



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN**  
**ALIMENTOS**  
**Y BIOTECNOLOGÍA**  
**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

---

Caracterización de la resistencia a tigeciclina mediada por plásmidos en aislados de *Klebsiella pneumoniae* de origen ecuatoriano

---

Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieros Biotecnólogos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**AUTORES:** Joyce Teresa Soria Velastegui

Cristian Paul Velásquez Yambay

**TUTOR:** PhD. William Ricardo Calero Cáceres

**Ambato – Ecuador**

**Marzo 2023**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

### **CERTIFICA:**

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 08 de Febrero del 2023.

---

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

**C.I. 171434885-9**

**TUTOR**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Nosotros, Joyce Teresa Soria Velastegui y Cristian Paul Velásquez Yambay, manifestamos que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieros Biotecnólogos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



---

Joyce Teresa Soria Velastegui

**C.I. 1805510938**

**AUTOR**



---

Cristian Paul Velásquez Yambay

**C.I 1804483228**

**AUTOR**

## **APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

---

Presidente del Tribunal

---

PhD. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

C.I.: 1803601853

---

PhD. Mario Daniel García Solís

C.I.: 1103605471

Ambato, 07 de Marzo del 2023

## DERECHOS DE AUTOR

Autorizamos a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final de Integración Curricular o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y proceso de investigación según las normas de la Institución.

Cedemos los Derechos en línea patrimoniales de nuestro Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando nuestros derechos de autor.



---

Joyce Teresa Soria Velastegui

**C.I. 1805510938**

**AUTOR**



---

Cristian Paul Velásquez Yambay

**C.I 1804483228**

**AUTOR**

## **DEDICATORIA**

*A Dios, por darnos la fuerza  
necesaria para salir adelante.*

*A nuestros padres, hermanos  
y familiares por el apoyo recibido  
en todo este proceso*

*A la facultad y a nuestro tutor.*

*Joyce Soria y Cristian Velásquez*

## **AGRADECIMIENTO**

### **JOYCE SORIA**

*Primeramente, quiero agradecer a Dios por nunca dejarme sola y brindarme apoyo en los peores momentos de mi vida. Mi agradecimiento gira en torno a mi madre Lucy, que a pesar de que esta en el cielo, me inculco valores, respeto y me demostró que si ella salió adelante a pesar de las dificultades al final del camino hay una luz y esperanza. Gracias por todo espero este feliz desde ahí arriba. A mi hermano Polo, que es la persona que me apoyo y me brindo su cariño y apoyo incondicional. Y a mi padre que me dio la vida. A mi enamorado, que siempre estuvo ahí en las buenas y malas, gracias por tu amor y cariño cada día de nuestra relación. Y a toda mi familia.*

### **CRISTIAN VELÁSQUEZ**

*Agradezco a Dios por permitirme culminar con éxito todas las fases de este proyecto. A mis hermanos, Sebas y Dani que han sido mi motivación y mi apoyo desde siempre. A mi mamá y mi papá quienes me han apoyado en cada etapa de mi vida y a toda mi familia. Además, a mi otra familia, quienes han sido parte fundamental en mi vida universitaria, Nia, Angela, Kevin y Juan, Joyce, Rose, Pato, Jenni, Ana, Liss gracias.*

*A nuestro supervisor PhD. William Calero, por la confianza que puso en nosotros, por la paciencia y sabiduría que supo brindarnos.*

*Al Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI, por permitirnos desarrollar nuestra tesis, especialmente a Ruthsita, Carito, Xavy y Kathita.*

*A nuestros compañeros y amigos de la carrera, gracias por todo.*

## ÍNDICE

|  |      |
|--|------|
| <b>APROBACIÓN DEL TUTOR</b> .....  | ii   |
| <b>DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD</b> .....   | iii  |
| <b>APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO</b> .....                            | iv   |
| <b>DERECHOS DE AUTOR</b> .....   | v    |
| <b>DEDICATORIA</b> .....   | vi   |
| <b>AGRADECIMIENTO</b> .....  | vii  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | xiii |
| <b>CAPÍTULO 1</b> .....  | 1    |
| <b>MARCO TEÓRICO</b> .....   | 1    |
| 1.1.    Antecedentes Investigativos .....  | 1    |
| 1.1.1.    Emergencia de la resistencia a los antimicrobianos .....                       | 1    |
| 1.1.2.    Historia del Género <i>Klebsiella</i> .....                                    | 2    |
| 1.1.3.    Características microbiológicas de <i>K. pneumoniae</i> .....                  | 3    |
| 1.1.4.    Factores de virulencia de <i>K. pneumoniae</i> .....                           | 4    |
| 1.1.5.    Reservorios de <i>K. pneumoniae</i> .....                                      | 5    |
| 1.1.6. <i>Klebsiella pneumoniae</i> e Infecciones Asociadas a la Atención de Salud ..... | 6    |
| 1.1.7.    Cuadros Clínicos causados por <i>K. pneumoniae</i> .....                       | 6    |
| 1.1.8.    Resistencia natural de <i>K. pneumoniae</i> .....                              | 7    |
| 1.1.9.    Mecanismos de resistencia .....  | 7    |
| 1.1.10.    Genes de resistencia a antibióticos .....                                     | 8    |
| 1.1.11.    Agentes antimicrobianos .....   | 9    |
| 1.1.12.    Tigeciclina.....  | 10   |
| 1.1.13.    Uso de la tigeciclina en infecciones causadas por <i>K. pneumoniae</i> .....  | 10   |
| 1.1.14.    Métodos de sensibilidad antimicrobiana.....                                   | 10   |
| 1.1.15.    Clasificación de cepas resistentes a antibióticos .....                       | 12   |
| 1.1.16.    Métodos de identificación bacteriana .....                                    | 12   |
| 1.2.    Objetivos .....  | 14   |
| 1.2.1.    Objetivo General .....   | 14   |
| 1.2.2.    Objetivos Específicos .....  | 14   |
| <b>CAPÍTULO 2</b> .....  | 15   |
| <b>METODOLOGÍA</b> .....   | 15   |
| 2. 1.    Materiales .....  | 16   |



|   |   |           |
|---|---|-----------|
| 2. 2.                                       | Métodos.....  | 19        |
| 2.2.1.                                      | Obtención de muestras del cepario .....   | 19        |
| 2.2.2.                                      | Resuspensión en BHI .....   | 19        |
| 2.2.3.                                      | Purificación en agar Mac Conkey.....  | 20        |
| 2.2.4.                                      | Criopreservación .....  | 21        |
| 2.2.5.                                      | Identificación bioquímica .....   | 22        |
| 2.2.6.                                      | Preparación de solución madre de tigeciclina.....   | 24        |
| 2.2.7.                                      | Preparación de la placa de microdilución de tigeciclina .....   | 25        |
| 2.2.8.                                      | Inoculación bacteriana en las placas de tigeciclina .....   | 26        |
| 2.2.9.                                      | Implementación de la técnica microdilución de tigeciclina .....   | 27        |
| <b>CAPÍTULO 3</b> .....                     |   | <b>33</b> |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....         |   | <b>33</b> |
| 3. 1.                                       | Análisis y discusión de los resultados.....   | 33        |
| 3.1.2.                                      | Análisis de la resistencia fenotípica a la tigeciclina en <i>K. pneumoniae</i> mediante ensayos de microdilución .....                | 36        |
| 3.1.3.                                      | Determinación de la presencia de genes de resistencia a tigeciclina y carbapenémicos mediante PCR .....                               | 39        |
| 3.1.4.                                      | Comparación de los perfiles de resistencia a diversos antibióticos en aislados de <i>K. pneumoniae</i> pertenecientes al CRN-RAM..... | 43        |
| 3.2.  | Verificación de hipótesis .....   | 56        |
| <b>CAPÍTULO 4</b> .....                     |   | <b>57</b> |
| <b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> ..... |   | <b>57</b> |
| 4. 1.                                       | Conclusiones .....  | 57        |
| 4. 2.                                       | Recomendaciones.....  | 59        |
| <b>MATERIALES DE REFERENCIA</b> .....       |   | <b>60</b> |
| Referencias Bibliográficas .....            |   | 60        |
| <b>ANEXOS</b> .....                         |   | <b>76</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Equipos de laboratorio .....  | 16 |
| <b>Tabla 2.</b> Reactivos de laboratorio.....   | 17 |
| <b>Tabla 3.</b> Materiales de laboratorio.....  | 17 |
| <b>Tabla 4.</b> Reactivos para electroforesis y PCR.....  | 18 |
| <b>Tabla 5.</b> Materiales de escritorio .....  | 18 |
| <b>Tabla 6.</b> Pruebas bioquímicas para la caracterización de <i>K. pneumoniae</i> .....                                     | 22 |
| <b>Tabla 7.</b> Datos obtenidos por la Casa Comercial del antibiótico Tigeciclina .....                                       | 24 |
| <b>Tabla 8.</b> Clasificación de los antibióticos analizados.....   | 29 |
| <b>Tabla 9.</b> Secuencia de los Primers a utilizar.....  | 31 |
| <b>Tabla 10.</b> Caracterización de la población de acuerdo con las variables epidemiológicas.....                            | 34 |
| <b>Tabla 11.</b> Perfil genético de resistencia en muestras de <i>K. pneumoniae</i> pertenecientes al periodo 2020-2021 ..... | 39 |
| <b>Tabla 12.</b> Resultados obtenidos Chi-cuadrado de Pearson .....   | 56 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Línea de tiempo de la evolución de la resistencia antimicrobiana de <i>K. pneumoniae</i> .....                       | 3  |
| <b>Figura 2.</b> Protocolo de obtención de muestras .....   | 19 |
| <b>Figura 3.</b> Protocolo resuspensión en BHI .....  | 20 |
| <b>Figura 4.</b> Protocolo de purificación.....   | 21 |
| <b>Figura 5.</b> Protocolo de criopreservación .....  | 21 |
| <b>Figura 6.</b> Protocolo de preparación de solución madre.....  | 25 |
| <b>Figura 7.</b> Protocolo de la preparación de la placa de tigeciclina.....  | 26 |
| <b>Figura 8.</b> Protocolo de preparación de placa de Tigeciclina .....   | 27 |
| <b>Figura 9.</b> Implementación de la técnica de microdilución de Tigeciclina. ....   | 28 |
| <b>Figura 10.</b> Protocolo de extracción de ADN.....   | 30 |
| <b>Figura 11.</b> Protocolo de electroforesis .....   | 32 |
| <b>Figura 12.</b> Perfil de susceptibilidad a tigeciclina en muestras de <i>K. pneumoniae</i> obtenidas en el periodo 2020-2021 ..... | 37 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 13.</b> Frecuencia de aislamientos con resistencia a distintas familias de antibióticos .....  | 43 |
| <b>Figura 14.</b> Dendrograma de la correlación de las variables epidemiológicas y perfiles de resistencia fenotípicos de <i>K. pneumoniae</i> y sus etiquetas ..... | 47 |
| <b>Figura 15.</b> Dendrograma de la correlación de variables epidemiológicas y perfiles de resistencia fenotípicos de <i>K. pneumoniae</i> (Clúster 1-6).....        | 48 |
| <b>Figura 16.</b> Dendrograma de la correlación de variables epidemiológicas y perfiles de resistencia fenotípicos de <i>K. pneumoniae</i> (Clúster 7-9).....        | 49 |
| <b>Figura 17.</b> Dendrograma de la correlación de variables epidemiológicas y perfiles de resistencia fenotípicos de <i>K. pneumoniae</i> (Clúster 10-15).....      | 50 |
| <b>Figura 18.</b> Dendrograma de la correlación de variables epidemiológicas y perfiles de resistencia fenotípicos de <i>K. pneumoniae</i> (Clúster 16-22).....      | 51 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|  |    |
|--|----|
| <b>Anexo 1.</b> Preparación de Solución Madre de tigeciclina soluble en Dimetilsulfóxido (DMSO).....   | 76 |
| <b>Anexo 2.</b> Preparación de diluciones a partir de la Solución Madre de tigeciclina ...   | 77 |
| <b>Anexo 3.</b> Plantilla para la recolección de datos de la MIC de la Tigeciclina .....   | 77 |
| <b>Anexo 4.</b> Distribución de las concentraciones del antibiótico ( $\mu\text{g/ml}$ ) en la placa de microdilución de Tigeciclina.....                            | 78 |
| <b>Anexo 5.</b> Morfología de <i>K. pneumoniae</i> en Agar MacConkey .....   | 78 |
| <b>Anexo 6.</b> Lectura de placa (48 horas) .....  | 79 |
| <b>Anexo 7.</b> Distribución para el análisis estadístico de los aislados de <i>K. pneumoniae</i> resistentes a distintos antibióticos en el periodo 2020-2021 ..... | 79 |
| <b>Anexo 8.</b> Antibiogramas de cepas de <i>K. pneumoniae</i> .....   | 80 |
| <b>Anexo 9.</b> Análisis de la presencia del gen tet X .....   | 80 |
| <b>Anexo 10.</b> División de Clusters respecto al porcentaje de aislados resistentes a Tigeciclina.....  | 81 |
| <b>Anexo 11.</b> Distribución de la resistencia a tigeciclina en el Ecuador en el año 2020-2021.....   | 82 |

## RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es considerada una de las principales amenazas para la salud pública, la seguridad alimentaria y el desarrollo global. Actualmente, la rápida diseminación de microorganismos multirresistentes, con resistencia extendida y panresistentes representa un potencial problema sanitario a nivel mundial. El estudio de los perfiles de resistencia a diversos antibióticos incluidos aquellos que son considerados de último recurso (tigeciclina) en aislados de importancia clínica es esencial en el país. Este estudio se basó en caracterizar los perfiles de resistencia fenotípica y genotípica a tigeciclina en aislados de *K. pneumoniae* pertenecientes a la colección del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CN-RAM) en el periodo 2020-2021. En un total de 376 muestras analizadas no se evidenció la presencia de genes de resistencia a tigeciclina (*tetX*, *tet(X3)* y *tet(X4)*), sin embargo, se detectó un total de 35 cepas resistentes a dicho antibiótico en el periodo mencionado. Adicionalmente, se evaluó la presencia de genes de resistencia a carbapenémicos, en donde se destacó el gen *bla<sub>KPC</sub>*, por su elevada prevalencia en las muestras (370 de 376). Los perfiles de resistencia a distintos antibióticos mostraron una alta tasa de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, seguido por las fluoroquinolonas y aminoglucósidos, mientras que la colistina y tigeciclina mantienen tasas bajas de resistencia. El análisis estadístico obtenido mostró que no existe diferencia significativa entre los perfiles de resistencia en el 2020 con los obtenidos en el 2021, lo que sugiere que la resistencia antimicrobiana se mantuvo constante dentro de este periodo.

**Palabras claves:** Resistencia antimicrobiana, tigeciclina, *K. pneumoniae*, carbapenemasas, CRN-RAM.

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance (RAM) is considered one of the main threats to public health, food security and global development. Currently, the rapid spread of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant microorganisms represent a potential global health problem. Therefore, the study of resistance profiles to various antibiotics, including those that are considered last resort (tigecycline) in clinically important isolates is essential in the country. This study was based on characterizing the profiles of phenotypic and genotypic resistance to tigecycline in *K. pneumoniae* isolates belonging to the collection of the National Reference Centre for Antimicrobial Resistance (CN-RAM) in the period 2020-2021. In a total of 376 samples analysed, the presence of resistance genes to tigecycline (*tetX*, *tet(X3)* and *tet(X4)*) was not evidenced, however, a total of 35 strains resistant to said antibiotic were detected in the period. In addition, the presence of carbapenem resistance genes was evaluated, where the *bla<sub>KPC</sub>* gene stood out, due to its high prevalence in the samples (370 of 376). The resistance profiles to different antibiotics showed a high rate of resistance to  $\beta$ -lactams, followed by fluoroquinolones and aminoglycosides, while colistin and tigecycline maintain low rates of resistance. The statistical analysis obtained showed that there is no significant difference between the resistance profiles in 2020 with those obtained in 2021, which suggests that antimicrobial resistance remained constant within this period.

**Keywords:** Antimicrobial resistance, tigecycline, *K. pneumoniae*, carbapenemases, CN-RAM.

# CAPÍTULO 1

## MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes Investigativos

#### 1.1.1. Emergencia de la resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es considerada una de las 10 amenazas principales para la salud pública global según la Organización Mundial de la Salud (OMS). De acuerdo con la OMS, las enterobacterias resistentes a carbapenémicos se encuentran dentro de la categoría 1 (crítica) para la investigación epidemiológica y el desarrollo de nuevos antibióticos (**World Health Organization, 2017**). El tratamiento de estos microorganismos incluye el uso de antibióticos de último recurso como la colistina y la tigeciclina; este último es el primer miembro de las glicilciclinas, comúnmente utilizado como antibiótico de alta efectividad para tratar infecciones ocasionadas por bacterias Gram negativas multirresistentes (**Jin et al., 2021; Zhai et al., 2022**).

La resistencia a la tigeciclina estuvo limitada únicamente a mutaciones cromosómicas, no transmisibles entre bacterias. A pesar de que la susceptibilidad a este antibiótico en aislamientos multirresistentes (MDR) sigue siendo relativamente alta, se ha observado una reciente evolución significativa de nuevos mecanismos de resistencia a tigeciclina mediada por plásmidos (**He et al., 2019; Mohsin et al., 2021**). La principal preocupación por RAM radica en la propagación potencial de los mecanismos de resistencia por transferencia horizontal de genes; a nivel mundial, *K. pneumoniae* es de las enterobacterias más reportadas como multirresistente (**Liao et al., 2022**).

Considerada como un patógeno emergente, *K. pneumoniae* es una de las principales causas de infecciones nosocomiales clínicamente significativas en humanos. La alta diversidad de genes de resistencia a antibióticos como los *tet* (X) en *K. pneumoniae* puede limitar las opciones terapéuticas, representando así un potencial problema sanitario global (Ahmed et al., 2021; Zhai et al., 2022).

