009)

La acción de los β -lactámicos se efectúa cuando inhiben la última fase de la síntesis de la pared celular bacteriana, donde se produce la formación del peptidoglicano, es decir inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana lo que lleva a que se produzca una autólisis. Los β -lactámicos, inhibe la unión o transpeptidación de la síntesis peptidoglucano, que está formado de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. Es por este motivo que la pared se vuelve débil y tiende a romperse debido a la presión osmótica intracelular causada. (Marín & Gudiol, 2003)

El amplio espectro de estos antibióticos es debido a la agregación y modificación de nuevas moléculas generando mayor acción frente a microorganismos gramnegativos, la presencia del anillo β -lactámico, es una de las características que ayuda a su identificación, otro punto importantes es la unión que debe existir a otros radicales para que este se encuentre activo, por lo que la unión de varias cadenas lineales sumado a la estructura formada por los dos anillos, el β -

lactámicos junto con un radical crean diferentes grupos de este antibiótico. La familia de β -lactámicos, tiene cinco componentes: Penicilinas, Cefalosporinas, Monobactámicos, Carbapenémicos e Inhibidores de β -lactámicas, como se puede observar en la figura 2, su clasificación y su estructura. (Suárez & Gudiol, 2009)

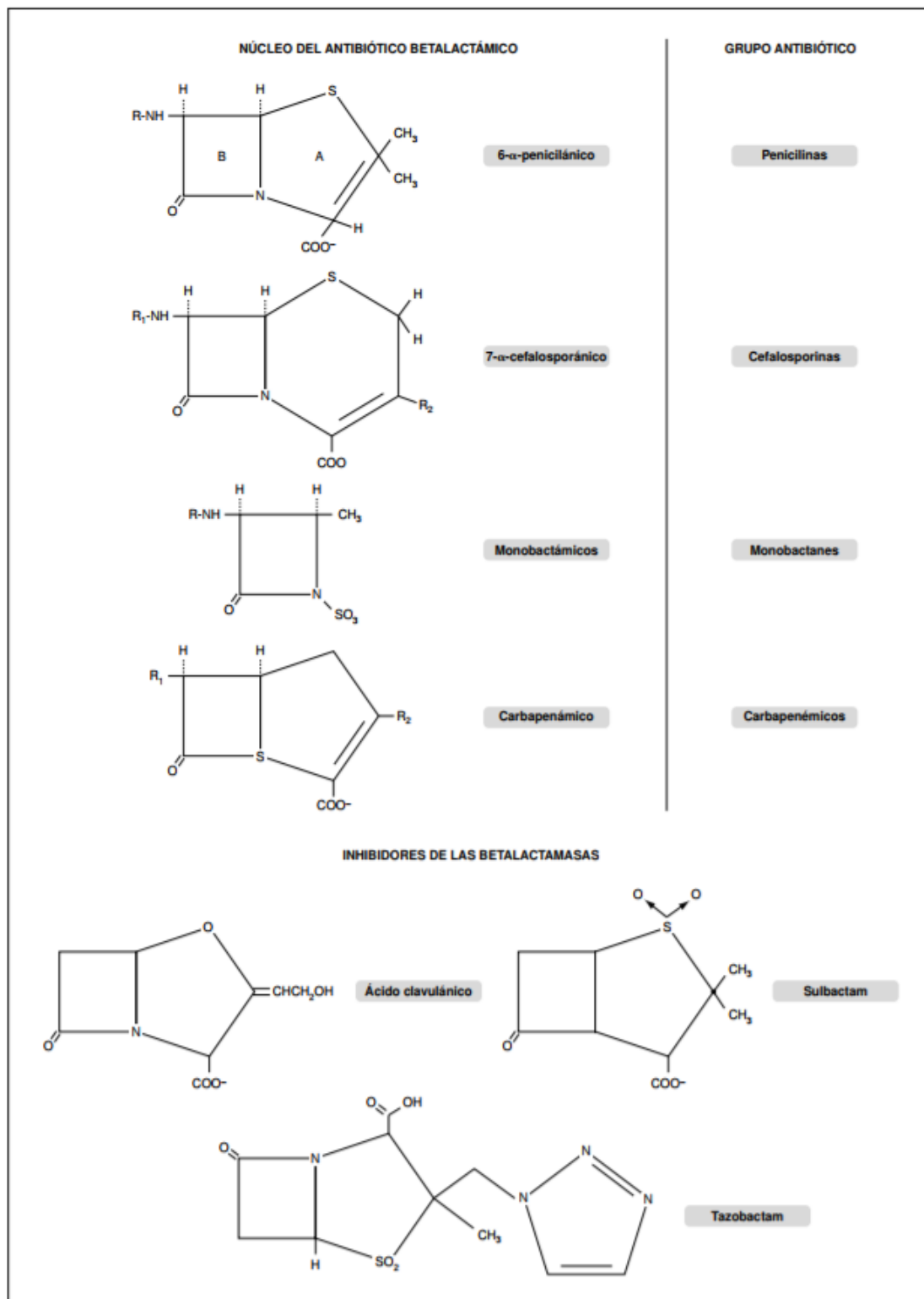


Figura 2 Estructura de los β -lactámicos

Tomado de (Marín & Gudíol, 2003)

2.4.1 Penicilinas

Descubiertas por Alexander Fleming en 1928, uno de los descubrimientos más importantes del siglo XXI, fueron unos de los primeros antibióticos usados para reducir la mortalidad causada por enfermedades infecciosas, este antibiótico proviene del hongo *Penicillium Notatum*. (Lozano Valdez, et al., 1998)

Estos antibióticos poseen un anillo β -lactámico junto a tiozolidina, que es una estructura formada del ácido 6 aminopenicilánico, esta formación se une a una cadena lateral variable, dicha característica ha logrado generar productos análogos a la benzilpenicilina, gracias a esta característica se ha logrado la formación de varias moléculas, consiguiendo obtener varias actividades antibacterianas. (Camacho Assef, 2005)

Las penicilinas tienen una amplia clasificación:

Penicilinas Naturales (Primera Generación)

Penicilinas Antiestafilococcicas (Segunda Generación)

Aminopenicilinas (Tercera Generación)

Penicilinas Antipseudomónicas

Andinopenicilinas

2.4.2 Cefalosporinas

Las cefalosporinas es la familia de antibióticos más usada en el tratamiento de infecciones complicadas al ser antibióticos de características β -lactámicas bactericidas. El mecanismo de acción de estos antibióticos se basa en intervenir en la síntesis del peptidoglicano proveniente de la pared celular de la bacteria,

por medio de la unión del PBP, que es una proteína que fija la penicilina, y la inactivación de inhibidores de autolisina la cual rompiendo las paredes celulares de la bacteria le genera la muerte. Las cefalosporinas pertenecientes a la tercera generación tienen la característica de que al fijar las proteínas a la membrana bacteriana producen una inactivación de las enzimas que están implicadas en la síntesis de la pared celular (Moscol Davalos, 1998)

Las cefalosporinas β -lactámicos provienen del producto de las fermentaciones del hongo *Cephalosporium acremonium*, son antibióticos de amplio espectro y su actividad puede variar dependiendo de los microorganismos Gram negativos. Su aparición en la línea terapéutica causó que sean divididos en tres generaciones. Tienen muy baja toxicidad por lo cual es una de las familias de antibióticos más usadas para diferentes tratamientos clínicos. Su acción consta de tres pasos claves: penetración por los poros de la pared celular, aceptación de las enzimas β -lactámicas, y poseer afinidad por los receptores. (Arango, et al., 1985)

2.4.3 Monobactámicos

Esta clase de antibióticos se derivan de *Chromobacterium violaceum*, es monocíclico y tiene una acción muy similar a los aminoglucosidos, estos antibióticos actúan sobre la síntesis de la pared bacteriana, el monobactámico más usado es el Aztreonam. (Riviero Arias, Herrera Torres, Larrondo Muguercia, Lozano Valdés, & León Pérez, 1998)

El Aztreonam tiene la característica de no ser degradado por metalo β -lactamasa, sin embargo este monobactámico presenta en ocasiones, una alergenicidad mínima cuando está usado en conjunto con otros betalactámicos, con la excepción de la Ceftazidima.

2.4.4 Carbapenémicos,

Estos antibióticos son provienen del *Streptomyces catleya*, que es derivado de la tienamicina, los antibióticos pertenecientes a esta clasificación son: Imipenem, Dotipenem, Ertapenem, Meropenem. La acción de estos antibióticos se basa en la unión de las proteínas responsables del ensamblaje de la membrana de péptidoglicano de la pared celular bacteriana, ejerciendo un efecto sobre la membrana externa bacteriana atravesándola por medio de porinas que son inespecíficas como las outer membrane protein u OMPs. (Moreno, 2013)

Además, los carbapenémicos poseen gran estabilidad a causa de la hidrolisis por β -lactamasa, de origen plasmídico o cromosómico, debido a que contienen una cadena de transhidroxietilo ubicado en la posición 6 del anillo de la estructura del β -lactámico, logrando una fácil penetración por medio de la membrana externas de las bacterias gramnegativas. Los carbapenémicos tienen afinidad por las PBP o Penicilin Binding Protein, las cuales son las enzimas responsables del ensamblaje de la pared de pepetidoglicano. (Gobernado & Acuña, 2007)

2.4.5 Inhibidores de las β -lactamasas

El ácido clavulanico fue el primer inhibidor de β -lactamasas usado, derivado del *Streptomyces clavuligerus*, en su estructura consta con un anillo β -lactámico característico, posee una actividad intrínseca antimicrobiana muy baja. El ácido clavulanico tiene un enlace covalente al sitio activo del residuo de serina, convirtiéndolo en un inhibidor suicida, esta inhibición ayuda a restablecer la acción antibacteriana frente bacterias resistentes a β -lactámicas productoras de betalactamasa plasmidica y en algunos cromosómica. (Gómez, 2015)

2.5 Genes Housekeeping

Los genes Housekeeping o constitutivos, se encuentran presentes sin importar las condiciones del medio, son genes que son requeridos por las células para mantener las funciones basales, algunos se pueden expresar a niveles constantes, otras varían de acuerdo a las condiciones. (Jaureguy, et al., 2008)

Cada uno de los genes de las regiones conservadas como se puede observar en la tabla 1, cumple una función específica, pero uno de los más importantes que contiene el factor determinante es pabB.

Tabla 1

Genes Housekeeping y función

Gen	Función
dinB:	ADN polimerasa
icdA:	Isocitrato deshidrogenasa
pabB:	Resistencia a la sulfonamida; p-aminobenzoato biosíntesis
polB:	Polimerasa PolII
putP:	Proline permease
trpA:	Subunidad A de triptófano sintasa
trpB:	Subunidad B de triptófano sintasa
uidA:	Beta-glucuronidasa

2.6 Multilocus Sequense Typing (MLST)

El efecto o acción de la multiresistencia genera interés en la investigación en especial cuando se ve involucrada en brotes en el área de la salud. Por este motivo se ve la necesidad de proceder con un análisis molecular y epidemiológico de los microorganismos. El interés en este análisis se destaca ya que permite conocer los genes de resistencia presentes en las bacterias y determinar si dicha bacteria es un clon con multiresistencia. (Woodford, Turton, & Livermore, 2011).

La técnica de Multilocus Sequense Typing (MLST) fue propuesta en el año de 1998 como una alternativa para suministrar datos que fueran precisos en investigaciones de epidemiología de bacterias de carácter patógeno. Los elementos necesarios para poner en práctica esta técnica fueron, los loci genéticos de interés para caracterizar, los cebadores para la amplificación y la secuenciación. La secuencia de los fragmentos con el uso de cebadores proporciona los datos suficientes con buena calidad y elimina la probabilidad de secuencias con datos falsos. La gran sensibilidad proporcionada logra que establecer las Secuencias Tipo (ST) (Maiden, Urwin, & C.J., 2003)

Utiliza secuencias cortas conservadas de varios genes housekeeping o genes conservados los cuales tuvieron algún cambio evolutivo llegando a un polimorfismo. Esta es una técnica discriminatoria ya que tiene la capacidad de detectar sustituciones de nucleótidos. Todos los datos recolectados de este procedimiento son fácilmente comparables con bases de datos informáticas. (Adiri, Gophna, & Ron, 2003).

Uno de los factores predominantes de esta técnica es el reconocimiento de bacterias que no portan una estructura clonal, por lo tanto los patrones de intercambio génico y de descendencia pueden analizarse a partir de sus

secuencias de nucleótidos que poseen una múltiple ubicación en el cromosoma. El análisis y la determinación de los nucleótidos y sus secuencias permiten que se generen datos concretos para los locus que se encuentran en el cromosoma aislado (Ana Belen, Pavón, & Maiden, 2014)

3.CAPÍTULO III: DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

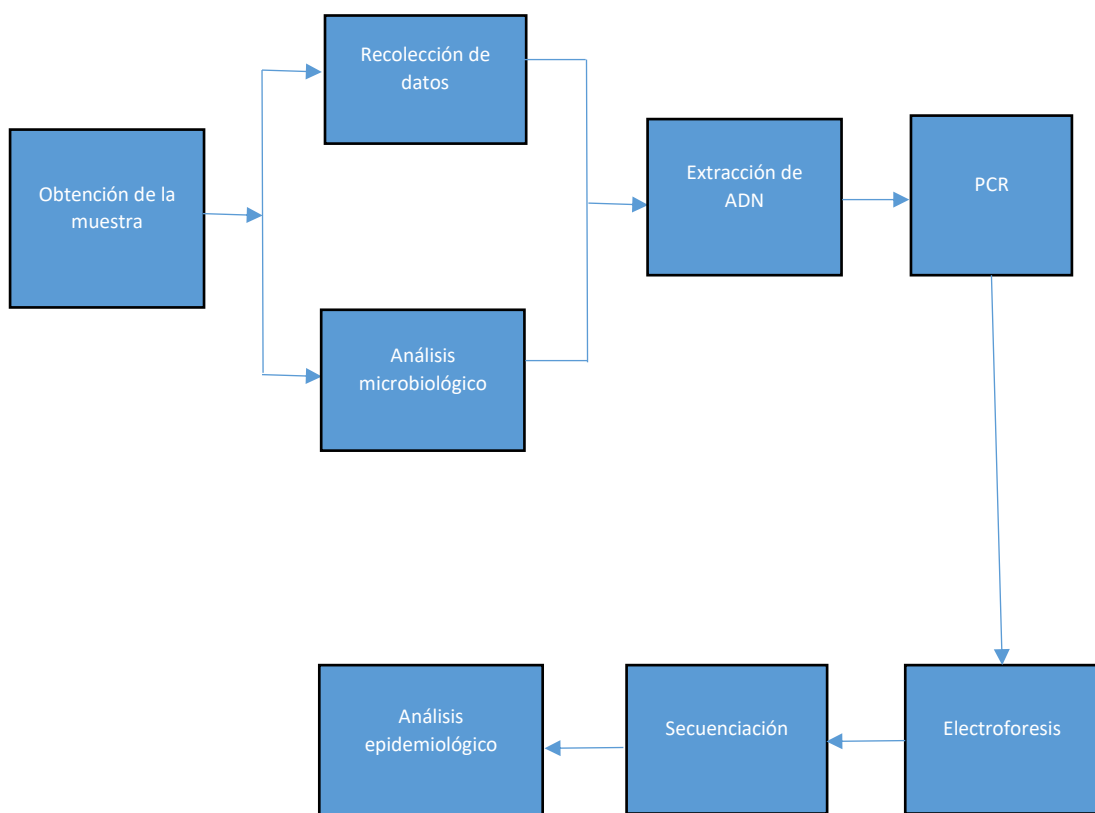


Figura 3. Diagrama de proceso del plan experimental para la ejecución de la investigación

4.CAPÍTULO IV: PROCEDIMIENTOS

Este estudio se realizó tanto en los laboratorios de microbiología del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1 (HFFAA No. 1) como en los laboratorios de la Universidad de las Américas.

4.1 Población y muestra

4.1.1 Población

Fueron todos los pacientes diagnosticados con una infección nosocomial por *E. coli* durante su estadía en el Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1 (HFFAA No. 1) en el transcurso de un año desde Mayo 2015 a Mayo 2016.

4.1.2 Muestras

Se tomaron 52 muestras obtenidas de pacientes diagnosticados con infección nosocomial por *E. coli*. El muestreo de pacientes se realizó directamente con los aislados bacterianos obtenidos del Servicio de Microbiología del HFFAA No. 1 y no de cada paciente por lo que no fue requerido un consentimiento informado al ser simplemente un análisis complementario del cultivo bacteriano (ANEXO 1)

4.2 Materiales y métodos para la obtención de datos

4.2.1 Obtención de las muestras

Las 52 muestras se obtuvieron del Servicio de Microbiología del HFFAA No. 1 las cuales fueron recolectadas de los 11 servicios de atención con los que cuenta el hospital como son Emergencia, UCI, Traumatología, Nefrología, Ginecología, Pediatría, Cirugía, Oncología, Neurología, Neumología, Quemados.

4.2.1.1 Tipos de muestras

Las muestras fueron clasificadas de acuerdo con su origen:

Tabla 2

Tipo y cantidad de muestras recolectadas

Muestra	Cantidad
Orina	28
Aspirado Traqueal	8
Espujo	2
Sangre	2
Otros	
Semen	3
Tejido bando pie	2
Tejido pared abdominal	3
Liquido peritoneal	1
Liquido encefaloraquideo	2
Ulcera	1

4.2.1.2 Identificación

Se utilizaron los métodos de identificación descriptiva: análisis bioquímicos, antibiogramas e identificación de BLEE. Además de métodos de epidemiología analítica para establecer los indicadores básicos de la situación de la infección causada por *E. coli* y posibles factores de riesgo que influyen dicha situación. Todos estos datos fueron propiciados por el personal del laboratorio de microbiología de la casa de salud. Las pruebas realizadas fueron:

- **Análisis bioquímico**
 - TSI (triple sugar iron)
 - LIA (Lysine iron agar)
 - MIO (Movilidad indol ornitina)
 - Citrato
 - Urea

- **Susceptibilidad a antibióticos**

El ensayo de susceptibilidad antibiótica empleada para poder determinar la resistencia o sensibilidad de determinado antibiótico es realizado mediante el método de Kirby-Bauer, bajo los parámetros plateados por CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

- Imipenem
- Ceftriaxona
- Gentamicina
- Ciprofloxacino
- Sulfametoxazol
- Cefotaxima
- Amikacina
- Ampicilina/Sulbactam
- Cefepima

El motivo por el cual se usaron estos antibióticos es debido a interacción de los mismos, lo que ayuda a la determinación de la presencia de bacterias productoras de BLEE

4.2.1.3 Formularios

Se usó formularios que recojan los datos necesarios para establecer un sistema de vigilancia. Se consideró datos claves como la fecha de ingreso, servicio, desarrollo de la infección, entre otros, para lo cual se revisó la disponibilidad de datos existente en historias clínicas o en los registros de la institución. (ANEXO 2 y 3)

Además, se establecieron procesos estandarizados de recopilación de datos utilizando definiciones universales en la clasificación de patologías y organismos.

4.2.2 Métodos Moleculares

Todos los microorganismos que presentaron un fenotipo similar para *E. coli* fueron sometidos a genotipificación para la identificación de su clonalidad. Los procedimientos que se usaron fueron los siguientes.

Una vez que fueron obtenidas las muestras por parte del laboratorio de microbiología del HFFAA N°1, estas fueron llevadas a los laboratorios de la UDLA, en criotubos con un medio líquido BHI y glicerina. Se guardaron a -80°C para su posterior cultivo.

4.2.3 Descongelamiento y siembra

Los criotubos usados fueron 104 en total, e descongelados a temperatura ambiente de 10 a 15 minutos. Al finalizar este tiempo se procedió a la toma de una pequeña cantidad con un asa de siembra estéril, la cual fue sembrada de forma estriada en una caja Petri con medio Mc Conkey. Se incubaron las cajas sembradas a 35°C por 24 horas.

4.2.4 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN mediante el método de Beat Beating se usó el FastDNA Spin Kit y un equipo de Precellys de 24 tubos compuestos de partículas de sílice de diferente tamaño. El procedimiento para la extracción se encuentra detallado en el ANEXO 4.

4.2.5 Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN se realizó con el equipo Biotek—Synergy HT en el cual se colocó 2 µl de reactivo DES (DNase/ Pyrogen-Free Water) y 1 µl de

muestra. Se obtuvieron diferentes concentraciones siendo la más adecuada a partir de 50 ng/μl.

4.2.6 Procedimiento para Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizaron ocho primers de los genes conservados que cuantifican para: *dinB*, *icdA*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB*, *uidA* cuyas secuencias fueron obtenidas del Instituto Pasteur y se encuentran detalladas en el Anexo 5.

4.2.6.1 Hidratación de primers

Los primers liofilizados de Invitrogen fueron hidratados agregando agua grado molecular según lo indicado por la casa comercial.

Para la obtención de la alícuota de trabajo se colocó 10 μl de la solución madre de primers en 90 μl de agua estéril grado molecular y se almacenó a -20°C.

4.2.6.2 Parámetros para PCR

Los reactivos y las concentraciones utilizadas en la PCR se detallan en la tabla 4, mientras que las condiciones empleadas en el termociclador Eppendorf se encuentran en la tabla 3 y 4.

Tabla 3

Reactivos, concentraciones

Reactivos	Concentración
Agua	1 μ l
Muestra	0,5 μ l
Primers	0,5 μ l
Taq Super Mix	22,5 μ l

Tabla 4

Pasos de los parámetros para la elaboración de PCR

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 min	
Desnaturalización	94°C	30 seg	35
Hibridación	50°C	1 min	
Extensión	72°C	30 seg	
Extensión final	72°C	5 min	

4.2.7 Electroforesis

Se preparó geles de agarosa al 1% en una solución de TBE 1X. Se colocó 0,04 μ l de SYBR Safe. En el primer pocillo se colocó 2 μ l de Blue Juice™ Gel Loading Buffer (10X). En los siguientes pocillos cargó 8 μ l de cada producto de la PCR. Los geles se corrieron durante 45 minutos a 85 V y 400 Ah. Los geles se visualizaron en un transiluminador UV.

4.2.8 Secuenciamiento

El Secuenciamiento de los genes de *E. coli* se efectuó mediante secuenciadores capilares de tipo Sanger y el análisis bioinformático se ejecutó mediante programas de alineamiento múltiple en el programa Phyloviz, en el cual se tomaron los datos generados por el INPUT y OUTPUT, de las ST encontradas, para así obtener la filogenia.

4.3 Evaluación estadística de los resultados

Las ST encontradas por medio del análisis de secuencias realizado anteriormente y datos de las historias clínicas de los pacientes fueron evaluadas mediante el uso del programa SPSS versión 23, los cuales fueron comparados con los datos obtenidos en los estudios epidemiológicos. Se valoraron la relación entre edad, sexo, muestra, servicio en el que se encontraba el paciente, procedimiento quirúrgico y terapia antibiótica.

Las pruebas estadísticas realizadas en el programa SPSS 23, fueron ANOVA, Tablas cruzadas, análisis de frecuencia.

5.CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Análisis de las características epidemiológicas del brote de infecciones nosocomiales.

5.1.1 Servicios Hospitalarios

En este estudio mediante los análisis estadísticos realizados, como el análisis de frecuencia se puede observar que el servicio de Emergencia fue el más afectado al contar con mayor incidencia de infecciones nosocomiales como se puede ver en el gráfico 2. En comparación con varios estudios realizados en los cuales el servicio con mayor incidencia de infecciones nosocomiales es la Unidad de

Cuidados Intensivos (UCI) debido al uso frecuente de equipos como respiradores mecánicos, y ventiladores. El continuo uso de estos equipos puede hacer que las bacterias portadoras de la resistencia se alojen en ellos. Además del uso constante de productos de limpieza hace que las bacterias se vuelvan inmunes a estos productos, especialmente a los usados en los procesos de y desinfección. (Custovic, et al., 2014). El hecho de que la UCI, sea una de los más comunes para el desarrollo de estas infecciones en muchos casos ha desviado la atención de otros servicios los cuales también pueden presentar riesgos.

Que el servicio de Emergencia tenga mayor cantidad de pacientes con infecciones nosocomiales pudo deberse por la gran rotación de pacientes que existe en este servicio, si bien en UCI algunos pacientes se encuentran bajo condiciones críticas, el servicio de emergencia recibe un sin número de pacientes al día. Además, las aplicaciones de los procesos de estabilización son realizados el por el mismo personal a casi todos los pacientes en un corto tiempo ya que la atención en este servicio debe ser los más rápida posible. Estas condiciones hacen que este servicio tenga las características óptimas para que las bacterias productoras de infecciones nosocomiales puedan desarrollarse.

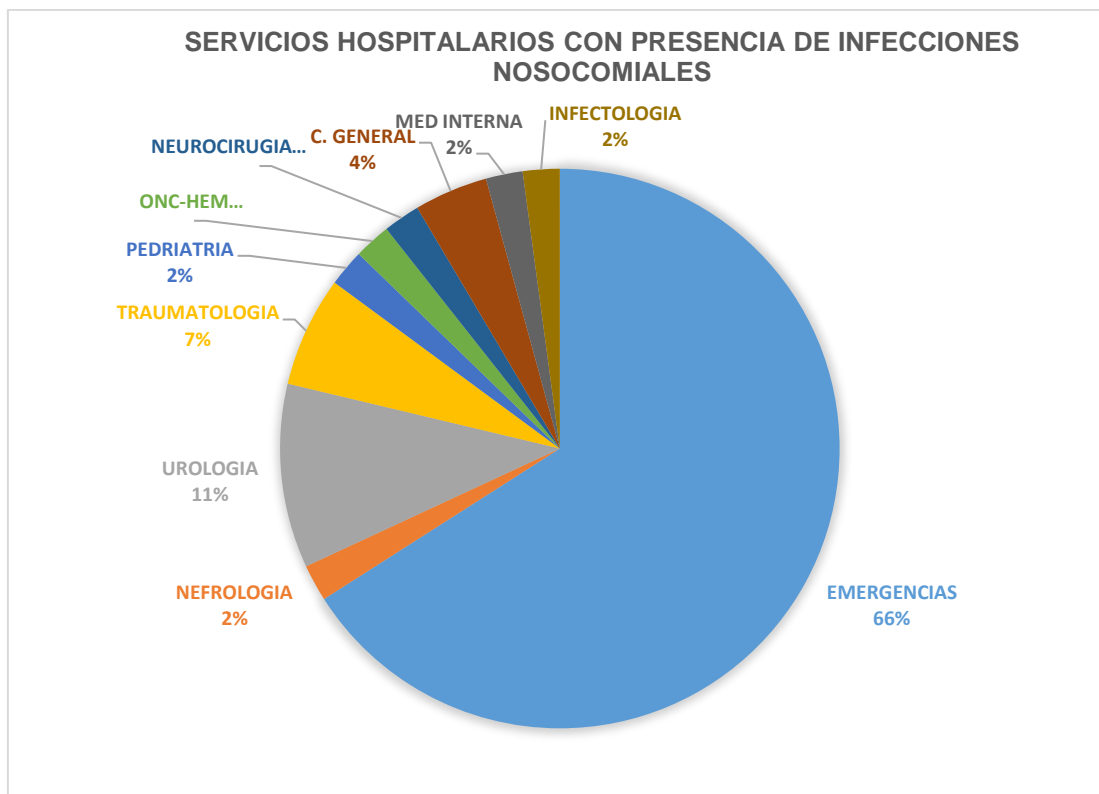


Figura 4 Pastel comparativo entre sitios con mayor incidencia de infecciones nosocomiales

5.1.2 Tipo de muestra

De las 52 muestras analizadas, la mayor cantidad (28) provenían de orina lo cual indica que las infecciones del tracto o urinario eran las predominantes (Figura 5). Esto pudo ser influenciado por las técnicas invasivas a la que los pacientes fueron sometidos, muy posiblemente cateterismo urinario, lo que incrementa la probabilidad de infecciones nosocomiales. Estos resultados concuerdan con los reportados por Gugliott, quién determinó que el 80% de las enfermedades nosocomiales afectan al tracto urinario. Un aproximado de 500000 personas que son afectadas por esta infección y un gran porcentaje de estos pacientes fueron intervenidos con técnicas invasivas como cateterismo, afectando a su calidad de vida ya que se prolonga su estancia en el hospital. (Gugliott R. , 1982).

Factores como la prolongación del tiempo en el hospital y el uso de técnicas o procedimientos invasivos son puntos claves que aumentan el riesgo de los pacientes. A todo paciente que fue sometido a un proceso invasivo se le debe dar seguimiento para determinar o encontrar el foco de la infección y así prevenir que esta infección se siga propagando.

Cerca del 40% de las infecciones adquiridas en los hospitales son del tracto urinario. Algunas de las técnicas que pueden influenciar para el desarrollo de estas infecciones como son el cateterismo y manipulaciones urológicas así también las estancias prolongadas. Todos estos factores provocan que la resistencia antibiótica sea cada vez más frecuente y con mayor número de casos incrementando la tasa de mortalidad de los pacientes. (Kalsi, Arya, Wilson, & Mundy, 2008)

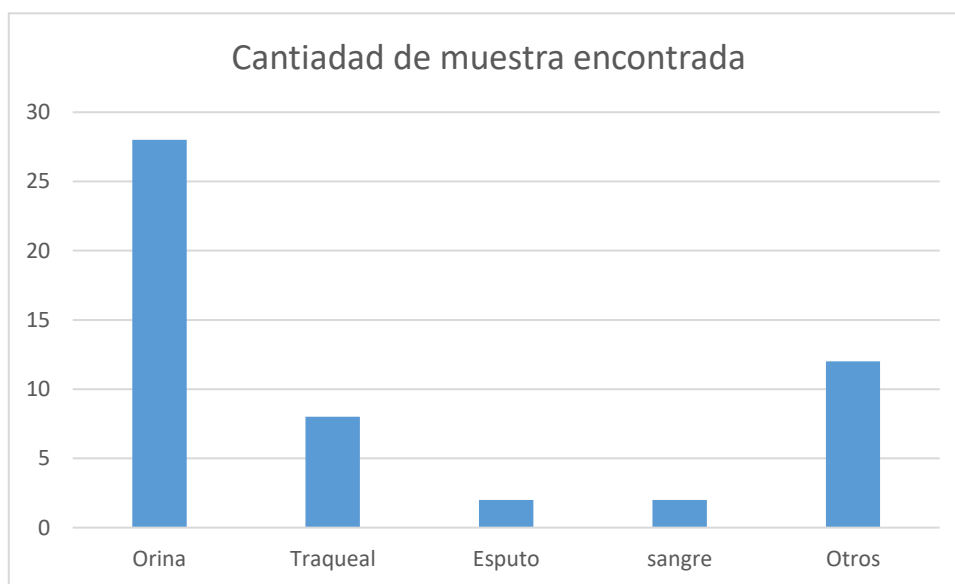


Figura 5 Cantidad de tipo de muestras recolectadas

5.1.3 Edad

Las edades de los pacientes reportados con infecciones nosocomiales que se encontraron en el estudio fueron muy variables, iban desde los 4 años hasta los

94, se tomó como media los 72 años. En el caso de las mujeres se encontraron en un rango desde los 63 años, el cual fue muy similar al presentado por los hombres que fue de 65 años. Las mujeres presentaron mayor probabilidad de contraer una infección nosocomial que afecta al tracto urinario siendo más susceptibles las mujeres de edad adulta. Por otro lado, los hombres en edad adulta presentaron complicaciones respiratorias relacionadas con estas infecciones. Concordando con lo que dice (Pigrau, 2013), las mujeres poseen una probabilidad más alta de contraer infecciones nosocomiales del tracto urinario que los hombres, incluso si ambos fueron sometidos a cateterismo.

El resultado obtenido por la ANOVA (Tabla 6) entre sexo y edad del paciente, da como resultado que no existen diferencias significativas. Sin embargo, existe una relación bastante fuerte entre el sexo del paciente y el tipo de muestra debido a que estas infecciones del tracto urinario, si bien son más comunes en mujeres, los hombres también son muy susceptibles a contraerla.

Tabla 6

ANOVA entre sexo del paciente y edad

Sexo paciente					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10,035	34	,295	2,125	,082
Within Groups	1,667	12	,139		
Total	11,702	46			

Las infecciones urinarias pueden ir desde infecciones simples a infecciones graves con potencial de sepsis. Uno de los medicamentos que más se usa para tratar estas infecciones a nivel mundial como lo indica Fernando W.A. son los carbapenémicos, para los cuales la resistencia antibiótica cada vez llega a ser más evidente complicando su tratamiento. A esto se le suma los procedimientos a los cuales los pacientes son sometidos. Los datos reflejados en este estudio

muestran que las personas en un rango de edad mayor a 60 años son más propensas a contraer este tipo de infecciones. (M M, et al., 2017)

Las infecciones nosocomiales seas más frecuentes en personas de edad avanzada de un claro patrón sobre estos pacientes que por lo general presentan un sistema inmune en muchas ocasiones débil, y al momento de ser sometidos a procedimientos invasivos llegan a ser más propensos a contraer este tipo de infecciones.

5.2 Determinación de un patrón de clonalidad en las infecciones nosocomiales

5.2.1 Genotipos encontrados

El genotipo que se encontró en 11 servicios del hospital fue el ST 43 como se puede observar en la figura 6. El nódulo predominante es el ST43 que a su vez muestra un brote policlonal, de los cuales 10 clones corresponden a ST691 y ST539. Sin embargo, muchos de estos clones son nuevos, es decir no fueron encontrados en la base del Instituto Pasteur fue la fuente de referencia en la cual se basó la investigación. En las figuras 7 y 8, se puede observar la relación entre ST presentes en los servicios hospitalarios en común.

El ST43 en América no se encuentra reportado. Los países con reportes de este tipo de ST son Bélgica, China, República Checa, Alemania, India, Japón, Corea del Sur, Pakistán, España, Suiza, Túnez y el Reino Unido. El ST43 se encuentra reportado como un clon del ST131 que es uno de los más comunes en cuanto a *E.coli*. (Nicolas Chanoine, Bertrand, & Madec, 2014)

A partir de esta se encontraron 10 clones los cuales corresponden a ST691 reportada en Canadá (Croteau, et al., 2015) y ST539 reportada en China, (Xie, et al., 2017) los demás clones son nuevos por lo que no se hallan reportados

en la base de datos del Instituto Pasteur, que fue la fuente de referencia en la cual la investigación fue basada.

Siguiendo con el mapa de la filogenia, el segundo ST más encontrado fue el ST2 que se encontró en 4 servicios del hospital (UCI, Traumatología, Neumología y Emergencia). Los clones de esta ST son ST39 reportada en Israel (Goren, Venezia, Chmelnitsky, & Carmeli, 2010), ST191 reportada en China (Xu, Fan, Wang, & Lu, 2017), ST478 reportada en Australia (Peirano, Lascols, Hackel, Hoban, & Pitout, 2013)

El último nódulo de interés que contiene 3 nuevas ST, es ST24 el cual se encuentra registrada geográficamente en las ciudades de Tianjin, Hubei, Henan, Hebei, Jiangsu, Shandong. (Meng, et al., 2013). A pesar de que las ST encontradas a lo largo de este estudio no han sido reportadas en América Latina, las infecciones nosocomiales a partir del año 2005 tuvieron un incremento considerable. De estas el 32% corresponde a *E. coli* (Guzmán Blanco, Labarca, Villegas, & Gotuzzo, 2014)

Es muy probable que algunas ST encontradas no se hallen reportadas en América Latina, por falta de investigación en esta área, y es más común encontrar reportes en países del continente asiático, es muy clara la falta de investigación en esta área en el país, es por ello que se debería poner mayor interés, ya que esto ayudaría a una mejor identificación además de mejorar considerablemente las condiciones de los pacientes ingresados, y un mejor uso de los recursos asignados a los hospitales.

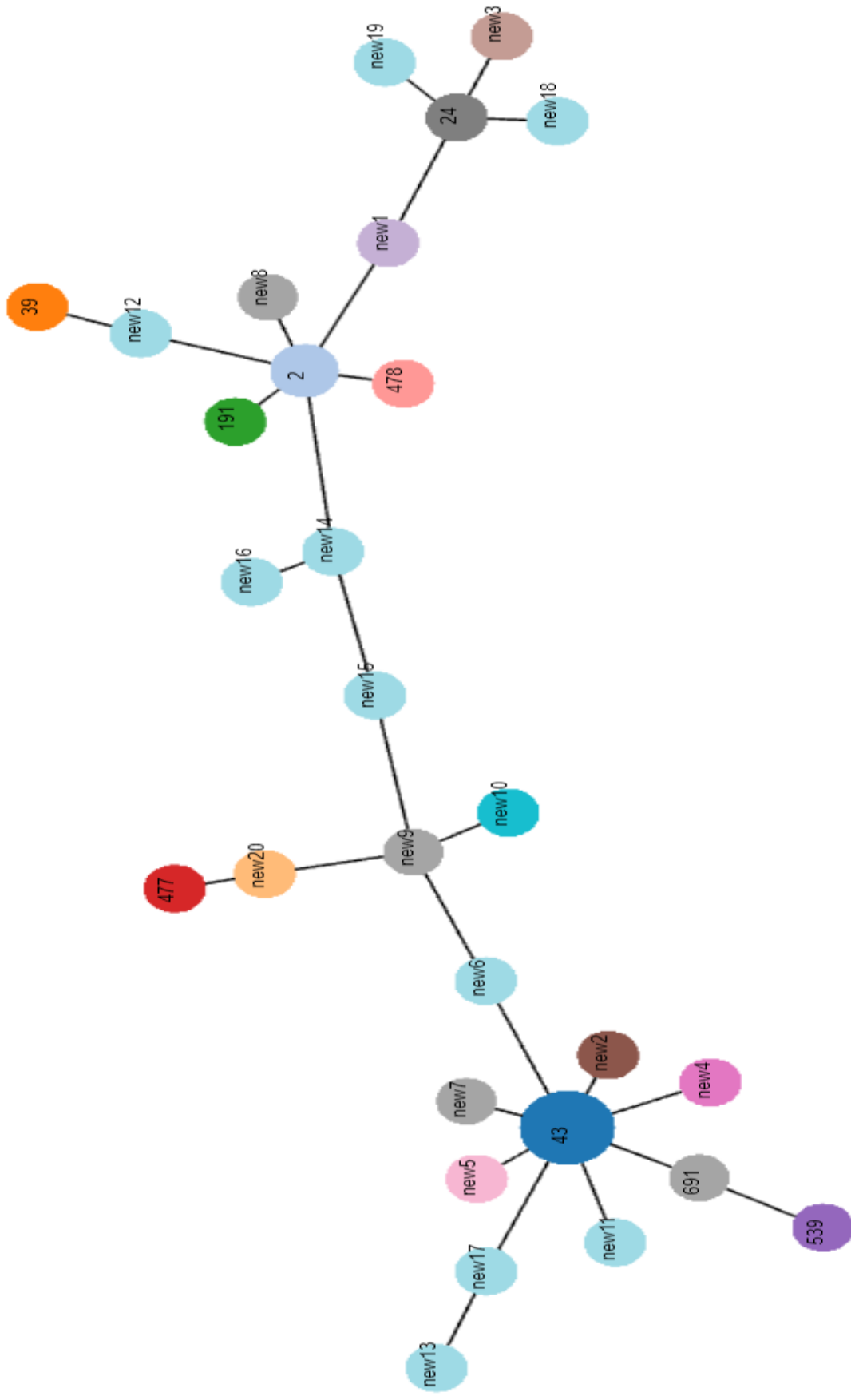


Figura 6: Mapa filogenético de brotes nosocomiales encontrados mediante el uso del programa Phyloziz, en el que se puede observar los nodos principales generadores de brotes de infecciones nosocomiales los cuales fueron ST43, ST2 y ST 24

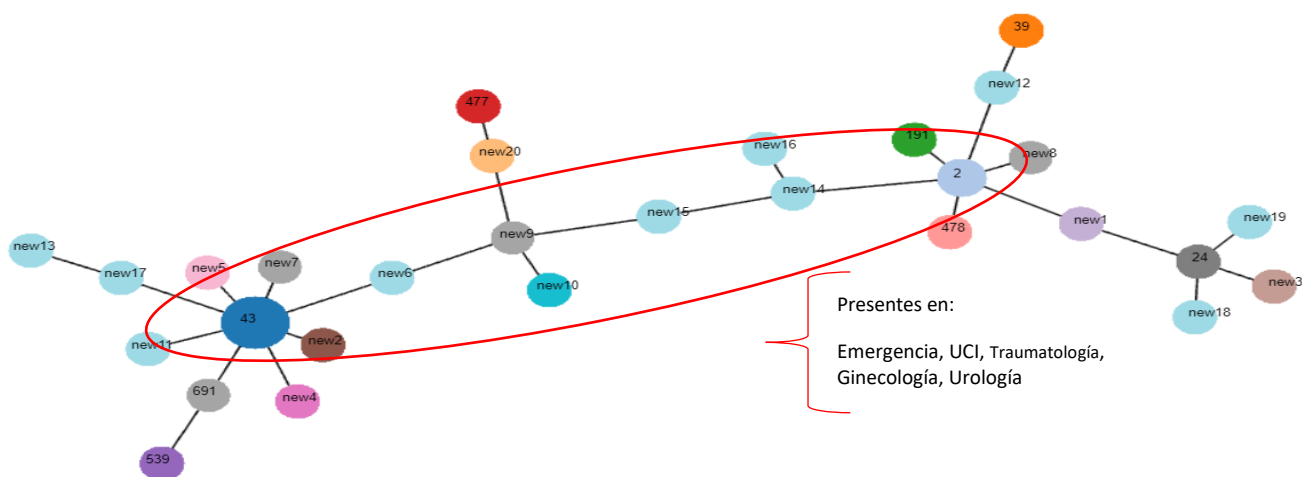


Figura 7 Mapa filogenético de ST 43 Y ST2 relacionadas con los servicios hospitalarios en común

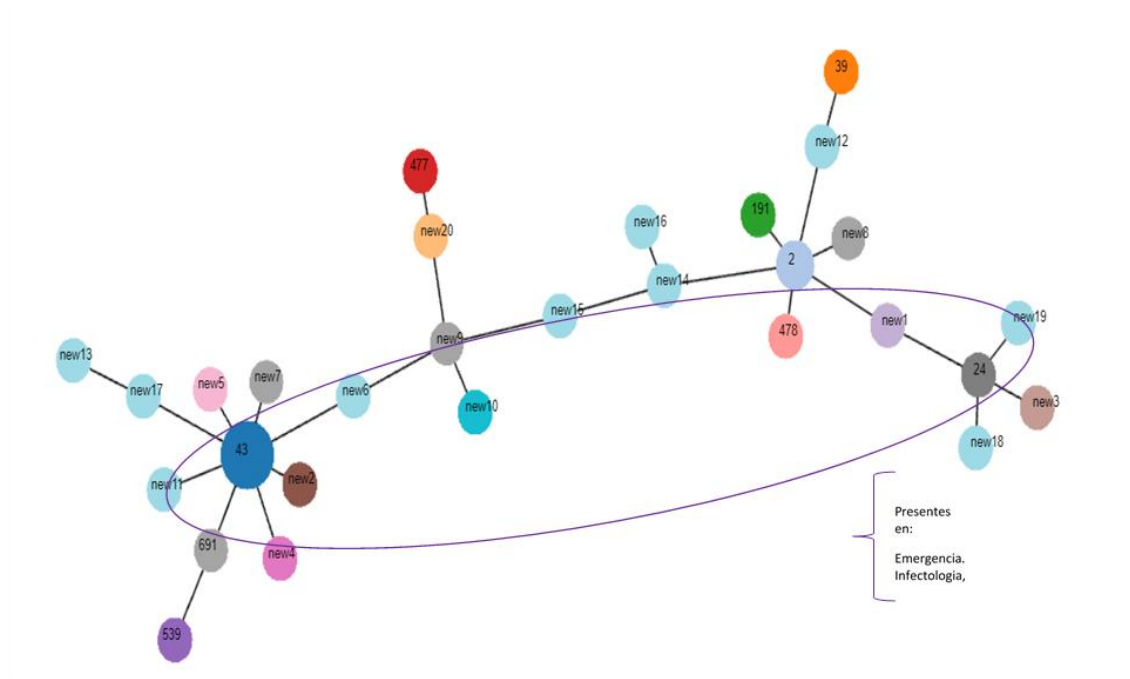


Figura 8 Mapa filogenético de ST43 Y ST24 relacionadas con los servicios hospitalarios en común

5.2.2 Identificación de genes

Al basarse el MLST en una secuenciación de los fragmento que se encuentran en genes con regiones conservadas, los cuales codifican a las proteínas que realizan ciertas funciones básicas y por medio de estas mantienen la viabilidad celular, causando que su tasa de mutación se baja, generando que sean indicadores estables (De las Rivas, Marcobal, & Muñoz, 2007) lo que permite que sea una técnica muy específica, siendo este el motivo que llevo uso de la misma en esta investigación, ya que gracias a esta alta especificidad permite que no se presentan errores siendo uno de las técnicas más confiables y por lo tanto más eficientes.

No se usaron medios de control negativo debido a la especificidad de las primers como de la técnica usada que fue el MLST, gracias a que permite mediante fragmentos internos de genes conservados, definir la estructura genética de los brotes bacterianos, es mucho más viable junto con los datos obtenidos permiten generar relaciones filogenéticas (Jaureguy, et al., 2008)

Con el gel de electroforesis se determinó las cepas que fueron positivas para BLEE. En todas las muestras se encontraron los genes: *dinB* (450 bp), *icdA* (516 bp), *pabB* (468 bp), *polB* (450 bp), *putP* (456 bp), *trpA* (561 bp), *trpB* (594 bp) and *uidA* (600 bp), como se observa en la figura 8. Todas las muestras coinciden con el número de pares de bases establecido para cada gen estos datos fueron obtenidos de la base de datos del Instituto Pasteur.

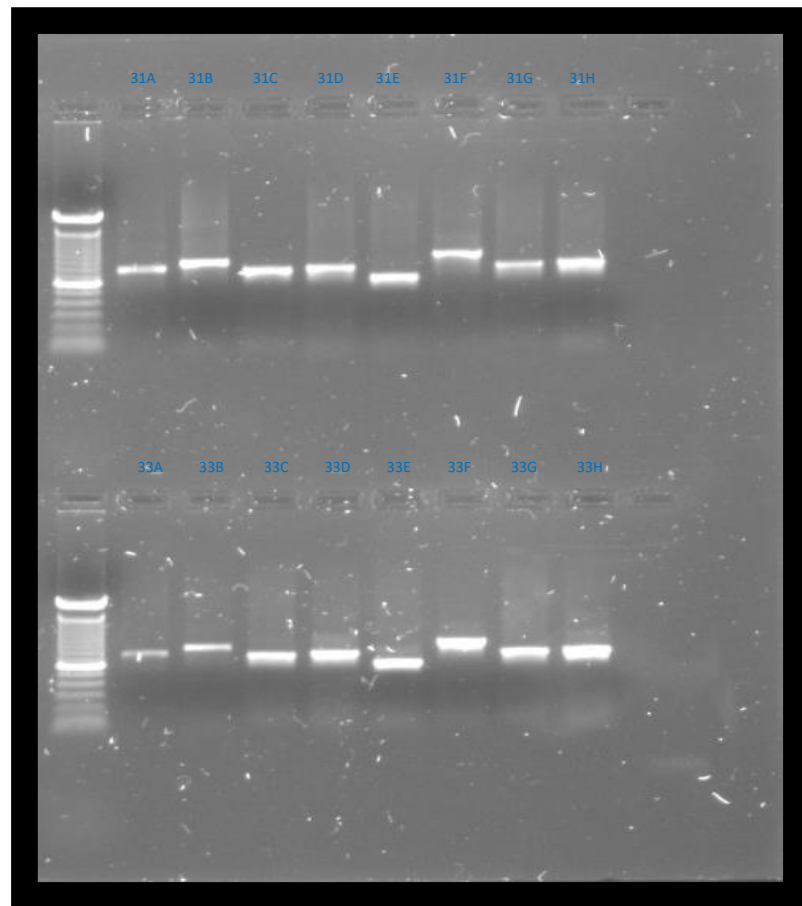


Figura 8: Electroforesis 8 genes de 4 muestras, los genes analizados se encuentran representados por letras

- a) A: *dinB*,
- b) B: *icdA*,
- c) C: *pab*,
- d) D: *polB*,
- e) E: *putP*,
- f) F: *trpA*,
- g) G: *trpB*,
- h) H: *uidA*

5.3 Relación entre resistencia o sensibilidad al antibiótico y sexo del paciente.

Por medio del uso de tablas cruzadas (tabla 7) se determinó la relación entre el sexo del paciente y su resistencia o sensibilidad a los antibióticos usados en el hospital como fueron Ampicilina, Piperaciclina, Cefepima, Imipenem, Gnetamicina, Ciprofloxacino, Trimetoprima. En los hombres se encontró mayor sensibilidad a la Piperaciclina y mayor resistencia la Trimetoprima. En cuanto a las mujeres presentaron mayor resistencia a la Ceftriaxona, y mayor sensibilidad al Imipenem.

Los antibióticos usados para los antibiogramas realizados son basados en una clasificación establecida por el CLSI, en el cual se establece que se debe realizar el antibiograma con los antibióticos pertenecientes a los grupos A y C. En el grupo A se encuentran las penicilinas que son consideradas como una prueba de rutina primaria para resultados de organismos específicos. En el grupo C, incluyen los antibióticos para pruebas de microorganismo inusuales, resistentes o la ayuda y control de infecciones graves, en este grupo están presentes los antibióticos β -lactámicos (CLSI, 2015)

Las BLEE pueden llegar a ser muy variables generando grados de resistencia diferentes, debido a que la hidrolisis causada por un antibiótico varía de acuerdo a las cepas, lo que causa que el efecto no sea tan fácil de detectar de forma fenotípica y solo sea evidente en la reducción de halos de inhibición. Si estos permanecen dentro de los rangos de sensibilidad provocan que en un comienzo estas cepas sean reportadas como sensibles a la terapia con cefalosporinas, pero después de un fracaso en el tratamiento se deben realizar más pruebas que confirmen que se trata de cepas productoras de BLEE. (Moscol Davalos, 1998)

Tabla 7

Comparación entre antibiótico, sexo y resistencia o sensibilidad

Resistencia			Sensibilidad		
Antibiótico	Femenino	Masculino	Antibiótico	Femenino	Masculino
Numero muestras	15	17	N	0	2
Ampicilina	46,9%	53,1%	Ampicilina	0,0%	100,0%
Numero muestras	4	4	N	11	14
Piperaciclina	50,0%	50,0%	Piperaciclina	44,0%	56,0%
Numero muestras	15	18	N	1	0
Cefepima	45,5%	54,5%	Cefepima	100,0%	0,0%
Numero muestras	17	18	N	0	1
Ceftriaxona	48,6%	51,4%	Ceftriaxona	47,2%	52,8%
Numero muestras	1	2	N	15	18
Imipenem	33,3%	66,7%	Imipenem	44,4%	55,6%
Numero muestras	11	15	N	7	6
Gnetamicina	42,3%	57,7%	Gnetamicina	46,2%	53,8%
Numero muestras	15	16	N	2	5
Ciprofloxacino	48,4%	51,6%	Ciprofloxacino	28,6%	71,4%
Numero muestras	12	20	N	5	2
Trimetoprima	37,5%	62,5%	Trimetoprima	71,4%	28,6%

5.4 Determinar si los clones predominantes en los brotes epidémicos se mantienen durante el tiempo o son variables.

Mediante la figura 8 se pudo determinar que el mes con mayor presencia de infecciones nosocomiales fue en febrero. Un aspecto común en las infecciones nosocomiales es que los brotes son más recurrentes en época de verano, debido a que el personal médico suele rotar para cubrir puesto, pero en este estudio los brotes son más frecuentes en el segundo mes del año empezando la época fría. Como lo explica (Zuñiga & Lozano, 2014) los brotes epidémicos se encuentran localizados en áreas del hospital de forma específica, pero el establecimiento de su ocurrencia llega a ser complicado por las medidas sé que hayan tomado dentro de cada área frente a un acontecimiento o suceso, además de las características del patógeno, sensibilidad antibiótica y medidas de control.

Sin embargo, desde el mes de enero se observa que los brotes comienzan a tener un crecimiento importante al igual que en el mes de julio. En los meses de agosto y octubre los brotes tienden a mantener un casi una misma tendencia, y estos disminuyen en los meses de septiembre por el retorno de las vacaciones de verano y en diciembre por las festividades de este mes lo que guardaría relación en la disminución de brotes en diciembre y su incremento en los primeros meses del año. Según (Ducel, Fabry, & Nicolle, 2003) los brotes epidémicos se encuentran relacionados a estancias de control, en varios casos la cantidad de brotes encontrados el número de casos puede llegar a ser algo limitado, siendo reflejado en la estadística. Y esto puede influir de alguna forma en el que la identificación y manejo del brote no se determine de forma apropiada.

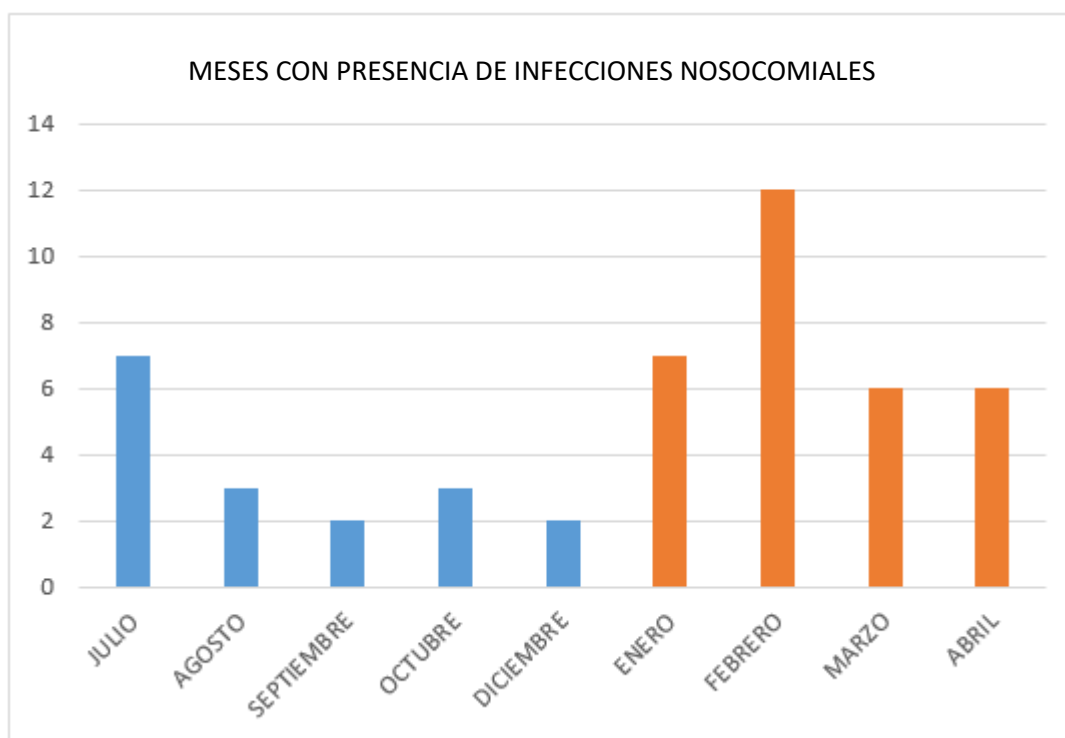


Figura 8 Comparación de meses con la incidencia de brotes

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Los datos proporcionados por las historias clínicas de los pacientes dieron como deducción que las infecciones nosocomiales más frecuentes son producidas por infección del tracto urinario en mujeres de edad adulta (≤ 72 años), mientras que en hombres en edad adulta (≤ 72 años) se encontró infecciones relacionadas con las vías respiratorias.

Mediante la técnica de MSLT se observó el comportamiento del brote a lo largo del estudio obteniéndose un brote policlonal, causado por clones derivados de ST43, ST2, ST24 y a partir de estos se derivaron otros clones. El tener un brote de características policlonales hace que sea más difícil encontrar la fuente ocasionando que la epidemia se propague de una forma más rápida. Además, la poca información sobre las cepas dificulta aplicar un tratamiento exitoso. Las cepas encontradas no están reportadas en América, la mayoría provienen de países asiáticos y algunas de países europeos, aun así, la información que se puede encontrar de estas es muy poca.

Los brotes encontrados en el hospital tuvieron un comportamiento variable ya que estos se reducen e incrementan en épocas diferentes, sin embargo, estos no desaparecieron en el transcurso del tiempo a pesar de que cada cierto tiempo el hospital realiza desinfecciones de las áreas solo disminuyeron

La afluencia y cambio del personal por los diferentes servicios del hospital, así como el de los pacientes contribuye a la propagación de las epidemias. Es muy característico que los brotes seas más frecuentes cuando el personal médico rota por los servicios.

El MLST permite la detección de cambios a nivel del ADN. Además, es muy precisa lo que no solo facilita la identificación, sino que elimina los falsos positivos. En las técnicas de detección de BLEE tradicional algunas bacterias pueden presentar una falsa sensibilidad a un antibiótico provocando una mala administración de la terapia antibiótica.

6.2 Recomendaciones

Es recomendable tener un número de muestras mucho mayor para obtener mejores resultados.

Es importante coordinar los tiempos en los que el hospital realiza las esterilizaciones de las áreas para realizar el muestreo.

Es aconsejable realizar un Secuenciamiento de las ST nuevas y reportar su aparición.

Se debería realizar un estudio similar en otro hospital público y en uno privado para comparar los resultados con el fin de determinar si el presupuesto es un factor determinante.

Dependiendo del servicio con más frecuencia de infecciones nosocomiales se podrían tomar muestras también de las mucosas o piel del personal médico, para así poder determinar si son portadores asintomáticos de estas bacterias.

Se podría comparar el tipo de antibióticos por casa comercial

REFERENCIAS

- Adiri, R., Gophna, U., & Ron, E. (2003). Multilocus sequence typing (MLST) of *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiology Letters*.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00295-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00295-7)
- Ageevets, V., Partina, I., Lisitsyna, E., Ilina, E., Lobzin, Y., Shlyapnikov, S., & Sidorenko, S. (2014). Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *International Journal of Antimicrobial Agents*.<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.05.004>
- Aguilar Zapata, D. (2015). *E. coli* BLEE, la enterobacteria. *Revista de Investigacion Medica sur de Mexico*. Recuperado el 14 de Noviembre del 2017 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2015/ms152b.pdf>
- Almanza, M. D. (2010). Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. Recuperado el 14 de Octubre del 2017 de <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v9n4/rhcm11410.pdf>
- Amer Custovic, J. S. (2014). Epidemiological Surveillance of Bacterial Nosocomial Infections in the Surgical Intensive Care Unit. *AVICENA*.<https://doi.org/10.5455/msm.2014.26.7-11>
- Ana Belen, Pavón, I., & Maiden, M. (2014). Multilocus Sequence Typing. *Europe PMC Funders Group*.https://doi.org/10.1007/978-1-60327-999-4_11
- Arango, C., Villamarin, N., Gallardo, L., De Alviz, A., De Ramos, M., & De Mejia, L. (1985). TRES GENERACIONES DE CEFALOSPORINAS ESTRUCTURA, FARMACOLOGIA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA. *BIOMEDICA*. Recuperado el 7 de Octubre del 2017 de <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/viewFile/1899/1925>
- Breathnach, A. S. (2013). Nosocomial infections and infection control. *MEDICINE*. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2013.08.010>
- Camacho Assef, V. (24 de enero de 2005). Los Antimicrobianos en la Practica Medica. Recuperado el 20 de Noviembre del 2017 de <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/urgencia/antibioticos.pdf>
- Christoph Jans, T. d.-M. (2016). Phylogenetic, epidemiological and functional analyses of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex through an overarching MLST scheme. *BMC Microbiology*.
<https://doi.org/10.1186/s12866-016-0735-2>
- Claudia Wollheim, I. M. (2010). Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum b-lactamase (ESBIA)-producing *Escherichia*

- coli and Klebsiella spp. in southern Brazil.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702011000200008>
- CLSI. (2015). Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA 19087 USA. Recuperado el 12 de Noviembre de
<http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2015-M100-S25-original.pdf>
- Croteau, M., Renner, V., Archibald, F., Langlois, V., Cahn, J., Ridal, J., . . . Lean, D. (2015). Investigation of Pathogenic Escherichiacoli and Microbial Pathogens in Pulp and Paper Mill Biosolids. Water Environment Research. <https://doi.org/10.2175/106143007X184140>
- Custovic, A., Smajlovic, J., Hadzic, S., Ahmetagic, S., Tihic, N., & Hadzagic, H. (2014). Epidemiological Surveillance of Bacterial Nosocomial Infections in the Surgical Intensive Care Unit. <https://doi.org/10.5455/msm.2014.26.7-11>
- David M. Gordon, O. C. (2008). Assigning Escherichia coli strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. Environmental Microbiology. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01669.x>.
- De las Rivas, B., Marcobal, A., & Muñoz, R. (2007). MLST (multilocus sequence typing): un método molecular para la caracterización inequívoca de cepas de Oenococcus oeni Y Lactobacillus plantarum. *Avances en Ciencias y Técnicas Enológicas*. Recuperado el 26 de Octubre del 2017 de <http://digital.csic.es/bitstream/10261/114275/1/MLST.pdf>
- Doaa Mohammed, O. S. (2014). Bacterial nosocomial infections in neonatal intensive care unit, Zagazig University Hospital, Egypt. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.epag.2014.10.001>
- Ducel, G., Fabry, J., & Nicolle, L. (2003). *Prevención de Infecciones Nosocomiales*. Malta: Minimum graphics. Recuperado el 6 de Noviembre del 2017 de http://www.who.int/csr/resources/publications/ES_WHO_CDS_CSR_EP_H_2002_12.pdf
- Faleiro Naves , P. (2009). Formación de biopelículas por Escherichia coli y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Recuperado el 12 de Diciembre del 2017 de <http://eprints.ucm.es/9780/>
- Françoise Jauregui, L. L. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic Escherichia coli strains. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-560>

- Garcia M, M., Aragón V, J., & Rosero P, M. (2003). COSTO DE TRES TIPOS DE INFECCIÓN NOSOCOMIAL EN UN HOSPITAL MILITAR DE QUITO, ECUADOR. *Costo de la infección nosocomial en nueve países de latino america*. Recuperado el 14 de Diciembre del 2017 de <http://www.revistaapi.com/wp-content/uploads/2014/03/mat-092.pdf>
- Garcia Morejon, M. (2013). Extended spectrum Beta-lactamase (ESBL). *Revista Cubana de Medicina*. Recuperado el 20 de Diciembre del 2017 de <http://scielo.sld.cu/pdf/med/v52n4/med06413.pdf>
- Gobernado, M., & Acuña, C. (2007). Ertapenem. *Sociedad Española de Quimioterapia*. Recuperado el 12 de Octubre del 2017 de <http://seq.es/revista-de-la-seq/2007/septiembre-2007/>
- Gómez, J. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. Recuperado el 18 de Octubre del 2017 de <http://seq.es/seq/0214-3429/28/1/gomez.pdf>
- Goren, M., Venezia, S., Chmelnitsky, I., & Carmeli, Y. (2010). Carbapenem-Resistant KPC-2-Producing Escherichia coli in a Tel Aviv Medical Center, 2005 to 2008. *American Society of Microbiology* <http://doi.org/10.1128/AAC.01359-09>
- Guzmán Blanco, M., Labarca, J., Villegas, M., & Gotuzzo, E. (2014). Extended spectrum -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.10.005>
- Hassan Ahmed Khan, A. A. (2015). Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.001>
- Jans, C., de Wounters, T., Bonfoh, B., Lacroix, C., Wambua, D., Kaindi, M., . . . Meile, L. (2016). Phylogenetic, epidemiological and functional analyses of the Streptococcus bovis/Streptococcus equinus complex through an overarching MLST scheme. *BMC Microbiology*. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0735-2>
- Jaureguy, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., . . . Brisse, S. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic Escherichia coli strains. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-560>
- Kalsi, J., Arya, M., Wilson, P., & Mundy, A. (2008). Hospital-acquired urinary tract infection. *MEDLINE*. Recuperado el 20 de Octubre del 2017 de <http://europepmc.org/abstract/med/12846343>
- Kaper, J., Nataro, J., & Mobley, H. (2004). PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI. *NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

- Khan, H., Ahmad, A., & Menhboob, R. (2015). Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.
<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.001>
- Lei Tan, J. L. (2017). In Situ Disinfection through Photoinspired Radical Oxygen Species Storage and Thermal-Triggered Release from Black Phosphorous with Strengthened Chemical Stability. *small-journal*.
<https://doi.org/10.1002/sml.201703197>
- Lozano Valdez, D., Larrando Muguercia, H., Herrera Torres, M., Rivero Arias, E., Zamora Marín, R., & Araújo Praderes, L. (1998). Penicilinas. *Acta Médica*. Recuperado el 3 de Diciembre del 2017 de
http://www.bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act04198.pdf
- M. M. P. S. C. Fernando, W. A. (2017). Extended spectrum beta lactamase producing organisms causing urinary tract infections in Sri Lanka and their antibiotic susceptibility pattern –A hospital based cross sectional study. *BMC Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2250->
- Maiden, Urwin, R., & C.J., M. (2003). Multi-locus sequence typing:a tool for global epidemiology. *CellPress*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.08.006>
- Manuel Guzmán-Blanco a, J. A. (2014). Extended spectrum -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *he Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.10.005>
- Marcelo García M., J. A. (2003). COSTO DE TRES TIPOS DE INFECCIÓN NOSOCOMIAL EN UN HOSPITAL MILITAR DE QUITO, ECUADOR. *Costo de la infección nosocomial en nueve países de latino america*. Recuperado el 12 de Octubre del 2017 de
<http://www.revistaapi.com/wp-content/uploads/2014/03/mat-092.pdf>
- Marco, J. V. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* . <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.05.001>
- Marie-Hélène Nicolas-Chanoine, X. B.-Y. (2014). Escherichia coli ST131, an Intriguing Clonal Group. *CMR, Journals.ASM.org*.
<https://doi.org:10.1128/CMR.00125-13>
- Marín, M., & Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(03\)72873-0](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(03)72873-0)
- Marjolaine Morgand, S. V.-R. (2014). Extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli infections in children: Are community-acquired

- strains different from nosocomial strains. *International Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.06.003>
- Mejia, E. (2009). PRESENCIA DE INFECCIONES NOSOCOMIALES Y USO DE ANTIBIÓTICOS EN LOS PACIENTES INTERNADOS EN EL HOSPITAL BINACIONAL DE LA CIUDAD DE MACARÁ DE LA PROVINCIA DE LOJA DURANTE EL PERIODO SEPTIEMBRE-2005 A SEPTIEMBRE-2008. Recuperado el 23 de Noviembre del 2017 de <http://riuc.bc.uc.edu.ve/handle/123456789/4858>
- Meng, Q., Xiong, Y., Lan, R., Ye, C., Wang, T., Qi, T., . . . Xu, J. (2013). SNP genotyping of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates from China and genomic identity of the 1999 Xuzhou outbreak. *Infection, Genetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.02.018>
- Moreno, K. (2013). Carbapenémicos: Tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*. Recuperado el 15 de Octubre del 2017 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2013/rmc134i.pdf>
- Morgand, M., Vimonta, S., Bleibtreu, A., Boyde, A., Vu Thien, H., Zaharf, J.-R., . . . Arlet, G. (2014). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* infections in children: Are community-acquired strains different from nosocomial strains. *International Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.06.003>
- Moscol Davalos, M. (1998). Cefalosporinas de tercera generación. *Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*. Recuperado el 12 de Noviembre del 2017 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X12001735>
- Neil Woodford, J. F. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *Microbiology Services - Colindale, Health Protection Agency*, . <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>
- Nicolas Chanoine, M., Bertrand, X., & Madec, J. (2014). *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *CMR, Journals.ASM.org*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>
- Olaechea, P., Insausti, J., Banco, A., & Luque, P. (2009). Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales. *Medicina Intensiva*.
- Onkar A. Naik, R. S. (2017). Characterization of multiple antibiotic resistance of culturable microorganisms and metagenomic analysis of total microbial diversity of marine fish sold in retail shops in Mumbai, India. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0945-7>

- Peirano, G., Lascols, C., Hackel, M., Hoban, D., & Pitout, J. (2013). Molecular epidemiology of Enterobacteriaceae that produce VIMs and IMPs from the SMART surveillance program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.024>
- Pigrau, C. (2013). Infecciones del tracto urinario nosocomiales. *Microbiología Clínica*. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.015>
- Ponce de León Garcia, L., Barbosa Martínez, C., & Jimenez Sierra, C. (2008). Clones, copias exactas o réplicas únicas. Recuperado el 10 de Diciembre del 2017 de <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n67ne/clones.pdf>
- Qiong Meng, Y. X. (2013). SNP genotyping of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 isolates from China and genomic identity of the 1999 Xuzhou outbreak. *Infection, Genetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.02.018>
- Riviero Arias, E., Herrera Torres, M., Larrondo Muguercia, H., Lozano Valdés, D., & León Pérez, D. (1998). Carbapenémicos y monobactámicos. *Acta Médica*. Recuperado el 20 de Noviembre del 2017 de http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act04198.pdf
- Roni S. Adiri, U. G. (2003). Multilocus sequence typing (MLST) of Escherichia coli O78 strains. *FEMS Microbiology Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00295-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00295-7)
- Roselló Mora, R. (1999). Sobre el concepto de especie en Microbiología. *Actualidad SEM*. Recuperado el 16 de Octubre del 2017 de https://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM27_18.pdf
- Sibhghatulla Shaikh, J. F. (2015). Risk factors for acquisition of extended spectrum beta lactamase producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in North-Indian hospitals. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.05.006>
- Sligl, W., Dragan, T., & Smith, S. (2015). Nosocomial Gram-negative bacteremia in intensive care: epidemiology, antimicrobial susceptibilities, and outcomes. *International Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.06.024>
- Suárez, C., & Gudíol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Tan, L., Li, J., Liu, X., Cui, Z., Wai Kwok Yeung, K., Pan, H., . . . Wu, S. (2017). In Situ Disinfection through Photoinspired Radical Oxygen Species Storage and Thermal-Triggered Release from Black Phosphorous with

- Strengthened Chemical Stability. *small-journal*.
<https://doi.org/10.1002/sml.201703197>
- Wagner, G., Macías, I., Varas, A., & Quiroz, D. (2006). *Ministerio de Salud Pública del Ecuador*. Normas de Prevención y Control de las Infecciones Nosocomiales: Recuperado el 16 de Noviembre del 2017 de <https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/manual%20de%20normas%20de%20infecciones%20nosocomiales.pdf>
- Wendy Irene Sligl, T. D. (2015). Nosocomial Gram-negative bacteremia in intensive care: epidemiology, antimicrobial susceptibilities, and outcomes. *International Journal of Infectious Diseases*.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.06.024>
- Wen-juan Liang, H.-y. L.-C.-x.-y.-Y.-L. (2017). Emergence and mechanism of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Henan, China, 2014. *Journal of Infection and Public Health*. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.09.020>
- Wollheim, C., F Guerra, I., Conte, V., Hoffman, S., Schreiner, F., Delamere, A., . . . P da Costa, S. (2010). Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum β -lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in southern Brazil.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702011000200008>
- Woodford, N., Turton, J., & Livermore, D. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *Microbiology Services - Colindale, Health Protection Agency*
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>,
- Xie, Z., Dong, Z., Zhu, P., Zhang, L., Chen, X., & Dong, C. (2017). Antibiotic Susceptibility and Molecular Characterization of *Escherichia coli* O157 Isolates from Urinary Tract Infections. *Urologia Internationalis*.
<https://doi.org/10.1056/NEJM200006293422601>
- Xu, M., Fan, Y., Wang, M., & Lu, X. (2017). Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamases-Producing *Escherichia coli*.
<https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2016.023>
- Yacila Lomas, J. (s.f.). Carbapenémicos y Mono bactericidas. Recuperado el 23 de Noviembre del 2017 de
http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act09198.pdf
- Zuñiga, I., & Lozano, J. (2014). Brotes nosocomiales: Detección y control oportuno por el personal de salud. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. Recuperado el 13 de Diciembre del 2017 de
<http://www.medigraphic.com/pdfs/revenfinfped/eip-2014/eip141c.pdf>

ANEXOS

Anexo 1 Cultivos Bacterianos



Anexo 2 Base inicial pacientes

MUESTRAS NOSOCOMIALES BLEE						
CODIGO	FECHA	LABORATORIO	HC	MUESTRA	PISO	BACTERIA
HM001	17/6/2015	683	47806	TRAQUEAL		E.COLI BLEE
HM002	5/6/2015	272-2	25627	ORINA		E.COLI BLEE
HM003	15/7/2015	665	43846	SANGRE		E.COLI BLEE
HM004	16/7/2015	720	2131	SANGRE		E.COLI BLEE
HM005	25/8/2015	1090	29703	ORINA		E.COLI BLEE
HM006	28/8/2015	1262	289565	SEMEN		E.COLI BLEE
HM007	22/7/2015	825	33712	TRAQUEAL	UCI	E.COLI BLEE
HM008	25/7/2015	1079	82621	UD	NEUROLOGIA	E.COLI BLEE
HM009	4/8/2015	165	286580	ORINA	UCI	E.COLI BLEE
HM010	4/8/2015	127		ORINA	INFECTOLOGIA	E.COLI BLEE
HM011	4/8/2015	124	313826	ORINA	UROLOGIA	E.COLI BLEE
HM012	25/7/2015	1079	82621	UD	NEUROLOGIA	E.COLI BLEE
HM013		327	313826	ORINA	UCI	E.COLI BLEE
HM014	8/7/2015	320-321	313826	SA	UROLOGIA	E.COLI BLEE
HM015	8/7/2015	164	286580	TRAQUEAL	EMERGENCIA	E.COLI BLEE
HM016	5/9/2015	199	312339	CAV. ABD	SUR	E.COLI BLEE
HM017	2/9/2015	93	12522	ESPUTO	PISO 8	E.COLI BLEE
HM018	23/9/2015	934	92495	ESPUTO	INFECTOLOGIA	E.COLI BLEE
HM019	10/10/2015	405	7234	ORINA	INFECTOLOGIA	E.COLI BLEE
HM020	14/10/2015	524	497675	TEJIDO BLANDO PIE	TRAUMATOLOGIA	E.COLI BLEE
HM021	14/10/2015	561	432149	CUL. SEC. PURULENTO PIE	QUIROFANO	E.COLI BLEE
HM022	14/10/2015	549	251701	ORINA	CIRUGIA GENERAL	E.COLI BLEE

HM023	5/1/2016	216	4458 11	ORINA	EMERGENCIA/PEDRI ATRIA	E.COLI BLEE
HM024	5/2/2016	218	3738 24	ORINA	NEFROLOGIA	E.COLI BLEE
HM025	5/2/2016	219	1422 9	ORINA	GINECOLOGIA	E.COLI BLEE
HM026	5/2/2016	222	1437 09	ORINA	UROLOGIA	E.COLI BLEE
HM027	5/2/2016	246	1820 21	ORINA	NEFROLOGIA	E.COLI BLEE
HM028	5/2/2016	248	2062	ORINA	EMERGENCIA	E.COLI BLEE
HM029	24/11/20 15	1000	1533 43	SE	PISO 5	E.COLI BLEE
HM030	13/1/201 6	618	1190 21	TRAQUEAL	UCI	E.COLI BLEE
HM031	13/1/201 6	591	4977 51	ESPUTO	PISO 4	E.COLI BLEE
HM032	13/1/201 6	592	1142 22	ESPUTO	EMERGENCIA	E.COLI BLEE
HM033	13/1/201 6	581	6683	ORINA	EMERGENCIA	E.COLI BLEE
HM034	20/1/201 6	903	4227 22	TRAQUEAL	NEUMOLOGIA	E.COLI BLEE
HM035	25/1/201 6	1129	2951 83	ORINA	EMERGENCIA	E.COLI BLEE
HM036	22/1/201 6	912	4114 15	LI	NEFROLOGIA	E.COLI BLEE
HM037	18/1/201 6	816-434	6056 4	CO	TRAUMATOLOGIA	E.COLI BLEE
HM038	21/1/201 6	815	4425 1	ORINA	PISO 7	E.COLI BLEE
HM039	21/1/201 6	840	4994 68	ORINA	PISO 7	E.COLI BLEE
HM040	17/1/201 6	754-077	2072 5	ORINA	PISO 10	E.COLI BLEE
HM041	14/1/201 6	634	1774 66	TEJIDO PAREDES ABDOMINAL	PISO 4	E.COLI BLEE
HM042	10/2/201 6	394	6230 2	ORINA		E.COLI BLEE
HM043	10/2/201 6	381	7594 9	ORINA	EMERGENCIA	E.COLI BLEE
HM044	3/2/2016	50	7737 8	HERIDA ADBOMINAL	UCI	E.COLI BLEE
HM045	27/7/201 5	1146	4955 76	ORINA	NEFROLOGIA	E.COLI BLEE
HM046	19/2/201 6	805	3858 8	ORINA		E.COLI BLEE
HM047	22/2/201 6	822	1979 20	ORINA	PISO 7	E.COLI BLEE
HM048	26/2/201 6	1033	636	ORINA	PISO 6	E.COLI BLEE

HM049	21/2/2016	852	35237	ORINA	PISO 8	E.COLI BLEE
HM050	19/2/2016	797	11083	IE		E.COLI BLEE
HM051	22/2/2016	877	499789	ORINA		E.COLI BLEE
HM052	22/2/2016	883	11083	UL		E.COLI BLEE
HM053	20/2/2016	822	197920	ORINA		E.COLI BLEE
HM054	17/2/2016	726	120676	TRAQUEAL	PISO 6	E.COLI BLEE
HM055	21/2/2016	855	971	TRAQUEAL		E.COLI BLEE
HM056	30/8/2015	1313	170264	ORINA	PISO 8	E.COLI BLEE

Anexo 3 Formulario

**SISTEMA DE REGISTRO DE ENFERMEDADES NOSOCOMIALES
CIT - UDLA**

ID PACIENTE #:	Diagnóstico de Ingreso al Hospital:	Ingresó por Emergencias:
	Diagnóstico de Infección Nosocomial	Sexo: M F
Fecha Admisión:	Edad:	Fecha Registro Datos:

Servicio donde se diagnosticó Infección Nosocomial:		
C. Cardiológica	Nefrología	Oft - Otorrino
C. General	Neonatología	Onc - Hem
Emergencias	Neumología	Pediatría
Endocrinología	Neurocirugía	Traumatología
Ginecología	Neurología	U. Quemados
Med Interna	Obstetricia	Urología
Otro:		
¿Estuvo en otro servicio en el HEE?		

ESTANCIA EN UCI	
FECHA INGRESO A UCI:	
DIAGNÓSTICO DE INGRESO:	
PRESENTA DIAG. INF. NOSOCOMIAL AL INGRESO:	SI NO

Infecciones y Factores de Riesgo		
Fecha de Diagnóstico de la Infección 1:		
Fecha de Diagnóstico de la Infección 2:		
Profilaxis Antibiótica:		
Infección de Vías Urinarias		Técnicas invasivas: Cateterismo Urinario Instrumentación vesical
Neumonía	Comunitaria	Tiempo uso ventilador
	Nosocomial Ventilatoria	
Bacteriemia	Sepsis	Vía Periférica Vía Central
Infección Herida Quirúrgica	SITIO	TIPO HERIDA

Solo en Caso de Cirugía	
Día de la Operación:	Duración: hrs. min.
Tipo de Herida:	
Tipo de Anestesia:	
Emergencia	SI NO
Endoscopia:	SI NO
ASA clasificación:	1 2 3 4 5
Trauma:	SI NO
Procedimientos Múltiples:	

Otra infección:	
FECHA ALTA	
MUERTE POR CAUSA DE INFECCIÓN NOSOCOMIAL	
MUERTE POR OTRA CAUSA	

Anexo 4 Concentraciones y reactivos utilizados para la extracción de ADN

Procedimiento	Reactivo	Cantidad
Colocar en tubo para lisis	Tampón de fosfato sódico	500 µl
Colocar en tubo para lisis	Buffer MT	122 µl
Elegir programa 1 (agitar por 1min, descansa 30 seg x 2)	Equipo Precellys	24 muestras
Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga limpio de 2.0 ml	Sobrenadante	
Mezclar agitando el tubo con la mano 10 veces	Sobrenadante	
Centrifugue a 14,000 xg durante 5 minutos	Sobrenadante	
Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 15 ml	Sobrenadante	
Agregar al sobrenadante en un tubo de 15 ml	Matriz de Unión	1 ml
Invertir a mano durante 2 minutos	Sobrenadante	
Esperar durante 3 minutos para permitir la sedimentación de la matriz de sílice	Sobrenadante	
Retirar y desechar de sobrenadante	Sobrenadante	500 µl
Resuspender la Matriz de Unión en la cantidad restante	Sobrenadante	
Transferir la mezcla a un filtro SPIN™	Sobrenadante	600 µl
Centrifugar a 14000 x g por 1 minuto	Sobrenadante	
Vaciar el tubo de captura y agregue la mezcla restante al filtro SPIN™ y centrifugar como antes.		
Agregar y resuspender suavemente el sedimento usando la fuerza del líquido de la punta de la pipeta.	SEWS-M preparado	500 µl
Centrifugar a 14000 x g por 1 minuto. Vacíe el tubo de captura y reemplácelo.		
Sin adicionar líquido, centrifugar por segunda vez a 14000 x g durante 2 minutos		
Resuspender suavemente la Matriz de Unión	DES(DNase/ Pyrogen-Free Water)	50 µl
Centrifugar a 14,000 xg durante 1 minuto para llevar el ADN eluido		50 µl

Anexo 5 Genes Housekeeping y sus secuencias

Gen	Secuencias FORWARD y REVERSE
<i>dinB</i>	dinB2oR: TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGTAGCCCCATCGCTTCCAG
<i>icdA</i>	icd2oF GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAATTCGCTTCCCGAACATTG
	icdoR: TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATGATCGCGTCACCAAAYTC
<i>pabB</i>	pabB2oF: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAATCCAATATGACCCGCGAG
	pabBoR: TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGTTCCAGTTCGTGCGATAAT
<i>polB</i>	polB2oF: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGGCGGCTATGTGATGGATTTC
	polBoR: TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGTTGGCATCAGAAAACGGC
<i>putB</i>	putP2oF: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTGTTTAACCCGTGGATTGC
	putPoR: TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGCATCGGCCTCGGCAAAGCG
<i>trpA</i>	trpAoF: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGCTACGAATCTCTGTTTGCC
	trpAoR: TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGCTTTCATCGGTTGTACAAA
<i>trpB</i>	trpB2oF: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACACTATATGCTGGGCACCGC
	trpBoR: TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTCGTGCTTTCAAAATATC
<i>uidA</i>	uidAoF: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACATTACGGCAAAGTGTGGGTCAAT
	uidAoR: TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCATCAGCACGTTATCGAATCCTT