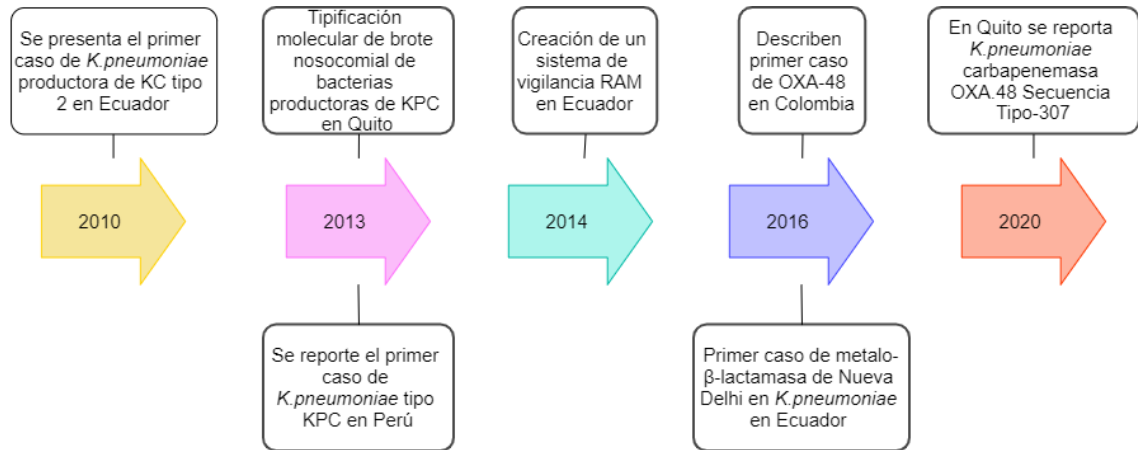
### 1.1.2. Historia del Género *Klebsiella*

Las bacterias del género *Klebsiella* fueron aisladas por primera vez en el año 1882 por Carl Friedlander, quien lo describió como un bacilo encapsulado, después de realizar un aislamiento de la bacteria desde los pulmones de una persona fallecida con neumonía. Por lo que se lo denominó en ese tiempo como bacilo de Friedlander (Ashurst & Dawson, 2022). Hasta el año de 1886, se reemplazó esta denominación por *Klebsiella* debido a Edwin Klebs, quien fue reconocido por profundizar en el conocimiento en enfermedades infecciosas (Emerging Infectious Diseases, 2010).

Por medio de los avances en biología molecular, se han caracterizado alrededor de 7 especies que pertenecen a este género, las cuales presentan una homología que oscila entre el 53 y 58 % en su ADN (Tártara, 2013). En el 2017, la Organización Mundial de la Salud reconoció a *K. pneumoniae* como una fuerte amenaza para la salud pública, por su alta capacidad de desarrollar importantes mecanismos de resistencia a antibióticos (Stojowska et al., 2021). A continuación, en la *Figura 1* se muestra una línea de tiempo con los acontecimientos más relevantes en la evolución de *K. pneumoniae* en Latinoamérica.

**Figura 1.**

*Línea de tiempo de la evolución de la resistencia antimicrobiana de K. pneumoniae*



**Fuente: Herrera et al. (2021).**

### 1.1.3. Características microbiológicas de *K. pneumoniae*

Esta especie es un bacilo Gram negativa, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, no móvil, anaerobio facultativo y fermentador de lactosa con capacidad de formar gas en un periodo de 48 horas (**Podschun & Ullmann, 1998**). A parte, posee la facultad de producir sideróforos, con el fin de asegurar la obtención de hierro (**Choby et al., 2020**).

Las condiciones óptimas para el crecimiento in vitro son a 37 °C, pH 7.0 y a una atmósfera de presión. Por otro lado, el medio empleado para aislar *K. pneumoniae* es el agar MacConkey, ya que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y permite diferenciar aquellas bacterias Gram negativas que tienen la capacidad de fermentar lactosa (**De Koster et al., 2022; Kennedy & Estigarribia, 2021**).



#### 1.1.4. Factores de virulencia de *K. pneumoniae*

Los principales factores de virulencia que se asocian con este género son fimbrias, sideróforos, polisacáridos capsulares y lipopolisacárido. Estos factores desempeñan un papel importante en la patogenicidad de la bacteria, ya que esta depende en gran medida de la acción conjunta de los mismos (**Izquierdo, 2003**).

A continuación, se describen cada uno de ellos:

- a) **Pilis (Fimbrias):** son proyecciones filamentosas que se encuentran presentes en la superficie bacteriana. Las fimbrias confieren la capacidad de adherirse con facilidad al hospedero (**Izquierdo, 2003**).
  
- b) **Sideróforos:** son moléculas peptídicas de bajo peso molecular que actúan como agentes quelantes para la absorción de hierro. Estas moléculas son producidas por ciertas bacterias para reducir el hierro de su forma  $Fe^{3+}$  a una forma más soluble y fácilmente asimilable para su nutrición ( $Fe^{2+}$ ) (**Izquierdo, 2003**).
  
- c) **Polisacáridos Capsulares:** material capsular que forma envolturas gruesas cubriendo la superficie bacteriana. Brinda protección a la célula del sistema inmune del hospedero en procesos como la fagocitosis. Estos polisacáridos ayudan a que la bacteria tenga una barrera física anti-fagocítica (**Izquierdo, 2003**).
  
- d) **Lipopolisacárido (LPS):** constituyen moléculas glucolípidicas que se encuentran en la cara externa de la membrana celular de las bacterias Gram negativas. Poseen la propiedad de inhibir anticuerpos, con funciones endotóxicas y adherentes a las células y tejidos de los hospederos (**Izquierdo, 2003**).

### 1.1.5. Reservorios de *K. pneumoniae*

*K. pneumoniae* representa una de las bacterias de mayor importancia clínica en la transmisión de infecciones nosocomiales. Una vez adquirida, esta especie coloniza las superficies mucosas de la persona, principalmente el tracto gastrointestinal y la nasofaringe. Dentro del hospital, el contacto de persona a persona es considerada una fuente importante de transmisión, siendo las manos, mucosas, orina o heridas los principales mecanismos de infección (Martin & Bachman, 2018)..

Por otro lado, las superficies como paredes, instrumentos, equipos, sondas o catéteres contaminados suelen ser consideradas también como posibles reservorios y fuentes de infección. *K. pneumoniae* se encuentra principalmente en las mucosas, sin embargo, en muchas ocasiones no causa efectos negativos en el hospedero hasta que se encuentra inmunocomprometido, razón por la cual, se considera un patógeno oportunista. Los pacientes más susceptibles a infecciones causadas por *K. pneumoniae* son los que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos (UCI), neonatos, pacientes diabéticos, alcohólicos, con enfermedades pulmonares o inmunocromprometidos (Martin & Bachman, 2018).

La ubicuidad de *K. pneumoniae* posibilita su colonización e infección incluso desde el medio ambiente, ya que se encuentra con frecuencia en el suelo, superficie de plantas y aguas residuales, sin embargo, las cepas ambientales son significativamente más susceptibles a los antibióticos que los aislados clínicos (Podschun & Ullmann, 1998). En el 2020 el Centro Europeo de Control y Prevención de Enfermedades catalogó a *K. pneumoniae* como una de las especies más reportadas en las redes hospitalarias de 29 países de la Unión Europea, con una frecuencia del 11,9% de todos los aislamientos notificados en Europa (European Centre for Disease Prevention and Control, 2020).

### **1.1.6. *Klebsiella pneumoniae* e Infecciones Asociadas a la Atención de Salud**

*K. pneumoniae* no posee una afinidad específica por algún órgano o tejido, ya que tiene la capacidad de colonizar la nasofaringe, el tracto gastrointestinal y la piel (**Podschun & Ullmann, 1998**). A partir de los años 70 esta bacteria se estableció mayoritariamente en los ambientes intrahospitalarios, llegando a ser una de las principales causas de infecciones nosocomiales, en consecuencia, la tasa de mortalidad aumentó drásticamente y la evolución de los mecanismos de resistencia limitaron las opciones terapéuticas para su tratamiento (**Herrera et al., 2021**).

Por otra parte, se estimó un aproximado de 790 000 muertes ocasionadas por síndromes infecciosos asociados a *K. pneumoniae* en el 2019. Con una tasa de mortalidad de 12 muertes por cada 100 000 habitantes (**Centers for Disease Control and Prevention, 2019**).

### **1.1.7. Cuadros Clínicos causados por *K. pneumoniae***

*K. pneumoniae* representa aproximadamente un tercio del total de las infecciones causadas por bacterias Gram negativas produciendo infecciones por heridas quirúrgicas, nosocomiales y del tracto urinario, cistitis, endocarditis, neumonía y septicemia, (**Navon et al., 2017**). A parte de ser el causante de afecciones como la neumonía necrotizante, abscesos hepáticos y endoftalmitis. Por lo general, las infecciones por *K. pneumoniae* están asociadas a altas tasas de mortalidad, periodos de hospitalización prolongados y altos costos de tratamiento (**Effah et al., 2020**).

### 1.1.8. Resistencia natural de *K. pneumoniae*

La producción de ciertos compuestos como mecanismos de protección contra medicamentos favorecen la sobrevivencia de microorganismos patógenos expuestos a antibióticos (Foxman, 2010). La producción de adhesinas, sideróforos y toxinas contribuyen a la colonización de las células humanas. Por otro lado, la formación de biopelículas en *K. pneumoniae* ayuda a adherirse al hospedero evitando la acción del sistema inmunológico y favoreciendo el fracaso de los tratamientos clínicos. Los mecanismos de resistencia natural en *K. pneumoniae* se basan en la sobreexpresión de bombas de eflujo, cambios en la estructura de las porinas de la membrana externa, y mutaciones en sitios de unión al ribosoma (Dybowska et al., 2017; Navon et al., 2017).

### 1.1.9. Mecanismos de resistencia

Desde el descubrimiento de los antibióticos, su uso a gran escala ha permitido la reducción de la morbilidad y la mortalidad ocasionada por infecciones bacterianas. A su vez, los mecanismos de resistencia a antibióticos han aumentado significativamente debido a la rápida aparición y propagación de cepas portadoras de genes de resistencia a antibióticos (Zhang et al., 2022). *K. pneumoniae* tiene un elevado rango de resistencia a los antibióticos debido al desarrollo de múltiples mecanismos de resistencia. A continuación, se describen algunos de los mecanismos de resistencia más importantes de *K. pneumoniae*:

#### - Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son mecanismos bacterianos causantes de una elevada resistencia contra muchos fármacos antimicrobianos. Para *K. pneumoniae* se ha reportado varias bombas de salida de múltiples fármacos, entre ellas se encuentran las bombas AcrAb, EefAB, OqxAB y KexD las cuales son clasificadas dentro de la

familia RND (Ni et al., 2020). Las bombas de salida de fármacos por lo general están constituidas de 3 componentes activos: la proteína de la membrana tanto interna como externa y la proteína periplasmática (Nikaido & Takatsuka, 2009). La proteína de membrana interna reconoce varias sustancias químicas entre ellas los antibióticos, con los cuales forman un complejo trimérico para la expulsión del fármaco con ayuda de los otros componentes (Nikaido & Takatsuka, 2009).

#### - **Degradación enzimática**

La producción de enzimas degradadoras de fármacos se asocia fuertemente a la resistencia antimicrobiana. Enzimas como  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas actúan en la degradación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y carbapenémicos respectivamente (Jiang et al., 2020). Por otro lado, los genes *tetX* producen una enzima mono oxigenasa dependiente de FAD que hidroxila antibióticos como la tigeciclina y la tetraciclina (Zhang et al., 2022).

#### - **Porinas de la membrana externa**

Las porinas actúan como receptores de bacteriocinas y fagos. En *K. pneumoniae* las principales porinas de la membrana externa son la OmpK35 y OmpK36 (Tsai et al., 2011). La susceptibilidad a los antibióticos puede depender de la expresión de ambas porinas, es decir, existe evidencia de que la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* productora de BLEE expresan un solo tipo de porinas, la OmpK36. Mientras que, las cepas no productoras de BLEE, expresan en su fenotipo ambas porinas. La ausencia de la porina OmpK35 puede desempeñar un papel importante en la resistencia a varios antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Palasubramaniam et al., 2007).

### **1.1.10. Genes de resistencia a antibióticos**

El uso prolongado de antibióticos en humanos, animales y en la agricultura ha contribuido en la aparición de cepas de *K. pneumoniae* que albergan varios genes de

resistencia. El problema radica en la rápida diseminación de estos genes mediante elementos genéticos móviles como los plásmidos (Wang et al., 2021).

Se han identificado varios genes que confieren resistencia a antibióticos carbapénemicos codificados por plásmidos como las carbapenemasas de *K. pneumoniae* (KPC), oxacilinasas (OXA-48), imipenemasa (IMP), metalo- $\beta$ -lactamasa de Nueva Delhi (NDM) y metalo- $\beta$ -lactamasa codificada por el Integrón Verona (VIM). Finalmente, los genes *tetX*, *tet* (X3) y *tet* (X4), también encontrados en plásmidos, codifican a una enzima monooxigenasa dependiente de flavina que cataliza la degradación de tigeciclina (Yang et al., 2004).

#### 1.1.11. Agentes antimicrobianos

Los antibióticos se clasifican en base a sus propiedades, estructura química o su espectro de acción. Las principales familias se describen a continuación:

**Betalactámicos o  $\beta$ -lactámicos:** Son bactericidas cuyo mecanismo de acción es inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana. Dentro de esta familia se encuentran otros grupos, entre los cuales destacan las cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y cefepime), los monobactámicos (aztreonam) y los carbapenémicos (meropenem, imipenem y ertapenem) (Suárez & Gudiol, 2009).

**Aminoglucósidos:** Su mecanismo de acción se basa en la unión del antibiótico a la fracción 30S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis de proteínas u ocasionando la producción de proteínas defectuosas. Dentro de esta familia se encuentra la gentamicina y la amikacina (Germovsek et al., 2017).

**Fluoroquinolonas:** Su acción bactericida se basa en la inhibición de la actividad de la ADN girasa y la topoisomerasa, enzimas necesarias para el plegamiento de la cadena de doble hélice de ADN. El ciprofloxacino es el antibiótico principal de esta familia (Baggio & Ananda, 2021).

**Polimixinas:** Actúa ocasionando lesiones en la membrana externa e interna de la célula bacteriana aumentando la permeabilidad de las mismas y ocasionando la muerte celular. Dentro de esta familia se encuentra la colistina (Mohapatra et al., 2021).

**Glicilciclinas:** La tigeciclina es el primer miembro de esta familia. Se unen reversiblemente a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, impidiendo la síntesis de las proteínas (Greer, 2006).

#### **1.1.12. Tigeciclina**

Es un antibiótico de último recurso, perteneciente a una nueva clase de antibióticos denominada glicilciclinas. Aprobado por la “Food and Drug Administration” (FDA), es un agente antimicrobiano con una alta actividad *in vitro* en contra de muchos de los patógenos Gram positivos y Gram negativos (Pankey, 2005). Su uso es recomendado para el tratamiento de infecciones causadas por patógenos de resistencia extendida (XDR) por ser un antibiótico de espectro extendido (Mouloudi et al., 2014).

#### **1.1.13. Uso de la tigeciclina en infecciones causadas por *K. pneumoniae***

El tratamiento de infecciones ocasionadas por *K. pneumoniae* multirresistente requiere el uso de la colistina y la tigeciclina (Lin et al., 2014). Por su alta actividad *in vitro* frente a varios microorganismos multirresistentes, la tigeciclina actualmente es considerada una de las pocas opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de estas bacterias, entre las cuales se encuentra *K. pneumoniae* (Moghimi et al., 2021). La FDA incluye a la tigeciclina como tratamiento en contra de infecciones complicadas de la piel y su estructura, infecciones intraabdominales complicadas y neumonía bacteriana (Beabout et al., 2015).

#### **1.1.14. Métodos de sensibilidad antimicrobiana**

Permiten conocer la susceptibilidad de un microorganismo exponiéndolo a un medicamento, además sirve para encontrar el mejor tratamiento frente a una infección bacteriana. Evalúan los niveles de susceptibilidad ante la presencia de un antibiótico determinado (**Leclercq et al., 2013**). Existen algunos métodos descritos, entre los principales se encuentran el método Kirby-Bauer o difusión en disco y microdilución en caldo. A continuación, se detallan dos principales:

- **Técnica de Microdilución en caldo**

Es una técnica que permite medir de forma cuantitativa la actividad *in vitro* de un antibiótico con respecto a una determinada bacteria. Mediante esta técnica se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI), es decir, la concentración mínima que un antibiótico necesita para inhibir por completo el crecimiento de un microorganismo (**Andrews, 2001**). La microdilución en caldo constituye volúmenes muy pequeños de caldo con distintas concentraciones del antibiótico. Esta prueba se realiza en microplacas de varios pocillos, en donde se coloca un volumen con distintas concentraciones del antibiótico y un cultivo bacteriano. Finalmente se observa el crecimiento bacteriano en los pocillos y se determina el CMI (**Leber, 2016**).

- **Técnica de Kirby-Bauer o difusión en disco**

Esta técnica es una de las más antiguas para el estudio del nivel de sensibilidad y es frecuentemente utilizada dentro de laboratorios de análisis. Se basa en la difusión del antibiótico por medio de un soporte sólido hacia la base del agar, por lo general se emplea Mueller Hinton, recomendado por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (**CLSI, 2022**). En donde se colocan los suplementos necesarios para que exista el crecimiento de organismos. Para observar los resultados, se debe interpretar de acuerdo con la zona de inhibición de crecimiento, midiendo el diámetro que se obtiene, el cual esta relaciona directamente con la susceptibilidad de la cepa para el antibiótico (**Leclercq et al., 2013**).



### 1.1.15. Clasificación de cepas resistentes a antibióticos

La clasificación de los microorganismos según su nivel de resistencia a antibióticos permite mejorar la comprensión de la amplitud del problema de la resistencia antimicrobiana. Esta clasificación es posible gracias a la evolución significativa de los mecanismos de resistencia a antibióticos, lo que genera distintos fenotipos multirresistentes que se encuentran clasificados en: microorganismos multirresistentes (MDR), de resistencia extendida (XDR) y panresistentes (PDR). Las cepas de *K. pneumoniae* se clasifican como MDR si son resistentes a 3 de los 12 grupos de antibióticos, XDR si son resistentes a 10 o a su vez a 11 de los 12 grupos de antibióticos y finalmente se considera PDR si son resistentes a todos los grupos de antibióticos disponibles para el tratamiento de infecciones causadas por *K. pneumoniae* (Jimenez et al., 2019; Magiorakos et al., 2012).

### 1.1.16. Métodos de identificación bacteriana

#### - Métodos fenotípicos:

Estos métodos son los más usados en laboratorios de microbiología clínica para identificar o comprobar el género y especie de una bacteria debido a la alta disponibilidad, la rapidez y el bajo costo de estos métodos. Algunos métodos incluyen la caracterización macroscópica y microscópica, el cultivo en medios diferenciales con el fin de poner en manifiesto propiedades o metabolismos que una especie de microorganismo determinado posee. Por otro lado, las pruebas bioquímicas permiten identificar la capacidad de algunos microorganismos para fermentar distintos tipos de carbohidratos, utilización de citrato como fuente de carbono, producción extracelular de distintos compuestos y/o movilidad (Bou et al., 2011; Ferone et al., 2020).

- **Métodos genotípicos**

Se aplica métodos moleculares para la identificación de un determinado microorganismo. El uso de dianas moleculares permite una clasificación taxonómica y filogenética confiable. El análisis del ARNr 16S es el más utilizado como marcador por su alto grado de conservación. A pesar de que la secuencia del gen ARNr 16S es relativamente pequeña (1 500 pb), este tamaño es suficiente para identificar polimorfismos específicos de una especie (**Petti et al., 2005**).

## **1.2.Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo General**

Caracterizar la resistencia a tigeciclina mediada por plásmidos en aislados de *Klebsiella pneumoniae* de origen ecuatoriano.

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

- Analizar la resistencia fenotípica a la tigeciclina en *K. pneumoniae* mediante ensayos de microdilución en los aislados del CN-RAM.
- Determinar mediante la Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) la presencia de genes resistentes a tigeciclina mediada en plásmidos en las cepas de *K. pneumoniae* en los aislados del CN-RAM.
- Comparar los perfiles de resistencia a diversos antibióticos en aislados de *K. pneumoniae* pertenecientes al CN-RAM.

## CAPÍTULO 2

### METODOLOGÍA

El presente proyecto de investigación es de **tipo cuantitativo y cualitativo**. La parte **cuantitativa** representa la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de la tigeciclina en los aislados de *K. pneumoniae* pertenecientes al Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM). La parte **cualitativa** hace referencia al análisis de la presencia de genes de resistencia a tigeciclina en los mismos aislados, además se analizó la correlación entre la resistencia a distintos antibióticos con el año al que corresponden.

Las hipótesis para probar en la presente investigación son:

- **Hipótesis nula**

La resistencia a distintas familias de antibióticos no aumentó durante el periodo 2020-2021 en aislados de *K. pneumoniae* de origen ecuatoriano.

- **Hipótesis alternativa**

La resistencia a distintas familias de antibióticos aumentó durante el periodo 2020-2021 en aislados de *K. pneumoniae* de origen ecuatoriano.

- **Criterios de inclusión**

Las muestras deberán cumplir con los siguientes criterios:

- a) Aislamientos caracterizados como *K. pneumoniae* por el CRN-RAM.
- b) Aislamientos que pertenezcan al periodo 2020-2021 obtenidos de la base de datos.
- c) Pacientes adultos
- d) Muestra y aspirados traqueales
- e) Unidad de Cuidados Intensivos (UCI)
- f) Pacientes con diagnóstico detallado

- **Criterios de exclusión**

- a) Mala rotulación de aislamiento del cepario.
- b) Cepas de *K. pneumoniae* aisladas en distinto tiempo
- c) Cepas que no puedan ser regeneradas (no viables) del banco de microorganismos del CRN-RAM.

**2. 1. Materiales**

**Tabla 1.**

*Equipos de laboratorio*

| <b>Equipos</b>                   | <b>Cantidad</b> |
|----------------------------------|-----------------|
| Balanza analítica                | 1               |
| Termociclador                    | 1               |
| Estufa bacteriológica +5°C-120°C | 1               |
| Autoclave                        | 1               |
| Fuente de poder                  | 1               |
| Congelador (-20°C)               | 1               |
| Nevera(4°C)                      | 1               |
| Cámara de electroforesis         | 1               |
| Turbidímetro                     | 1               |
| Termohidrómetro                  | 1               |
| Vortex                           | 1               |
| Transiluminador UV               | 1               |
| Mechero Bunsen                   | 1               |
| Cabina de flujo laminar          | 1               |
| Microscopio óptico               | 1               |

**Tabla 2.***Reactivos de laboratorio*

| <b>Reactivos</b>          | <b>Cantidad</b> |
|---------------------------|-----------------|
| Agua bidestilada          | 2 botellas      |
| Agar Mueller - Hinton     | 600 g           |
| Medio de transporte Amies | 500 g           |
| Agua peptonada            | 15 g            |
| Glicerol                  | 2 botellas      |
| Agar MacConkey            | 700 g           |
| Tampón PBS                | 15 g            |
| Tigeciclina               | 4 g             |
| Colorante cristal violeta | 1 frasco        |
| Agua destilada            | 5 botellones    |
| Solución de yodo          | 1 frasco        |
| Etanol - acetona          | 1 frasco        |

**Tabla 3.***Materiales de laboratorio*

| <b>Materiales</b>          | <b>Cantidad</b> |
|----------------------------|-----------------|
| Viales de criopreservación | 100             |
| Tubos de ensayo            | 80              |
| Puntas de micropipetas     | 1 de cada tipo  |
| Tubos para microcentrífuga | 2000            |
| Gradilla                   | 6               |
| Espátula                   | 4               |
| Caja de portaobjetos       | 4               |
| Asa de inoculación         | 4               |
| Cajas mono Petri plásticas | 1000            |
| Juego de micropipetas      | 2               |
| Hisopos de plástico x 15cm | 800             |

| <b>Materiales</b>        | <b>Cantidad</b> |
|--------------------------|-----------------|
| Tubos de ensayo con tapa | 1200            |
| Tubos 0.2mL para PCR     | 1000            |
| Pipetas x 10mL           | 10              |

**Tabla 4.**

*Reactivos para electroforesis y PCR*

| <b>Reactivos</b>                     | <b>Cantidad</b> |
|--------------------------------------|-----------------|
| DREAMTAQ Mastermix                   | 16 unidades     |
| Agarosa                              | 1000 mg         |
| Puntas de micropipeta 200 µl         | 2000 unidades   |
| Puntas de micropipeta 20µl           | 2000 unidades   |
| Microtubos eppendorf microamp 0.2 mL | 4000 unidades   |
| Ultrapure TM 10X TBE buffer 1L       | 2000 unidades   |

**Tabla 5.**

*Materiales de escritorio*

| <b>Insumos y Materiales</b> | <b>Cantidad</b>       |
|-----------------------------|-----------------------|
| Mascarillas                 | 1 caja (100 unidades) |
| Cofias                      | 2                     |
| Guantes                     | 4 cajas (50 pares)    |
| Cinta de esterilización     | 1 rollo               |
| Papel de esterilización     | 6 pliegos             |
| Alcohol antiséptico         | 2 litros              |
| Jabón líquido               | 1 frasco              |
| Gel antibacterial           | 2 frascos             |
| Algodón                     | 2 bolsas              |
| Gasa                        | 2 rollos              |
| Cámara fotográfica          | 1                     |
| Computadora                 | 1                     |
| Impresora                   | 1                     |

| Insumos y Materiales   | Cantidad   |
|------------------------|------------|
| Hojas de papel bond A4 | 1 paquete  |
| Esferos                | 2 unidades |
| Rotulador              | 2 unidades |
| Hilo chillo            | 1 unidad   |

## 2. 2. Métodos

### 2.2.1. Obtención de muestras del cepario

Dentro del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) en el área de CRN-RAM se buscó cada una de las cepas pertenecientes al período 2020-2021 filtradas por medio del sistema WHONET 5.6, de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión establecidos y se colocaron en una caja estéril debidamente rotulada con información básica. Las cajas con todas las muestras fueron llevadas al laboratorio de microdilución para guardar en refrigeración a una temperatura de 4 °C.

#### Figura 2.

*Protocolo de obtención de muestras*



### 2.2.2. Resuspensión en BHI

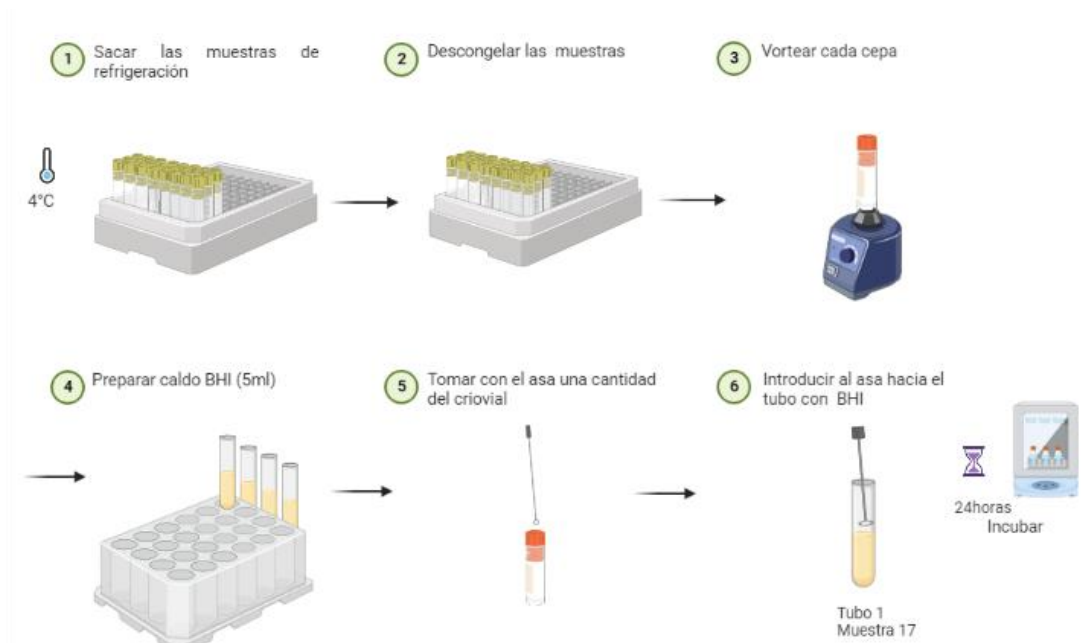
Una vez finalizada la etapa de obtención de muestras del cepario, las muestras fueron descongeladas y se llevaron al vórtex para homogenizar cada una de las cepas; posteriormente se prepararon tubos de ensayo con 5 ml de caldo Infusión Cerebro



Corazón (BHI por sus siglas en inglés), se procedió a resuspender con el asa de siembra cada una de las cepas y se introdujo en cada tubo previamente rotulado (número de tubo y código de muestra). Los tubos resuspendidos fueron incubados a 37 °C por 24 horas.

### Figura 3.

#### *Protocolo resuspensión en BHI*

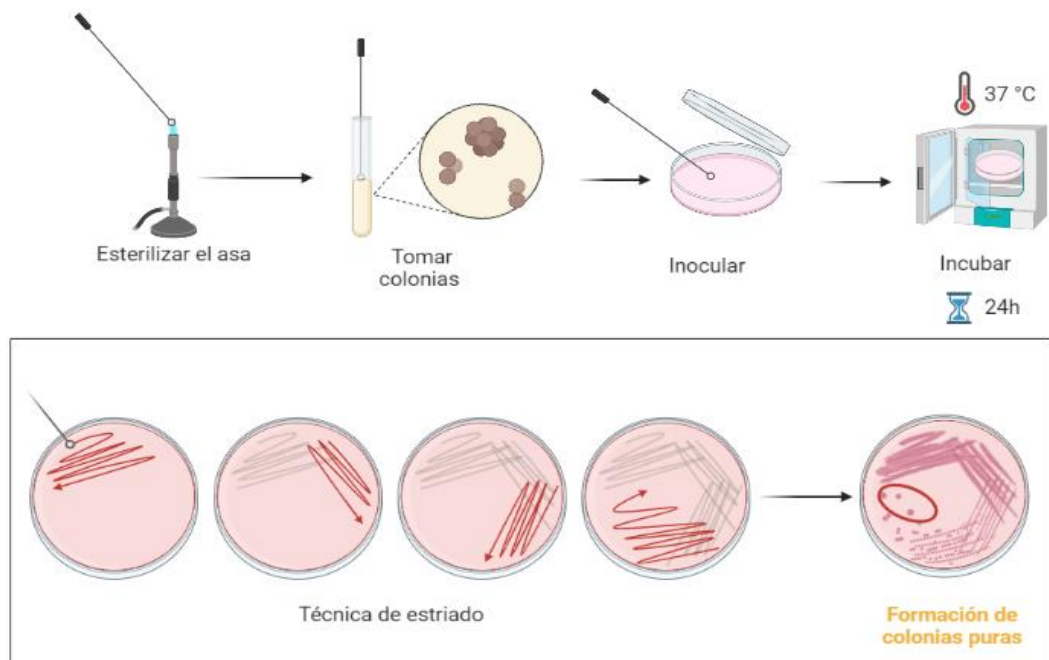


#### 2.2.3. Purificación en agar Mac Conkey

Dentro de este procedimiento, se tomaron cada una de las muestras resuspendidas en los tubos con BHI (todas las que presentan turbidez en el medio) con ayuda de un asa de siembra previamente esterilizada en el mechero y se sembró por estriado en cajas Petri con agar Mac Conkey, finalmente se incubaron durante 24 horas a 37 °C (Lozano & Clavijo, 2001).

**Figura 4.**

*Protocolo de purificación*

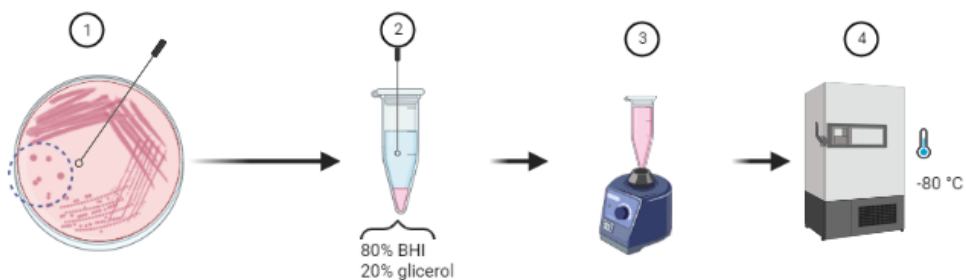


#### 2.2.4. Criopreservación

Aquellas colonias que mostraron una coloración violeta fueron identificadas como presuntas *K. pneumoniae*. Por medio del proceso de purificación, se tomaron 3 colonias del aislamiento en agar Mac Conkey, para que las células se criopreserven adecuadamente. En tubos eppendorf con 1,3 ml de BHI y glicerol (20%) se inocularon las colonias con ayuda de un palillo estéril, posteriormente se homogenizaron los tubos en un vórtex y finalmente se almacenaron a -20 °C (Murray et al., 2008).

**Figura 5.**

*Protocolo de criopreservación*


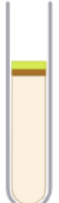
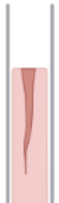


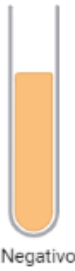


### 2.2.5. Identificación bioquímica


Las pruebas apropiadas para la identificación fenotípica de esta bacteria fueron 5 con el objetivo de verificar que no exista ningún tipo de contaminación en las muestras. En la siguiente tabla se detalla la técnica adicional al resultado respectivo arrojado por cada una.

**Tabla 6.**

*Pruebas bioquímicas para la caracterización de K. pneumoniae*

| Prueba | Técnica   | Resultado  |        |   |                          |
|--------|---|--|--------|---|--------------------------|
|        |   | para <i>K. pneumoniae</i>  | Imagen | Referencia  |                          |
|        | La producción de Ácido sulfhídrico (H <sub>2</sub> S) | H <sub>2</sub> S provoca ennegrecimiento en el medio de cultivo.   | -      | <br>Negativo  | <b>MacWilliams, 2016</b> |
| SIM    | Indol   | La producción de indol dentro del metabolismo bacteriano tiñe de rojo al medio, debido a que este reacciona con el reactivo de Kovács. | -      | <br>Negativo | <b>MacWilliams, 2016</b> |
|        | Motilidad   | Presenta crecimiento o turbidez por fuera de la línea de siembra.  | -      | <br>No móvil | <b>MacWilliams, 2016</b> |

|                    |  |                                  |  |                              |
|--------------------|--|----------------------------------|--|------------------------------|
| <p>Rojo Metilo</p> | <p>Si se produce compuestos ácidos al metabolizar la glucosa, el medio se vuelve rojo cuando se añade el indicador rojo de metilo.</p>   | -                                |  <p>Negativo</p>  | <p><b>McDevitt, 2009</b></p> |
| <p>MRVP</p>        | <p>Si se produce compuestos neutros al metabolizar la glucosa, el medio se vuelve rojo después de añadir alfa naftol, alcohol etílico e hidróxido de potasio.</p>                                    | +                                |  <p>Positivo</p> | <p><b>McDevitt, 2009</b></p> |
| <p>TSI</p>         | <p>La fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa produce un medio ácido en la superficie y en la base (A/A). La coloración se mantiene amarilla. El agrietamiento o ruptura del medio indica la</p> | <p>A/A con producción de gas</p> |  <p>A/A</p>     | <p><b>Lehman, 2016</b></p>   |

|      |   |   |   |                    |
|------|---|---|---|--------------------|
| Urea | <p>producción de gas.</p> <p>La hidrolisis de la urea mediante la ureasa produce amoníaco y dióxido de carbono, estos compuestos alcalinizan el medio. El indicador rojo de fenol se vuelve rojo o violeta en medio alcalino.</p> | + |  | <b>Brink, 2019</b> |
|------|---|---|---|--------------------|

### 2.2.6. Preparación de solución madre de tigeciclina

Para este procedimiento, se empleó la técnica de microdilución en caldo, la cual se basó en el lineamiento del European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (EUCAST, 2003). Para esto se preparó una solución madre de tigeciclina (Tigecycline hydrate, SIGMA Life Science) a una concentración de 1002.75 µg/ml, tomando en cuenta los datos de pureza, potencia y fracción activa del antibiótico (Anexo I).

#### Tabla 7.

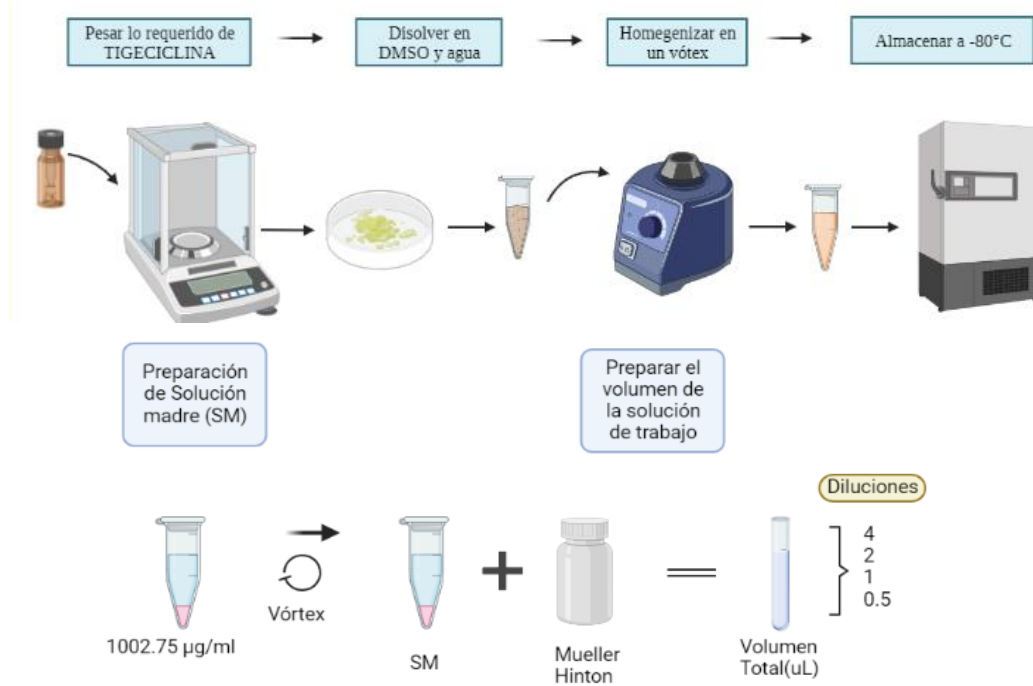
*Datos obtenidos por la Casa Comercial del antibiótico Tigeciclina*

| Datos del Antibiótico  |                           |
|------------------------|---------------------------|
| Lote:110M4712V         | Casa Comercial: SIGMA     |
| Potencia: 286.502ug/mg | Almacenamiento: 2-8 °C    |
| Solvente: DMSO         | Pureza: 98% (HPLC)        |
| Fracción activa: 31%   | Porcentaje de Agua: 5.79% |

**Fuente:** (SIGMA, 2023).

**Figura 6.**

*Protocolo de preparación de solución madre*

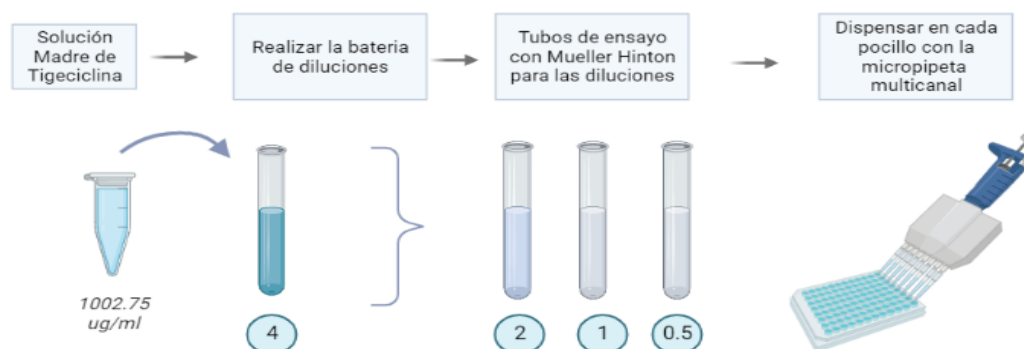


### 2.2.7. Preparación de la placa de microdilución de tigeciclina

A partir de la solución madre, en un tubo de ensayo se preparó una solución diaria de trabajo a una concentración de 8 µg/ml. Esta solución de trabajo se diluyó varias veces en medio Mueller-Hinton con ajuste catiónico. Las concentraciones obtenidas de la batería de diluciones fueron las siguientes: 1, 2, 4 y 8 µg/ml; después de la inoculación bacteriana las concentraciones disminuyen a la mitad (0.5, 1, 2 y 4 µg/ml). Se dispensó un volumen de 50 µl de las diluciones en una placa de 96 pocillos con fondo cónico, cuya distribución se muestra en el **Anexo 4**. Se guardaron las placas a -72 °C hasta su utilización (CLSI, 2022).

**Figura 7.**

*Protocolo de la preparación de la placa de tigeciclina*

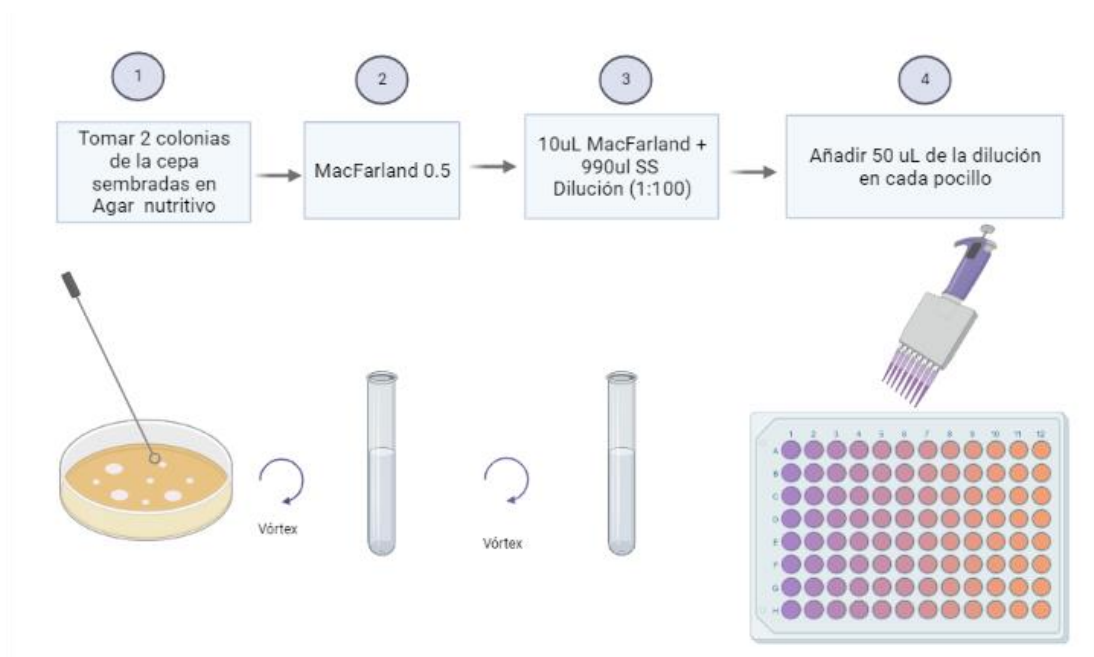


### 2.2.8. Inoculación bacteriana en las placas de tigeciclina

Se generó biomasa en agar nutritivo para la obtención de una suspensión bacteriana de 0,5 McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) en solución salina (SS) al 0,9%. Se diluyó a una relación 1:100 y se inoculó 50  $\mu$ L de la dilución en cada pocillo con distinta concentración del antibiótico. Se incubó las placas a  $35 \pm 2$  °C durante 16-20 horas. La lectura de los resultados se realizó con ayuda de un espejo invertido. Para la interpretación de los resultados de susceptibilidad a tigeciclina se utilizó los puntos de corte del EUCAST 2018 en base al “Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida y panresistentes”. La concentración mínima inhibitoria que define los puntos de corte para enterobacterias es  $\geq 4$   $\mu$ g/mL a aquellas consideradas resistentes, 2  $\mu$ g/mL para intermedias y finalmente  $\leq 1$   $\mu$ g/mL corresponde a sensibles (Jiménez et al., 2019).

**Figura 8.**

*Protocolo de preparación de placa de Tigeciclina*



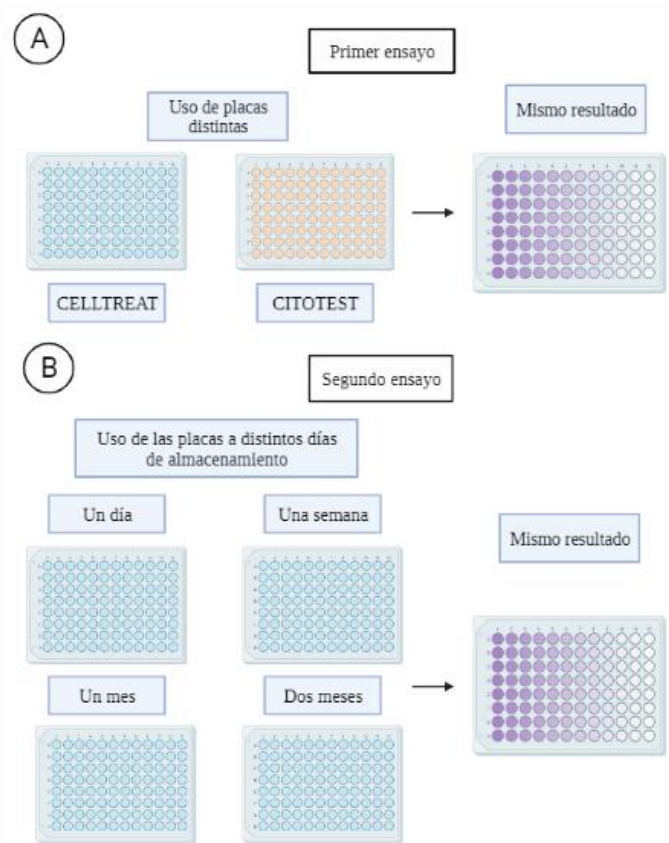
### 2.2.9. Implementación de la técnica microdilución de tigeciclina

Para la estandarización de la técnica de microdilución de tigeciclina, se evaluaron distintos ensayos bajo las mismas condiciones. En primer lugar, se prepararon 2 placas de tigeciclina tal y como lo indica el proceso 2.2.7, en donde se utilizó dos placas distintas. La primera pertenecía a la casa comercial CELLTREAT y la segunda fue CITOTEST, se inoculó el cultivo bacteriano y se incubó las placas al igual que como se describe en el apartado 2.2.8. Las cepas utilizadas fueron las siguientes: *Proteus sp.*, *Providencia*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *K. pneumoniae*. Ambas placas presentaron resultados similares por lo que la utilización de cualquiera de las dos resultaba válida (**Figura 9A**). Por otro lado, se prepararon 4 placas CELLTREAT como se describe en el apartado 2.2.7 y se almacenaron a -72 °C. La inoculación bacteriana de las 4 placas se realizó después de un día, 7 días, un mes y dos meses de almacenamiento respectivamente (**Figura 9B**).



**Figura 9.**

*Implementación de la técnica de microdilución de Tigeciclina.*



### 2.2.10. Interpretación de los perfiles fenotípicos

Se analizaron los perfiles fenotípicos de los antibióticos descritos en la **Tabla 8**. Las muestras se reportaron como sensibles (S), intermedias (I) o resistentes (R) de acuerdo con los puntos de corte del CLSI en base a su susceptibilidad a los distintos antibióticos analizados. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad fueron proporcionados en su mayoría por el CRN-RAM desde la base de datos WHONET 5.6. Las muestras que no contaban con estos datos fueron analizadas individualmente para completar su perfil fenotípico. Posteriormente, se elaboró un mapa de calor utilizando el software Multiexperiment Viewer (MeV). Mediante este programa se agrupó en Clústeres las muestras en base a su perfil fenotípico y sus semejanzas, finalmente, se generó un archivo NEWICK y se analizó posteriormente en el programa iTOL.

**Tabla 8.**  
*Clasificación de los antibióticos analizados*

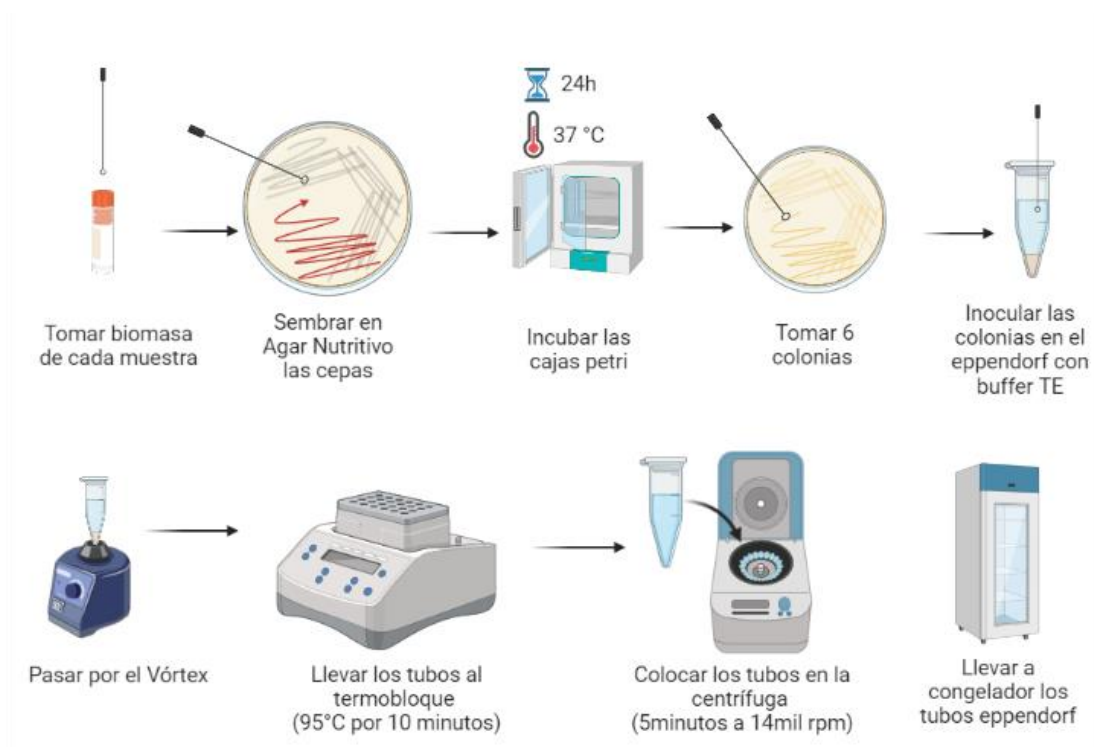
| <b>Familias de antibióticos</b> | <b>Antibióticos</b> | <b>Abreviatura</b> |
|---------------------------------|---------------------|--------------------|
|                                 | Cefotaxima          | CTX                |
|                                 | Ceftriaxona         | CRO                |
| Cefalosporinas                  | Ceftazidima         | CAZ                |
|                                 | Cefepime            | FEP                |
| Monobactámicos                  | Aztreonam           | ATM                |
|                                 | Meropenem           | MEM                |
| Carbapenémicos                  | Imipenem            | IPM                |
|                                 | Ertapenem           | ETP                |
| Fluoroquinolonas                | Ciprofloxacino      | CIP                |
|                                 | Gentamicina         | GEN                |
| Aminoglucósidos                 | Amikacina           | AMK                |
|                                 | Colistina           | COL                |

### **2.2.11. Extracción de ADN por ebullición**

Cada cepa del stock previamente criopreservadas se sembró en Agar Nutritivo y se incubó por 24 horas a 37 °C. Posteriormente se tomaron 6 colonias con ayuda de un asa desechable y se inoculó en un tubo eppendorf que contenía 500 µL de buffer TE, luego de esto, se homogenizó la suspensión bacteriana resultante en un vórtex. Los eppendorf fueron calentados en un Termobloque a 95 °C por 10 minutos, se centrifugó por 5 minutos a 14 000 rpm y se retiró el sobrenadante para luego almacenarlo a -12 °C (Tortora et al., 2007).

**Figura 10.**

*Protocolo de extracción de ADN*



### 2.2.12. Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR)

Se realizó la técnica de PCR convencional para la respectiva identificación de los genes de resistencia a tigeciclina *tetX*, *tet(X3)* y *tet(X4)*. Adicionalmente, se analizaron también los genes de resistencia a carbapenémicos *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* *bla<sub>IMP</sub>* y *bla<sub>OXA-48</sub>*. Los resultados de la identificación de los genes de resistencia a carbapenémicos fueron proporcionados en su mayoría por el CRN-RAM desde la base de datos WHONET 5.6. Las muestras que no contaban con datos de estos genes fueron analizadas individualmente para completar su perfil genotípico. Los primers utilizados están descritos en la **Tabla 9**.

Para la PCR se descongelaron las muestras de ADN y se homogenizaron en un vórtex. Se tomaron 100  $\mu$ L para realizar muestras compuestas entre cepas sensibles (S) e intermedias (I) agrupándolas en 7 y 3 muestras respectivamente. Mientras que las cepas resistentes (R) se analizaron individualmente. Dentro de una cabina de seguridad estéril se preparó la mezcla del Mastermix a una relación de 12,5  $\mu$ L x N, en donde N representa al número de muestras que se requiere amplificar, con ambos primers (Forward y Reverse) a una relación de 0,25  $\mu$ L x N cada uno, finalmente se añadió también agua destilada libre de nucleasas (ddH<sub>2</sub>O) a una relación de 10,75  $\mu$ L x N. Se homogenizó la mezcla de PCR y se procedió a añadir 1,25  $\mu$ L de la muestra de ADN individual o compuesta. Se añadió 25  $\mu$ L de aceite mineral, en la superficie de la mezcla, sin necesidad de mezclar. Finalmente se colocaron las muestras en el termociclador PCR Multigene Optimax bajo las condiciones respectivas.

**Tabla 9.**

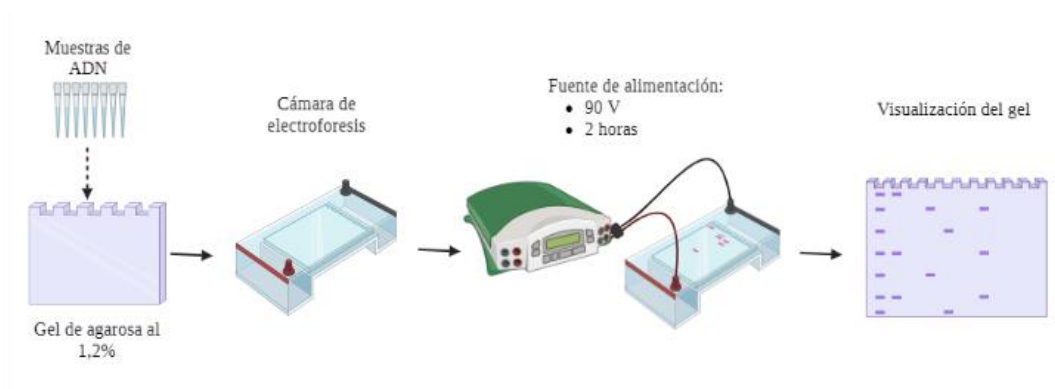
*Secuencia de los Primers a utilizar*

| Gen                         |   | Secuencia               | Producto de PCR (bp) | Referencia             |
|-----------------------------|---|-------------------------|----------------------|------------------------|
| <i>tetX</i>                 | F | TTCAGGTCAGGAAGCAATGAAAA | 780                  | Hsieh et al.,<br>2021  |
| general                     | R | TTTACGCCTTGTCCTGCAAAAGG |                      |                        |
| <i>tet(X3)</i>              | F | TAATGGCGGGACATCAGG      | 294                  | He et al.,<br>2019     |
|                             | R | AGGCGACATCAAATGAGCAG    |                      |                        |
| <i>tet(X4)</i>              | F | TTAGCCTTACCAATGGGTGT    | 328                  | He et al.,<br>2019     |
|                             | R | CAAATCTGCTGTTTCACTCG    |                      |                        |
| <i>bla<sub>NDM</sub></i>    | F | GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC   | 621                  | Poirel et al.,<br>2011 |
|                             | R | CGGAATGGCTCATCACGATC    |                      |                        |
| <i>bla<sub>VIM</sub></i>    | F | GATGGTGTGGTTCGCATA      | 390                  | Poirel et al.,<br>2011 |
|                             | R | CGAATGCGCAGCACCAG       |                      |                        |
| <i>bla<sub>KPC</sub></i>    | F | CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG    | 798                  | Poirel et al.,<br>2011 |
|                             | R | CTTGTCATCCTTGTTAGGCG    |                      |                        |
| <i>bla<sub>IMP</sub></i>    | F | GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC | 232                  | Poirel et al.,<br>2011 |
|                             | R | GGTTTAAAYAAAACAACCACC   |                      |                        |
| <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> | F | GCGTGGTTAAGGATGAACAC    | 438                  | Poirel et al.,<br>2011 |
|                             | R | CATCAAGTTCAACCCAACCG    |                      |                        |

### 2.2.13. Electroforesis

Se tomó 10  $\mu$ L del producto de PCR y se mezcló con BlueJuice Gel Loading Buffer sobre Parafilm. Se cargaron las muestras en los pocillos del gel de agarosa al 1.2%. Se conectó los electrodos y se encendió la fuente de alimentación Enduro Power Supplies a 90 V por dos horas.

**Figura 11.**  
*Protocolo de electroforesis*



## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3. 1. Análisis y discusión de los resultados

##### 3.1.1. Descripción general de la población

En la presente investigación se analizaron 376 microorganismos identificados como *K. pneumoniae* en el CRN-RAM, los cuales corresponden al periodo 2020 – 2021. Estos fueron seleccionados empleando los criterios de inclusión y exclusión ya mencionados. Previo al presente estudio cada aislamiento fue caracterizado a través de pruebas fenotípicas y genotípicas y almacenado a -80 °C para formar parte de la colección del CRN-RAM.

En la **Tabla 10** se agrupan las variables clínico-epidemiológicas obtenidas de la base de datos WHONET 5.6, entre las cuales se observa el género, la edad, el año, el tipo de muestra, el diagnóstico del paciente y el tipo de servicio; cada una con su respectiva frecuencia. Es importante señalar que no se tomó en cuenta los aislados pertenecientes a pacientes pediátricos y adolescentes, razón por la cual la edad se clasificó en tres grupos: adulto mayor (mayor a 60 años), adulto medio (45-59 años) y adulto joven (18-44 años). Cabe recalcar que el 100 % de todos los aislamientos analizados en este estudio provienen de las unidades de cuidados intensivos (UCI) de la red de hospitales del Ecuador.

**Tabla 10.***Caracterización de la población de acuerdo con las variables epidemiológicas*

| n=376                         | <i>f</i> | %     |
|-------------------------------|----------|-------|
| <b>GÉNERO</b>                 |          |       |
| Hombres                       | 284      | 75.53 |
| Mujeres                       | 92       | 24.47 |
| <b>EDAD</b>                   |          |       |
| Adulto mayor                  | 198      | 52.65 |
| Adulto medio                  | 112      | 29.79 |
| Adulto joven                  | 66       | 17.56 |
| <b>AÑO</b>                    |          |       |
| 2020                          | 192      | 51.06 |
| 2021                          | 184      | 48.94 |
| <b>TIPO DE MUESTRA</b>        |          |       |
| Aspirado traqueal             | 133      | 35.37 |
| Traqueal                      | 243      | 64.63 |
| <b>DIAGNÓSTICO</b>            |          |       |
| COVID-19                      | 200      | 53.19 |
| Cáncer                        | 12       | 3.19  |
| Infección respiratoria        | 80       | 21.27 |
| Traumatismo                   | 8        | 2.12  |
| Cerebrovasculares             | 11       | 2.92  |
| Enfermedad cardiovascular     | 35       | 9.30  |
| Infección del tracto urinario | 2        | 0.53  |
| Otros                         | 28       | 7.44  |
| <b>TIPO DE SERVICIO</b>       |          |       |
| Unidad de Cuidados Intensivos | 376      | 100   |

Durante el periodo 2020-2021 los servicios hospitalarios, se vieron afectados directamente por la propagación de COVID-19. Dentro del Ecuador el primer caso se registró el 29 de febrero del 2020, después de este acontecimiento la intensificación de las acciones de vigilancia epidemiológica se elevó con la finalidad de controlar la propagación (**Ministerio de Salud Pública, 2020**). Los aislamientos analizados en este estudio provienen de diferentes hospitales del Ecuador.

Como se observa en la **Tabla 10** el género masculino tiene mayor frecuencia con respecto al género femenino, con un porcentaje de 75,53% y 24,46% respectivamente. De forma global, se ha identificado una mayor probabilidad de ingresos a las UCIs por parte del género masculino en una relación de 3:1 en comparación al femenino (**Chaturvedi et al., 2022**). Esto se podría deber a que los hombres no producen una respuesta inmunitaria tan elevada como las mujeres y poseen cierta dificultad para activar una respuesta inmune de las células T a comparación de las mujeres que tienen una facilidad mayor de activar este tipo de células (**Çelik et al., 2020**).

En el contexto de la pandemia ocasionada por el COVID-19 a nivel global, se observó una relación directa entre la frecuencia de ingresos en UCI con la edad, evidenciándose una mayor probabilidad de presentar casos graves en rangos etarios superiores (**Starke et al., 2021**). Adicionalmente, un metaanálisis evidenció que los adultos mayores son más propensos a adquirir infecciones causadas por *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos en el contexto de la pandemia de COVID-19 en comparación con otros rangos de edad (**Medrzycka et al., 2021**). Esto se evidencia en la **Tabla 10**, en donde se observa una frecuencia alta de aislados pertenecientes a adultos mayores (52,65%), seguido del 29,79% que corresponde a los adultos medios y el 17,56% pertenece a los adultos jóvenes.



El diagnóstico clínico que prevaleció en las UCI del Ecuador durante los años 2020 y 2021 fue el COVID-19 y otras enfermedades respiratorias superando a las demás clasificadas como cáncer, traumatismos, patologías cerebrovasculares, infecciones del tracto urinario y otras. En las **Figuras 18-21** se describen las patologías clínicas y variables epidemiológicas correspondientes a cada aislamiento analizado, así como el género, el año, la provincia y el perfil fenotípico de susceptibilidad a varios antibióticos.

Por otro lado, la mayoría de las enfermedades nosocomiales producto de infecciones por microorganismos multirresistentes ocurren en las UCIs, debido a que los pacientes que se encuentran en este servicio requieren de un elevado número de procedimientos invasivos. Este factor de riesgo sumado al uso prolongado e intensivo de una alta gama de antibióticos, contribuyen a la diseminación y evolución de diversos mecanismos de resistencia antimicrobiana en entornos hospitalarios (**Saharman et al., 2021**). Otro factor importante para considerar es el notable aumento en el uso de antibióticos desde el inicio de la pandemia ocasionada por el COVID-19 (**Langford et al., 2022**). Estos hallazgos sugieren la necesidad de evaluar los patrones de resistencia antimicrobiana en aislamientos de relevancia clínica en el país, influenciados dentro del contexto de la pandemia.

### **3.1.2. Análisis de la resistencia fenotípica a la tigeciclina en *K. pneumoniae* mediante ensayos de microdilución**

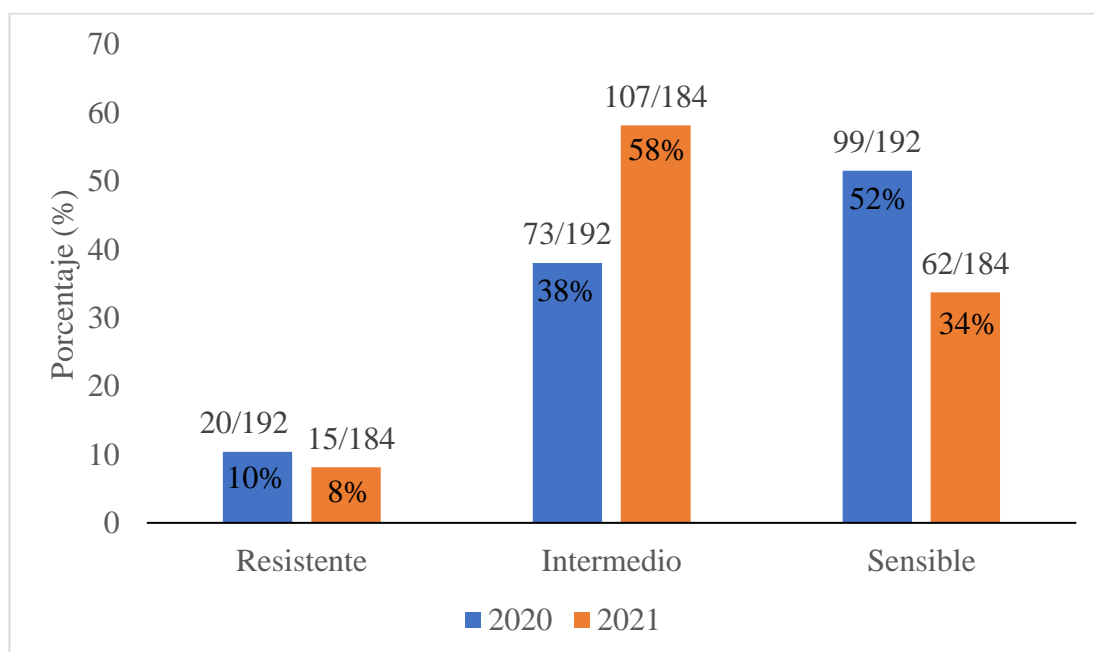
La determinación de la susceptibilidad a tigeciclina requiere de métodos confiables y reproducibles. Sin embargo, los métodos de determinación de susceptibilidad de rutina presentan problemas metodológicos al evaluar la tigeciclina (**Yin et al., 2021**). La concentración de iones y de oxígeno en el medio de cultivo puede afectar la actividad *in vitro* de la tigeciclina (**Ni et al., 2016**). Por tal razón las pruebas comerciales de susceptibilidad como E-test, difusión en disco e incluso los métodos sistematizados como Vitek 2 y Sensititre no son considerados totalmente confiables y

a menudo muestran resultados falsos intermedios o falsos resistentes a tigeciclina. El método de microdilución en caldo, por el contrario, es considerado como *gold standard* para medir con precisión la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*, incluso para la tigeciclina (Yin et al., 2021; Zhang et al., 2015).

Para esta técnica se realizaron ensayos de reproducibilidad en distintos días, operadores y placas de microdilución, bajo condiciones óptimas de esterilidad. Para los controles, se utilizaron una cepa de *E. coli* ATCC 25922 como sensible a tigeciclina y una cepa de *K. pneumoniae* perteneciente a la colección del CRN-RAM como resistente a dicho antibiótico. La interpretación de los resultados de susceptibilidad a tigeciclina bajo las distintas condiciones se mantuvo constante durante la ejecución experimental de esta investigación.

**Figura 12.**

*Perfil de susceptibilidad a tigeciclina en muestras de K. pneumoniae obtenidas en el periodo 2020-2021*



En la **Figura 12** se observa un total de 192 cepas viables para el 2020 y 184 para el 2021. Se evidenció un notable aumento en el número de aislados con susceptibilidad intermedia a tigeciclina en el 2020 – 2021, mientras que, por el contrario, los aislados sensibles al antibiótico disminuyeron notablemente dentro de este periodo. Por otro lado, el porcentaje de aislados resistentes tuvo una ligera disminución. En el Ecuador no existe reportes de investigaciones de susceptibilidad a tigeciclina en *K. pneumoniae*, sin embargo, a nivel de Latinoamérica mediante el Programa de Vigilancia Antimicrobiana (SENTRY) se evidenció la ausencia de cepas de *K. pneumoniae* resistente a tigeciclina en el periodo 2020 – 2021 (**SENTRY, 2023**).

La tasa de susceptibilidad al antibiótico en Latinoamérica es bastante alta, con niveles del 98,4 % en el 2020 y 2021, mientras que, el porcentaje restante corresponde a muestras con susceptibilidad intermedia. En Europa, por el contrario, si se evidenció resistencia a tigeciclina ya que el 0,4 % de 2279 (9/2279) cepas de *K. pneumoniae*, presentaron este perfil; es importante mencionar que estos análisis fueron interpretados utilizando los puntos de corte reportados por la Food and Drug Administration (FDA), los cuales son más altos que los puntos de corte del EUCAST 2018 utilizados en nuestro estudio (**SENTRY, 2023**).

En un estudio de revisión sistemática y metaanálisis centrado en aislados de *K. pneumoniae* a partir de pacientes con infecciones del torrente sanguíneo, detectaron un porcentaje promedio del 5.1% de cepas resistentes a tigeciclina en siete países (Brasil, China, India, Pakistán, Perú, Corea del Sur y Tailandia) (**Uzairue et al., 2022**). Por otra parte, en un estudio retrospectivo de 5 años atrás en Europa, de un total de 466 cepas se obtuvo un nivel máximo de sensibilidad a tigeciclina en las cepas de *K. pneumoniae* (**Santella et al., 2021**). Por otro lado, en un estudio realizado en pacientes neutropénicos en Egipto, *K. pneumoniae* muestra un nivel de resistencia a tigeciclina del 39.1%, tomando datos de pacientes pertenecientes a las UCIs (**Elgendy et al., 2018**). De forma general, los porcentajes de resistencia en los aislamientos de *K. pneumoniae* presentan considerables variaciones a nivel geográfico y temporal.

### 3.1.3. Determinación de la presencia de genes de resistencia a tigeciclina y carbapenémicos mediante PCR

**Tabla 11.**

*Perfil genético de resistencia en muestras de K. pneumoniae pertenecientes al periodo 2020-2021*

| Gen                        | Muestras Positivas | Muestras Negativas |
|----------------------------|--------------------|--------------------|
| <i>tetX</i> (general)      | 0 (0%)             | 376 (100%)         |
| <i>tet(X3)</i>             | 0 (0%)             | 376 (100%)         |
| <i>tet(X4)</i>             | 0 (0%)             | 376 (100%)         |
| <i>bla<sub>KPC</sub></i>   | 370 (98.40%)       | 6 (1.5%)           |
| <i>bla<sub>VIM</sub></i>   | 1 (0.26%)          | 375 (99.73%)       |
| <i>bla<sub>IMP</sub></i>   | 1 (0.26%)          | 375 (99.73%)       |
| <i>bla<sub>NDM</sub></i>   | 1 (0.26%)          | 375 (99.73%)       |
| <i>bla<sub>OXA48</sub></i> | 0 (0%)             | 376 (100%)         |

El uso clínico de la tigeciclina está comprometido por la aparición y la rápida diseminación de los genes *tetX* y sus ortólogos, representando una amenaza grave para el sistema de salud pública. En la actualidad algunas de las variantes móviles del gen *tetX* se encuentran ya distribuidas a nivel global, identificadas en 16 países de 4 continentes (Europa, Asia, África y América). La difusión de los ortólogos del *tetX* estuvo dominada por *tet(X2)*, *tet(X3)* y *tet(X4)*, los dos últimos corresponden a las variantes asociadas al más alto nivel de resistencia a tigeciclina (**R, Zhang et al., 2021**).

En Latinoamérica, se han detectado solamente los genes *tetX*, *tet(X1)* y *tet(X2)* distribuidos en Chile, Perú y Colombia, sin embargo, cabe recalcar que la mayoría de estos genes son de origen animal (**Fang et al., 2020**). En un estudio retrospectivo en China, se evidenció que la tasa de detección de *tet(X3)* y *tet(X4)* en aislamientos de origen animal fue del 6,9 % (73/1060), mientras que, la tasa de detección de ambos genes en aislamientos clínicos fue del 0,32% (4/1250). Estos genes fueron detectados

principalmente en *A. baumannii* y *E. coli*. Por otro lado, los genes en *K. pneumoniae* de origen clínico solo se han informado esporádicamente (**He et al., 2019; Zhang et al., 2020**).

En el presente estudio se utilizó una pareja de primers específicos para 14 variantes del gen *tetX*, y de forma individual para las variantes de interés *tet(X3)* y *tet(X4)* (**Hsieh et al., 2021**). En este estudio no se encontró ningún aislamiento de la colección evaluada que porte alguna variante del gen *tetX*, a pesar de esto, se detectó 35 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a dicho antibiótico (**Tabla 11**). A parte de la degradación enzimática que producen los genes *tetX*, existen otros mecanismos de resistencia como las bombas de eflujo y las mutaciones en sitios de unión al ribosoma que confieren resistencia a tigeciclina (**Linkevicius et al., 2016; Sun et al., 2013; Zhang et al., 2020**).

En las bacterias Gram negativas como *K. pneumoniae*, la sobreexpresión de bombas de salida de tipo Resistencia-Nodulación-División celular (RND) están asociadas con una alta tasa de resistencia a tigeciclina. Las bombas de eflujo AcrAB y OqxAB suelen ser el principal mecanismo de resistencia a tigeciclina codificadas en el cromosoma (**Beabout et al., 2015; Chiu et al., 2017**). Estas bombas se encuentran controladas por los reguladores RamR – RamA y OqxR – RarA respectivamente, por lo que las mutaciones en estos reguladores pueden conducir a la sobreexpresión de las bombas de eflujo. Finalmente, las mutaciones en *rpsJ* que codifica la proteína ribosomal S10 también están asociadas a la resistencia a la tigeciclina debido a que impiden la unión del antibiótico con el (**Beabout et al., 2015; Wang et al., 2015; X, Zhang et al., 2021**).

A pesar de que no se han detectado variantes de *tetX* en las muestras evaluadas, las mismas poseen fenotipos y genotipos de resistencia antimicrobiana considerados de alto interés epidemiológico. De acuerdo al listado de microorganismos de investigación prioritaria de la Organización Mundial de la Salud, se categoriza a las enterobacterias resistentes a carbapenémicos como de importancia crítica (**World Health Organization, 2017**). Por lo tanto, el aumento de la resistencia a los

carbapenémicos en Enterobacterales representa una amenaza para la salud pública global; en las últimas décadas, este aumento de la resistencia a los carbapenémicos ha sido causado por la diseminación mundial de *Enterobacteriaceae* productores de carbapenemasas (CPE) (Tesfa et al., 2022). Desafortunadamente, la colección evaluada en este estudio presenta elevados niveles de resistencia a antibióticos carbapenémicos, los cuales podrían comprometer el sistema sanitario del país, considerando que los porcentajes de resistencia global a carbapenémicos en aislados de *K. pneumoniae* de tipo clínico en la mayoría de los países europeos oscilan al 10% (ECDC, 2023).

Las infecciones causadas por *K. pneumoniae* pueden resultar difíciles de tratar dependiendo el mecanismo de resistencia que posea. Uno de los más comúnmente encontrados en *K. pneumoniae* es del tipo carbapenemasa (KPC) (Perrotta & Perrini, 2021). Las KPC representan un mecanismo de resistencia clínicamente significativo y notable debido a su potencial diseminación; además, no suelen ser detectadas mediante ensayos de susceptibilidad rutinarios (Arnold et al., 2011). En la *Tabla 10* se destaca el elevado número de muestras positivas para el gen *bla<sub>KPC</sub>*, ya que, de un total de 376 muestras analizadas, únicamente 6 no contienen el gen. La importancia del gen *bla<sub>KPC</sub>* radica en la amplia diseminación de la resistencia a carbapenémicos debido a su ubicación en más de un plásmido (Ghasemnejad et al., 2019).

Por otro lado, las carbapenemasas de tipo NDM son más prevalentes en *E. coli* que en *K. pneumoniae* (Han et al., 2020; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2017). De igual forma, las cepas de *K. pneumoniae* productoras de NDM se distribuyen en la mayoría de las áreas de África, en la región europea, Asia y Norteamérica. También se ha informado que existe más prevalencia de cepas productoras de NDM en pacientes pediátricos (Alhazmi et al., 2022; Han et al., 2020).

Al igual que las cepas productoras de NDM, la distribución de *K. pneumoniae* productora de OXA-48 se extiende principalmente por Europa, el Mediterráneo y

Oriente Medio (**Pitout et al., 2019**). De igual manera, a pesar de que el gen *bla*<sub>OXA-48</sub> tiene una alta capacidad de diseminación incluso entre diferentes especies de enterobacterias con mucha más frecuencia que las carbapenemasas KPC y NDM, en nuestro estudio no se ha reportado cepas de *K. pneumoniae* con dicho gen (**Erdem et al., 2019**). Del mismo modo, en Sudamérica las carbapenemasas de tipo VIM, IMP y NDM se encuentran distribuidas mayoritariamente en Brasil, Argentina, Perú, Colombia y Venezuela, independientemente de la especie bacteriana (**Escandón et al., 2016**).

Es importante mencionar que los aislados productores de IMP y VIM presentan a la vez producción de KPC. Por lo general los microorganismos productores de carbapenemasas presentan un solo tipo de genes de resistencia a los carbapenémicos, sin embargo, se han informado organismos con múltiples carbapenemasas. **Martínez et al. (2020)** informaron de 4 casos de pacientes con infecciones por cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas dobles (NDM + KPC) en Venezuela. A pesar de que en nuestro estudio no se informan cepas con esta combinación de carbapenemasas, es importante mencionar que los aislados de los pacientes venezolanos pertenecían a la UCI al igual que los aislados analizados en la presente investigación. Esta característica en común es considerada un factor de riesgo para adquirir infecciones nosocomiales por bacterias multirresistentes (**Nordmann et al., 2011; Pitout et al., 2015**).

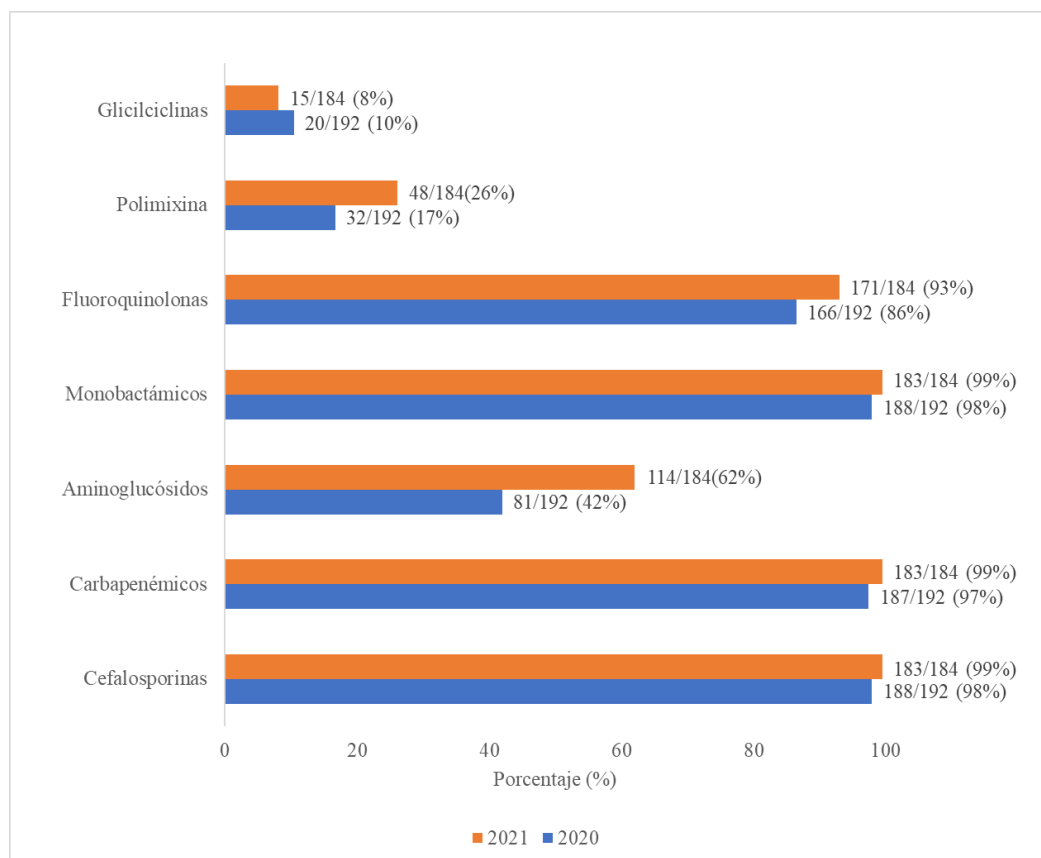
Las muestras 149 y 37 son coproductoras de doble carbapenemasas, ambas con distintas combinaciones (KPC + VIM y KPC + IMP, respectivamente). El perfil de susceptibilidad de la muestra 149 se observa en el clúster 7 o C7 (**Figura 19**). Esta muestra presenta resistencia a la mayoría de los antibióticos analizados incluidos todos los  $\beta$ -lactámicos. Sin embargo, es susceptible a amikacina, a tigeciclina y presenta una susceptibilidad intermedia a colistina. **Meletis et al. (2010)** reportaron un aislado de *K. pneumoniae* portador de los genes *bla*<sub>VIM</sub> y *bla*<sub>KPC</sub> resistente a una gran variedad de antibióticos excepto a la gentamicina. Los aminoglucósidos como la gentamicina y la amikacina están asociados a tratamientos exitosos por su rápida actividad bactericida contra aislados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos (**Shields et al., 2016**).

Al igual que la cepa 149, la muestra 37 presenta un patrón similar de susceptibilidad como se observa en el clúster 15 o C15 (**Figura 20**). Esta presenta sensibilidad a tigeciclina y susceptibilidad intermedia a gentamicina, amikacina y colistina mientras que para el resto de los antibióticos es resistente. **Wang et al. (2012)** reportaron un aislado de *K. pneumoniae* coproductor de la misma combinación de carbapenemasas que presentó resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos, mientras que fue sensible a ciprofloxacina, colistina y tigeciclina, siguiendo un patrón similar a la muestra 37 de nuestro estudio.

### 3.1.4. Comparación de los perfiles de resistencia a diversos antibióticos en aislados de *K. pneumoniae* pertenecientes al CRN-RAM

**Figura 13.**

*Frecuencia de aislamientos con resistencia a distintas familias de antibióticos*





*K. pneumoniae* forma parte de los organismos ESKAPE de vigilancia prioritaria de la OMS (**World Health Organization, 2017**). En el Ecuador según el último reporte emitido por el Ministerio de Salud Pública en el 2018 *K. pneumoniae* junto a *E. coli* han mostrado resistencia a una alta gama de antibióticos; no obstante, a raíz de la pandemia por SARS-CoV-2, el Programa de Vigilancia Antimicrobiana del país no ha reportado si existe o no una evolución de la resistencia a antimicrobianos de uso clínico por parte de estas bacterias (**Ministerio de Salud, 2018**). Por tal motivo es importante evaluar la resistencia a distintos antibióticos en distintos años.

En la **Figura 13** se observa el perfil de resistencia a las diferentes familias de antibióticos en el 2020 y 2021. El porcentaje de muestras resistentes a carbapenémicos aumentó del 97 al 99%. A pesar de que no es notable la diferencia, en un año casi se alcanzó el 100% en la frecuencia de aislamientos resistentes a estos antibióticos. Las cefalosporinas, las fluoroquinolonas y los monobactámicos presentaron un nivel de resistencia similar a los carbapenémicos. Con respecto a los aminoglucósidos, las cepas resistentes incrementaron notablemente desde el 2020 al 2021, con un porcentaje de 42 % y 62 %, respectivamente. Finalmente, las polimixinas y las gliciliclinas poseen una tasa baja de resistencia y ambas se mantuvieron relativamente constantes en el periodo evaluado.

La resistencia a la familia de las cefalosporinas ha ido evolucionando con el tiempo, en España un estudio muestra que en el 2010 obtuvo una resistencia del 9.8 % que aumento a 19 % en el 2014 (**Aracil et al., 2017**). Del mismo modo revela un incremento en el porcentaje de resistencia a cefalosporinas en aislamientos de *K. pneumoniae* del 4 % al 8.5 % en el periodo 2009- 2019 (**Renggli et al., 2022**).

La Organización Mundial de la Salud en el 2014 informó que *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos se ha diseminado a nivel mundial, dándose un aumento del 50 % en las tasas de resistencia, provocando altos índices de mortalidad en pacientes hospitalarios (**Vera et al., 2017**). En China, un estudio retrospectivo muestra que la tasa de detección de los Enterobacterales resistentes a carbapenémicos tiene una alta prevalencia que puede llegar hasta un 30,2% según la región (**Duan et al., 2022**).

Es importante mencionar que la tasa de detección de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos depende mucho de las variaciones geográficas y temporales, al igual que el estado del paciente y el tipo de muestra de donde se obtuvo.

La resistencia a colistina es mayor en países del Mediterráneo y sudeste asiático con un 10 % de bacterias gramnegativas resistentes (**Silva et al., 2022**). En el caso de Sudáfrica y Japón el uso de los antibióticos de esta familia está restringido; mientras que en Nigeria se ha informado tasas de resistencia de al menos el 10% (**Williams et al., 2018**). Un estudio en Italia muestra una tendencia creciente en la resistencia a colistina llegando a encontrarse hasta un 43 % de cepas resistentes entre el 2013 y el 2014; por otro lado, en España entre el 2010 y el 2012 se observó una prevalencia del 22% de cepas resistentes a este antibiótico (**Wang et al., 2022**).

Diferentes estudios han detectado cepas de *K. pneumoniae* resistente a aminoglucósidos. En China, se identificó que la bacteria posee porcentajes de resistencia a amikacina y gentamicina de 22.1 % y 59.7 %, respectivamente, cuando las cepas son capaces de producir betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y porcentajes de 12.9 % (AMK) y 17.6 % (GEN) en bacterias no productoras de estas enzimas (**Liang et al., 2015**). En Qazvin y Tehran, provincias de Irán se detectaron aislados no susceptibles a aminoglucósidos en un 74 % (**Nasiri et al., 2018**). De la misma forma, en China un estudio desde el 2015 al 2017 evaluó aislados obtenidos de muestras de orina, esputo, sangre, secreciones y pus, donde se observó una tasa de detección de *K. pneumoniae* resistente a gentamicina de hasta el 14.73 % y en amikacina la tasa llegó hasta el 9,93 % (**Q, Zhang et al., 2021**).

En lo referente a la familia de las fluoroquinolonas, *K. pneumoniae* ha mostrado una creciente resistencia a ciprofloxacina. En pacientes hospitalizados en Hamadan al este de Irán se obtuvo un total de 100 aislados de muestras de orina, tráquea, sangre, heridas, fluido cerebroespinal, fluidos pleurales y lavados gástricos los cuales

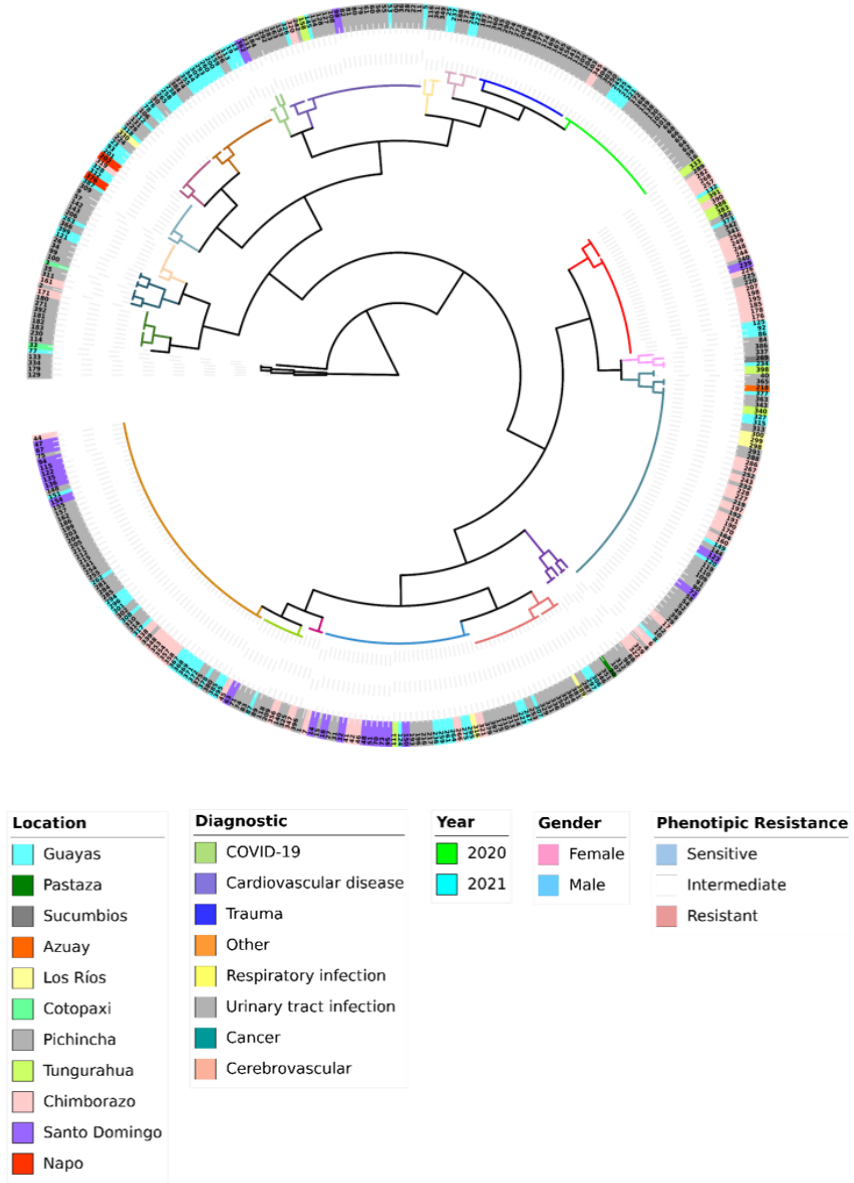
mostraron resistencia a ciprofloxacina con un 89 % y a levofloxacina con un 81 % (**Amereh et al., 2023**). Por otro lado, en la India un estudio realizado desde el 2014 al 2015 en centros de atención médica terciaria se obtuvo 110 aislados de los cuales el 88 % fue resistentes a ciprofloxacina (**Venkataramana et al., 2020**). De la misma forma, en China un estudio en 11 hospitales recogió muestras asociadas con infecciones del torrente sanguíneo desde el 2015 al 2018 obteniéndose 149 aislados de *K. pneumoniae* de los cuales el 78.5 % mostró resistencia a ciprofloxacina a causa de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* (**Zhan et al., 2021**).

En el caso de la familia de los monobactámicos (Aztreonam) las bacterias productoras de BLEE pueden conferir resistencia a estos antibióticos y a las cefalosporinas, se observó que en algunas zonas de Asia aztreonam mostraba una tasa de resistencia del 73.3% (**Choby et al., 2020**). Considerando que *K. pneumoniae* es capaz de expresar betalactamasas y carbapenemasas es necesario que este antibiótico sea administrado en combinación como aztreonam/avibactam, meropenem/vaborbactam y aztreonam; esto con el fin de crear nuevas estrategias terapéuticas a enfermedades asociada a esta bacteria (**Belati et al., 2022; Perrotta & Perrini, 2021**).

En la familia de las gliciliclinas (tigeciclina), *K. pneumoniae* es capaz de adquirir resistencia a este antibiótico, aunque los pacientes no hayan tenido exposición previa al mismo; no obstante, la exposición a tigeciclina puede ser un factor de riesgo para desarrollar resistencia a dicho antibiótico (**Chiu et al., 2017; Park et al., 2020**). Dado que este antibiótico es considerado una de las opciones de tratamiento aptas para enterobacterias multirresistentes se ha convertido en uno de los pocos antibióticos de último recurso que se emplean para diferentes infecciones causadas por bacterias MRD (**Du et al., 2018**). Se ha demostrado que tigeciclina puede superar distintos mecanismos de resistencia a tetraciclina, como el mecanismo de protección de ribosomas y de flujo de salida (**Jenner et al., 2013**).

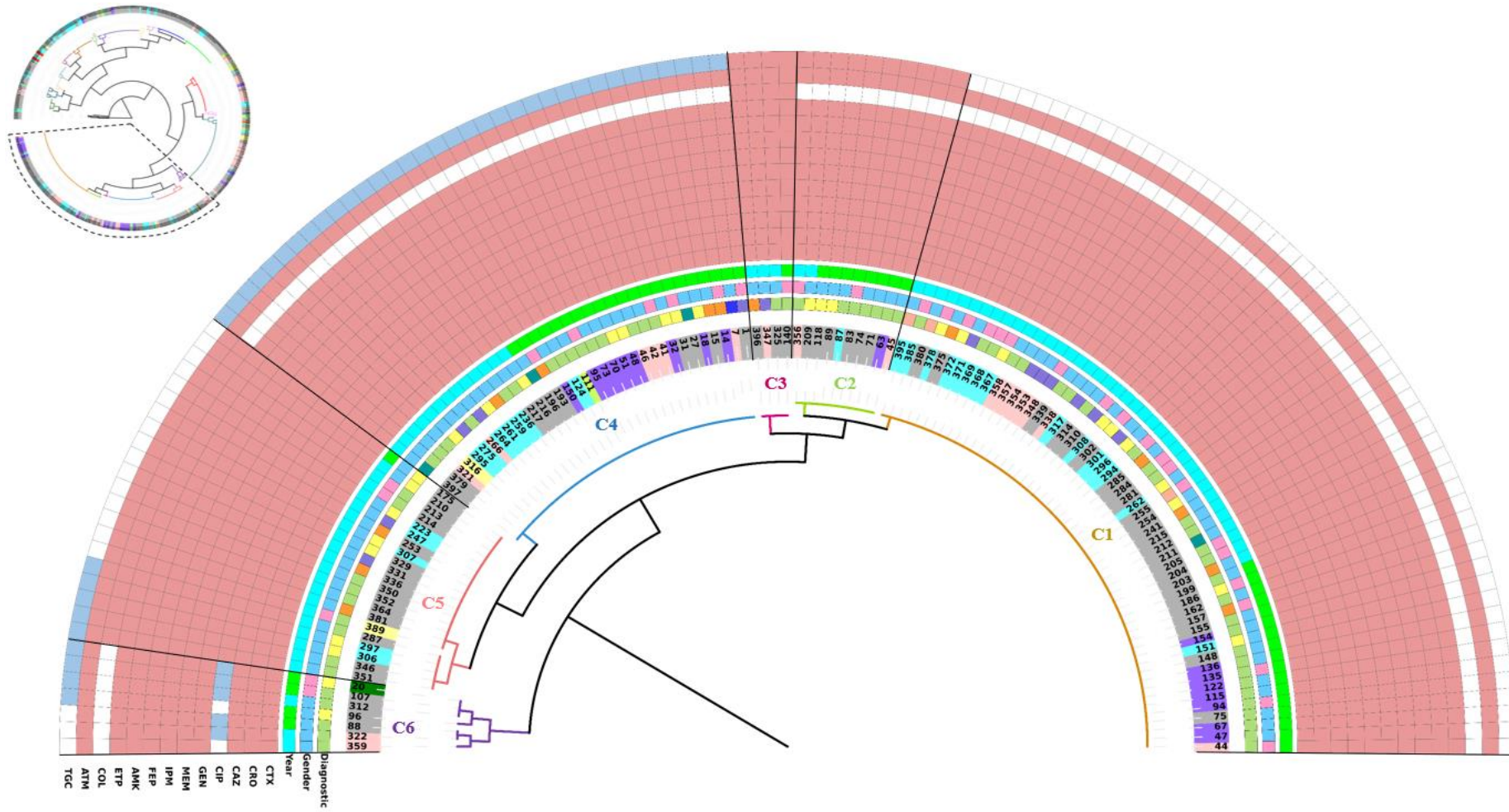
**Figura 14.**

*Dendrograma de la correlación de las variables epidemiológicas y perfiles de resistencia fenotípicos de K. pneumoniae y sus etiquetas*



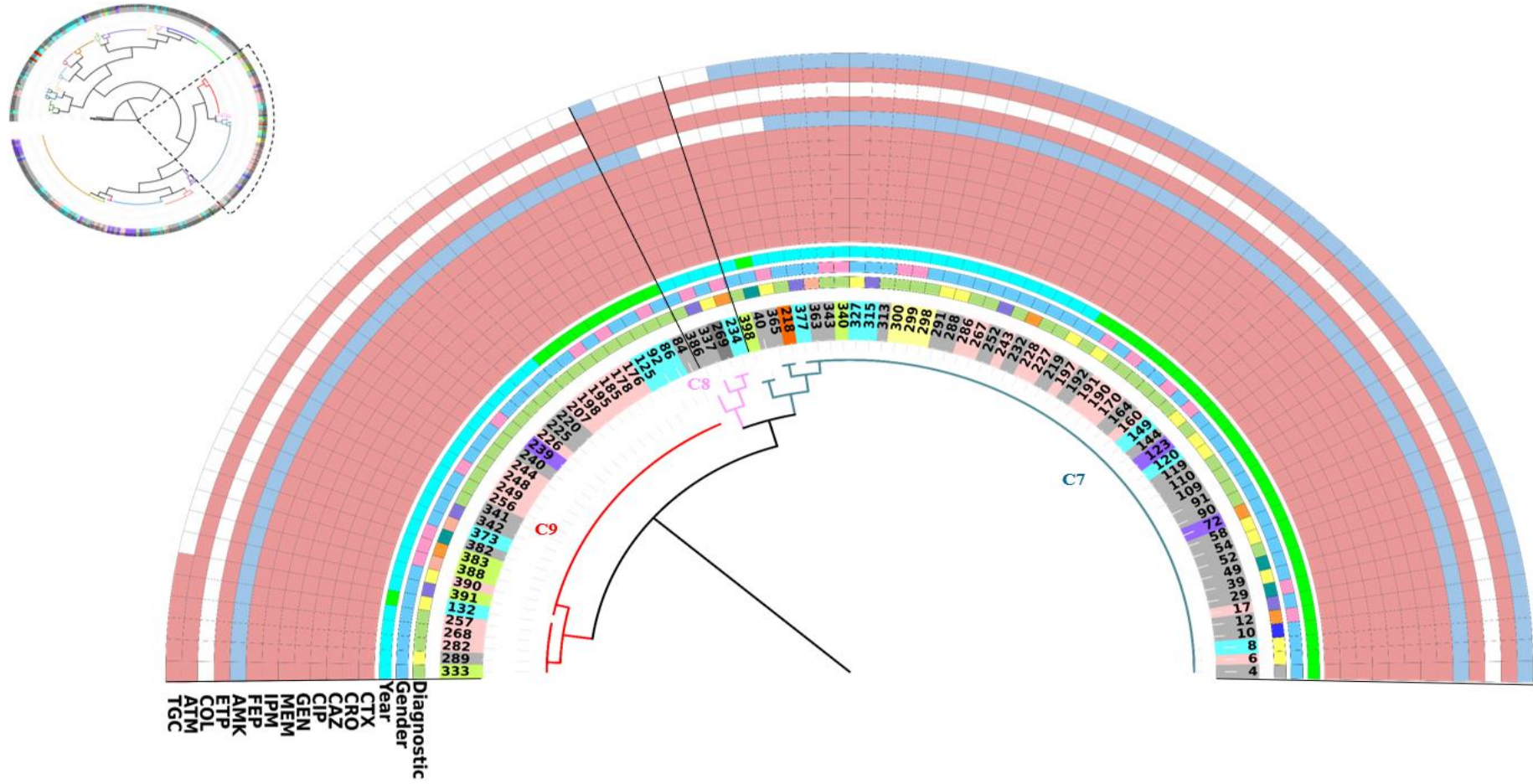
**Figura 15.**

*Dendrograma de la correlación de variables epidemiológicas y perfiles de resistencia fenotípicos de K. pneumoniae (Clúster 1-6)*



**Figura 16.**

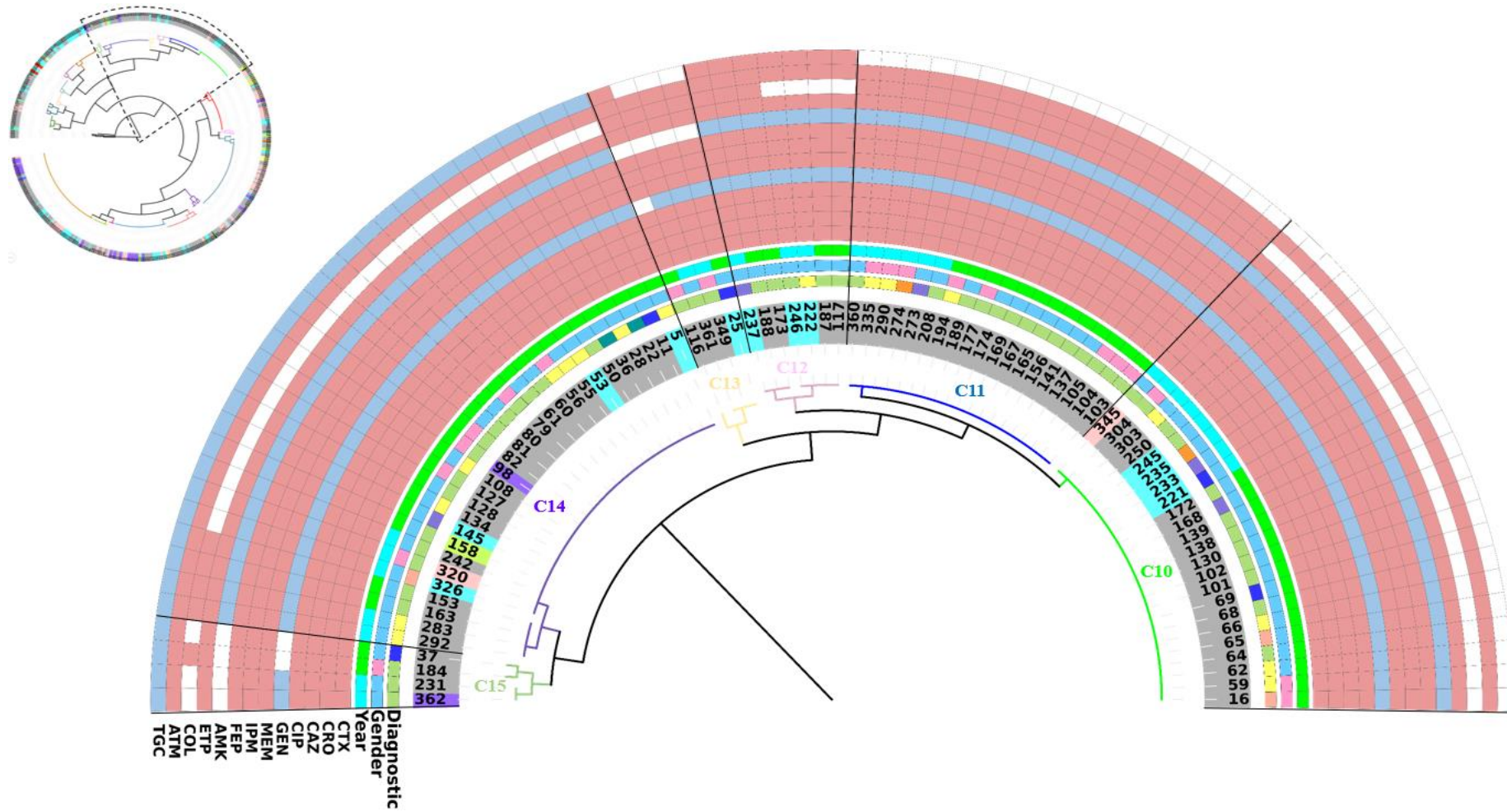
*Dendrograma de la correlación de variables epidemiológicas y perfiles de resistencia fenotípicos de K. pneumoniae (Clúster 7-9)*





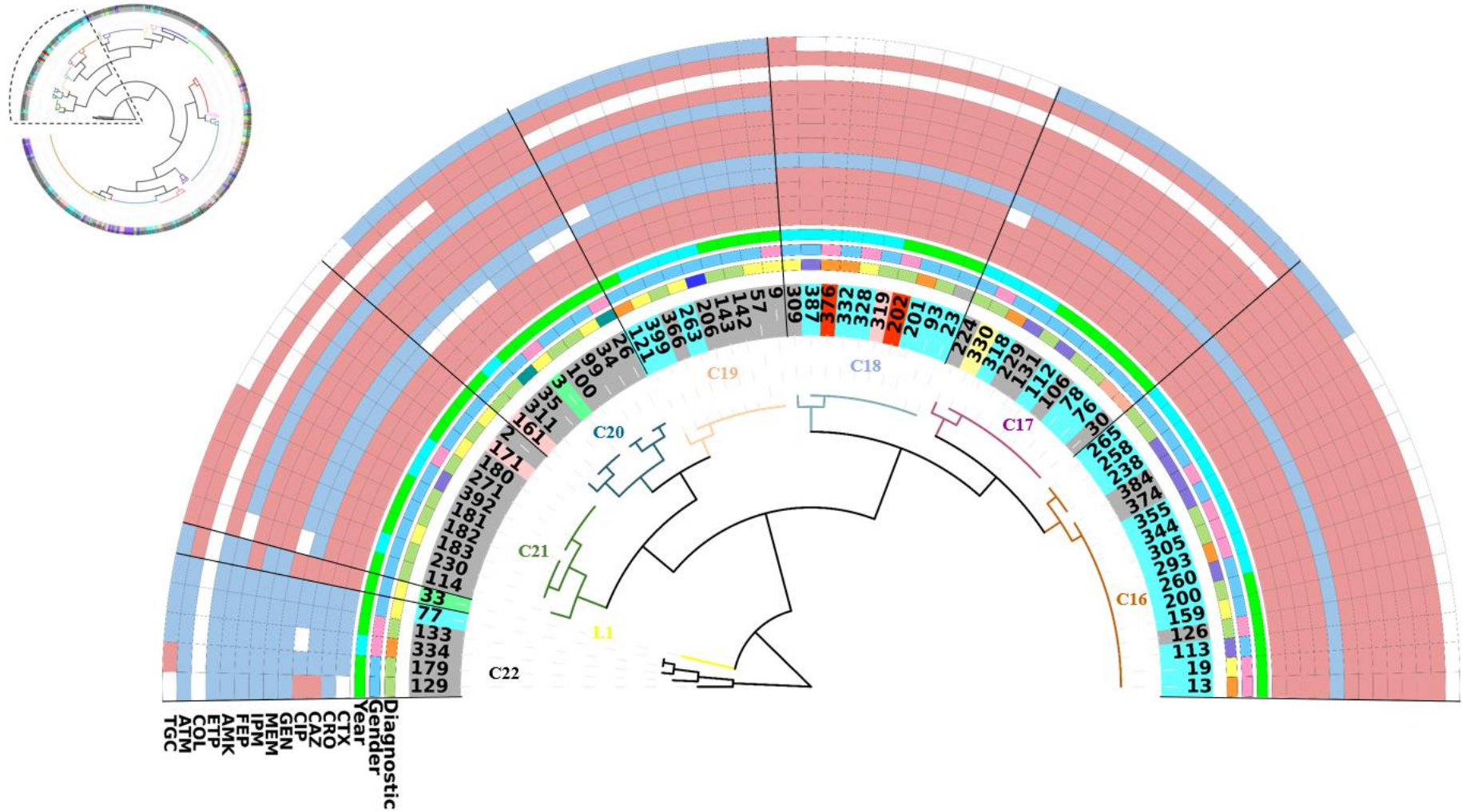
**Figura 17.**

*Dendrograma de la correlación de variables epidemiológicas y perfiles de resistencia fenotípicos de K. pneumoniae (Clúster 10-15)*



**Figura 18.**

*Dendrograma de la correlación de variables epidemiológicas y perfiles de resistencia fenotípicos de K. pneumoniae (Clúster 16-22)*





El dendrograma se divide en 22 clústeres y un *leaf* en base a sus semejanzas en el perfil de resistencia fenotípico. A través del programa iTol se le añadió información adicional como el sexo (masculino y femenino), la provincia (Azuay, Chimborazo, Pichincha, Cotopaxi, Guayas, Pastaza, Tungurahua, Sucumbíos, Napo, Santo Domingo, Los Ríos) y el año (2020-2021) (**Figura 14**).

Con respecto a la tigeciclina, se detectó resistencia fenotípica en 8 clústeres. Como se observa en las **Figuras 15-18** existen aislados resistentes a tigeciclina en los clústeres C2, C3, C9, C12, C13, C18, C21 y C22. Cabe recalcar que todos los aislados correspondientes al clúster C3, C2 y C12 son resistentes a tigeciclina (100 %). Finalmente, el 44 %, 28 %, 25 %, 18 % y 10 % de los aislados de los clústeres C21, C22, C13, C9 y C18 son resistentes a tigeciclina respectivamente. Los demás clústeres no presentan aislados resistentes a tigeciclina (**Anexo 7**). A continuación, se detallan algunas de las variables epidemiológicas de las muestras resistentes a tigeciclina en base al clúster al que pertenecen.

El clúster C12 contiene 7 muestras de las cuales todas son resistentes a tigeciclina, de estas, 3 pertenecen a la provincia de Guayas y 4 a Pichincha. El diagnóstico que domina en este clúster es el COVID-19 con 5 casos, el resto corresponden a un paciente con enfermedad cardiovascular y un paciente con infección respiratoria. Todas las muestras corresponden a pacientes masculinos (**Figura 17**).

El clúster C3 contiene 4 muestras, todas resistentes a tigeciclina. Tres muestras corresponden a Pichincha y una a Chimborazo. El 75% de las muestras corresponden a hombres en el año 2021 y una mujer del 2020. Para el tipo de diagnóstico, 2 corresponden al caso de enfermedad cardiovascular, uno a COVID-19 y el otro caso corresponde a otras enfermedades (**Figura 15**). El clúster C2 posee 10 muestras de las cuales el 100% de las muestras son resistentes a tigeciclina. 2 de las 10 muestras corresponden a Chimborazo, 1 a Santo Domingo, 1 al Guayas y los 6 restantes a Pichincha. El COVID-19 es la enfermedad predominante (70%), seguida de otras

infecciones respiratorias (30%). El género masculino es el más prevalente con el 80%. Finalmente 8 muestras son del 2020 y 2 del 2021 (**Figura 15**).

El C21 contiene 9 cepas, sin embargo, tan solo 5 corresponden a muestras resistentes a tigeciclina. La provincia dominante es Pichincha con 8 casos y Santo Domingo con 1. El COVID-19 y otras infecciones respiratorias predominan en este clúster ya que en conjunto suman 8 muestras, la última corresponde a enfermedad cardiovascular. El género sigue el mismo patrón que los anteriores clústeres mencionados, en donde la mayoría de las muestras corresponden a hombres (8/9) (**Figura 18**). El C22 contiene 5 cepas de las cuales solo una presenta resistencia a tigeciclina, esta pertenece al año 2020 y a la provincia de Pichincha, se trata de un paciente masculino con COVID-19 (**Figura 18**).

En el clúster C13 tan solo se observa una cepa resistente a tigeciclina de las 4 que se encuentran en este clúster. Se trata de una muestra aislada de un paciente femenino en el 2020 en la provincia de Pichincha por COVID-19 (**Figura 17**). El C9 contiene un total de 33 cepas de las cuales solamente 6 son resistentes a tigeciclina. Estas cepas fueron aisladas en el 2021 a excepción de una que corresponde al 2020. A diferencia del resto de clústeres, aquí predomina la provincia de Chimborazo con 3 casos, seguida de Pichincha, Tungurahua y Guayas. Todos los aislados corresponden al género masculino (**Figura 16**).

En el C18 se observa 9 muestras con susceptibilidad intermedia a tigeciclina y tan solo una resistente a dicho antibiótico. Esta última corresponde a un paciente masculino, de Pichincha, aislada en el 2021 por una infección respiratoria (**Figura 18**). La distribución de los aislados de *K. pneumoniae* resistente a tigeciclina se encuentra detallada gráficamente en el *Anexo 11*. El perfil de resistencia fenotípica de los aislados resistentes a tigeciclina, por otro lado, se encuentra detallado a continuación:

Según **Chiu et al. (2017)**, la colistina y los aminoglucósidos tienen una excelente actividad *in vitro* contra aislados resistentes a tigeciclina. Esto se evidencia claramente en el clúster C9 (**Figura 16**), en donde 6 aislados muestran resistencia a tigeciclina y al resto de antibióticos a excepción de la amikacina (sensible) y colistina (intermedio o *wild-type*). Un patrón similar se puede observar en el clúster C12 (**Figura 17**). Aquí se observa que las cepas son resistentes a tigeciclina y a la mayoría de los antibióticos, pero presentan susceptibilidad a ambos aminoglucósidos (amikacina y gentamicina) y solo 4 de los 7 aislados presentan susceptibilidad intermedia a colistina, el resto son resistentes. El C13 (**Figura 17**) contiene una muestra resistente a la mayoría de los antibióticos (incluidos tigeciclina y colistina) y con susceptibilidad intermedia a los aminoglucósidos.

Por otro lado, las cepas resistentes a tigeciclina en los clústeres C18 y C21 (**Figura 18**) siguen un patrón casi similar, en donde se evidencia sensibilidad a al menos un aminoglucósido, sensibilidad intermedia a colistina y además en algunos casos se presenta sensibilidad al ciprofloxacino. **Satlin et al. (2011)**, informan que el tratamiento con aminoglucósidos logra tasas de eliminación microbiológica más altas incluso sobre la tigeciclina y la colistina.

En los clústeres C2 y C3 (**Figura 15**) se observa una elevada tasa de resistencia. El C2 presenta resistencia a todos los antibióticos con excepción a colistina. El C3 por otro lado, presenta 4 aislados resistentes a todos los antibióticos analizados. De las 4 cepas, 3 corresponden a pacientes masculinos en el 2021, el otro caso es de una paciente femenina del 2020. **Xu et al. (2020)** reportaron en China un caso similar, en donde se aisló una cepa de *K. pneumoniae* panresistente de un paciente masculino hospitalizado en la UCI, portadora de 7 genes de resistencia, entre las cuales se encontraban los genes *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>CTX-M</sub>*. Las cepas 396 y 347 del C3 en nuestro estudio presentan un perfil genotípico similar, ya que ambas contienen los dos genes mencionados (datos del gen *bla<sub>CTX-M</sub>* no reportados).

Finalmente, en el clúster C22 se encuentra una cepa resistente a tigeciclina, con susceptibilidad intermedia a colistina y sensible al resto de los antibióticos, cabe recalcar que esta cepa no contenía genes de resistencia a carbapenémicos. **Hu et al. (2021)** reportaron una cepa de *K. pneumoniae* con un perfil de susceptibilidad casi similar, ya que fue resistente a tigeciclina y sensible a carbapenémicos (imipenem y meropenem) debido que no se detectó carbapenemasas de ningún tipo. En otro estudio se obtuvo cepas de *K. pneumoniae* mutantes inducidas en el laboratorio resistentes a tigeciclina y sensibles a otros antibióticos como la gentamicina, ciprofloxacino, cefepime, amikacina y ceftriaxona (**Moghimi et al., 2021**). La tigeciclina no presenta resistencia cruzada con otros antibióticos como los  $\beta$ -lactámicos y las fluoroquinolonas, lo que sugiere la posibilidad de encontrar cepas resistentes a tigeciclina y sensibles a los antibióticos con un diferente mecanismo de acción (**Noskin, 2005; Sorlózano et al., 2006**).

La colistina por otro lado presenta resistencia evidente en 10 clústeres, destacando al C3, C13, C5, C8, C11 y C16 en los cuales el 100 % de muestras mostraron resistencia. El resto de los clústeres presentaron porcentajes inferiores, Cabe mencionar que ninguno de los aislamientos con fenotipo de resistencia a colistina (non-wild-type) presentó el gen *mcr-1* de resistencia móvil a colistina (datos no reportados), el cual presenta una diseminación emergente desde el año 2016 (**Wang et al., 2018**). El resto de los antibióticos muestran un patrón similar de susceptibilidad. Tal es el caso de CTX, CRO, CAZ, MEM, IPM, FEP, ETP y ATM, antibióticos  $\beta$ -lactámicos con un nivel bajo de susceptibilidad por parte de la mayoría de aislados. Este patrón se debe al alto número de aislados productores de carbapenemasas (**Tabla 10**).

### 3.2. Verificación de hipótesis

En esta investigación se aplicó el análisis estadístico Chi-cuadrado de Pearson, dado que este permite conocer si existe diferencia significativa entre los resultados observados con los resultados esperados de una o más categorías de datos. Para este procedimiento se tomó en cuenta lo siguiente:

$p < 0.05$  se rechaza la  $H_0$

$p > 0.05$  se acepta la  $H_0$

Para el análisis Chi-cuadrado se empleó el software InfoStat, en donde se evaluó el número de muestras resistentes a distintos antibióticos en el periodo 2020-2021. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 12.**

*Resultados obtenidos Chi-cuadrado de Pearson*

| <b>Estadístico de Chi cuadrado de Pearson</b> | <b>Grados de Libertad</b> | <b>Valor p</b> |
|---|---------------------------|----------------|
| Muestras resistentes por año                  | 12                        | <b>0.2153</b>  |

Los datos del número de muestras resistentes a los antibióticos evaluados en el 2020 y 2021 se encuentran detallados en el **Anexo 7**. El valor p obtenido de 0.2153 indica que no existe diferencia significativa entre este periodo con respecto al número de muestras resistentes detectadas para cada antibiótico. Por lo que se acepta la hipótesis nula.

## CAPÍTULO 4

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4. 1. Conclusiones

- Para la caracterización de *K. pneumoniae* resistente a tigeciclina se recuperaron las cepas criopreservadas por el CRN-RAM en el periodo 2020-2021. De un banco de 655 cepas obtenidas de la red de hospitales del Ecuador se aplicaron criterios de exclusión (no identificación de las cepas, cepas no viables y contaminadas) y criterios de inclusión (pacientes UCI con diagnóstico detallado, edad de los pacientes y tipo de muestra), obteniéndose 399 cepas, de las cuales se realizaron pruebas bioquímicas para confirmar la morfología de *K. pneumoniae*. Finalmente se identificaron 376 aislados viables de *K. pneumoniae* que cumplían con los criterios de inclusión y exclusión, a partir de los cuales se obtuvieron los perfiles fenotípicos y genotípicos mediante microdilución en caldo y PCR, respectivamente.
- Tras analizar los perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana a tigeciclina de los aislados de *K. pneumoniae* obtenidos de la colección del CRN-RAM mediante la técnica de microdilución en caldo, se observó que en el periodo 2020 la resistencia fue del 10 % y disminuyó al 8 % para el 2021, sin embargo, se puede sugerir que se mantuvo constante ya que se necesita de más estudios de los siguientes años para evidenciar una tendencia decreciente firme. Por otra parte, la susceptibilidad intermedia aumentó del 38 % en el 2020 al 58 % en el 2021. Finalmente, se observó una notable disminución de la sensibilidad a tigeciclina en el periodo 2020 – 2021 con un porcentaje del 52 % y 34 %, respectivamente, demostrando así una mayor prevalencia de los aislados con susceptibilidad intermedia a tigeciclina.
- Se determinó la presencia de genes de resistencia a tigeciclina en las 376 cepas de *K. pneumoniae*, mediante lo cual se evidenció la ausencia de los genes *tet X*, *tet (X3)*, *tet (X4)* en todas las cepas; además, se determinó la presencia de genes de resistencia a carbapenémicos, en donde se observó una mayor prevalencia del gen *bla<sub>KPC</sub>*, ya que se encuentra presente en 370/376 cepas (98,4 %). Por otra parte, los genes *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* y *bla<sub>IMP</sub>* se presentaron en 1/376

cepas (0,26 %). Finalmente, no se encontró el gen *bla*<sub>OXA-48</sub> en la colección evaluada.

- Se comparó los perfiles de resistencia a las familias de antibióticos carbapenémicos, cefalosporinas, aminoglucósidos, monobactámicos, fluoroquinolonas, polimixinas y glicilciclinas, mediante lo cual, se evidenció una alta tasa de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos (carbapenémicos, cefalosporinas y monobactámicos) debido a que su porcentaje de resistencia oscilaba entre el  $98 \pm 1$  % manteniéndose casi constante durante el periodo 2020 – 2021. Respecto a las fluoroquinolonas, estas presentaron una tasa de resistencia menor a los  $\beta$ -lactámicos, sin embargo, sigue siendo alta ya que en el 2020 el porcentaje fue del 86 % y subió a 95 % en el 2021. Finalmente, los antibióticos de las familias de los aminoglucósidos, polimixinas y glicilciclinas presentaron un nivel bajo en su tasa de resistencia. En primer lugar, la resistencia hacia los aminoglucósidos aumentó del 42 % al 62 % en el periodo estudiado, seguido de las polimixinas con una tasa de resistencia del 17 % en el 2020 y 26 % en el 2021. La glicilciclina estudiada tuvo una ligera disminución en su porcentaje de resistencia, ya que del 10 % disminuyó al 8 %.
- Se realizó un dendrograma en donde se agruparon las 376 cepas de *K. pneumoniae* en 22 clústeres y un *leaf* en base a sus semejanzas en el perfil de susceptibilidad a distintos antibióticos detallando sus variables epidemiológicas (género, provincia, año y diagnóstico). Se evidenció que las cepas evaluadas presentan un patrón de susceptibilidad similar a los distintos antibióticos ya que se observó en su mayoría una alta tasa de resistencia para los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, seguido de las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos. La tigeciclina y la colistina, por el contrario, presentaron tasas bajas de resistencia.

#### 4. 2. Recomendaciones

- Realizar un análisis de la secuencia del genoma de aquellas muestras coproductoras de doble carbapenemasas para identificar a que variante específica de la carbapenemasa pertenece.
- Analizar el genoma de las cepas productoras de KPC para conocer cuál es el tipo de KPC más prevalente en el país.

##### **Para el sistema de salud del Ecuador:**

- Implementar políticas adecuadas para la supervisión del uso responsable de los antibióticos con el fin de disminuir o frenar la tasa de evolución de los mecanismos de resistencia antimicrobiana.



## MATERIALES DE REFERENCIA

### Referencias Bibliográficas

- Ahmed, O., Asghar, A., & Bahwerth, F. (2021). Increasing frequency of Aminoglycoside-Resistant *Klebsiella pneumoniae* during the era of pandemic COVID-19. *Materials Today Proceedings*.  
<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.05.344>
- Alhazmi, W., Al-Jabri, A., & Al-Zahrani, I. (2022). The Molecular Characterization of Nosocomial Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Co-Harboring blaNDM and blaOXA-48 in Jeddah. *Microbiology Research 2022, Vol. 13, Pages 753-764, 13(4), 753–764*. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13040054>
- Amereh, F., Arabestani, M. R., & Shokoohezadeh, L. (2023). Relationship of OqxAB efflux pump to antibiotic resistance, mainly fluoroquinolones in *Klebsiella pneumoniae*, isolated from hospitalized patients. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 26(1), 93–98*.  
<https://doi.org/10.22038/ijbms.2022.67095.14714>
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48, 5–16*.  
[https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl\\_1.5](https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5)
- Aracil, B., Oteo, J., Cuevas, O., Lara, N., Pérez, I., Fernández, S., Pérez, M., & Campos, J. (2017). Rápido aumento de la resistencia a cefalosporinas de 3a generación, imipenem y de la coresistencia en 7.140 aislados de *Klebsiella pneumoniae* en hemocultivos (2010-2014) según datos de EARS-Net en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 35(8), 480–486*.  
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.06.007>
- Arnold, R. S., Thom, K. A., Sharma, S., Phillips, M., Kristie Johnson, J., & Morgan, D. J. (2011). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing Bacteria. *Southern Medical Journal, 104(1), 40*.  
<https://doi.org/10.1097/smj.0b013e3181fd7d5a>
- Ashurst, J., & Dawson, A. (2022). Neumonía por *Klebsiella*. Stat Pearls.
- Baggio, D., & Ananda-Rajah, M. R. (2021). Fluoroquinolone antibiotics and adverse

- events. *Australian Prescriber*, 44(5), 161.  
<https://doi.org/10.18773/austprescr.2021.035>
- Beabout, K., Hammerstrom, T., Perez, A., Magalhães, B., Prater, A., Clements, T., Arias, C., Saxer, G., & Shamoo, Y. (2015). The ribosomal S10 protein is a general target for decreased tigecycline susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(9), 5561–5566. <https://doi.org/10.1128/AAC.00547-15>
- Belati, A., Bavaro, D. F., Saracino, A., Diella, L., De Gennaro, N., & Di Gennaro, F. (2022). Meropenem/Vaborbactam Plus Aztreonam as a Possible Treatment Strategy for Bloodstream Infections Caused by Ceftazidime/Avibactam-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: A Retrospective Case Series and Literature Review. *Antibiotics* 2022, Vol. 11, Page 373, 11(3), 373. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030373>
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez-Nieto, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Brink, B. (2019). Urease Test Protocol. *American Society for Microbiology*. [www.asmscience.org](http://www.asmscience.org)
- Çelik, İ., Saatçi, E., & Eyüboğlu, F. (2020). Emerging and reemerging respiratory viral infections up to Covid-19. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(3), 557–562. <https://doi.org/10.3906/SAG-2004-126>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Antibiotic Resistance Threats in the United States. *Department of Health and Human Services*.
- Chaturvedi, R., Lui, B., Aaronson, J. A., White, R. S., & Samuels, J. D. (2022). COVID-19 complications in males and females: recent developments. *Journal of Comparative Effectiveness Research*, 11(9), 689. <https://doi.org/10.2217/CER-2022-0027>
- Chiu, S. K., Chan, M. C., Huang, L. Y., Lin, Y. T., Lin, J. C., Lu, P. L., Siu, L. K., Chang, F. Y., & Yeh, K. M. (2017). Tigecycline resistance among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Clinical characteristics and expression levels of

efflux pump genes. *PLOS ONE*, 12(4), e0175140.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0175140>

Choby, J. E., Howard-Anderson, J., & Weiss, D. S. (2020). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. *Journal of Internal Medicine*, 287(3), 283–300. <https://doi.org/10.1111/JOIM.13007>

CLSI. (2022). *M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Vol. 35 No. 2* (Issue January).

De Koster, S., Rodriguez, J., Rajakani, S., Lammens, C., Glupczynski, Y., Goossens, H., & Basil, J. (2022). Diversity in the Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* ST101 of Human, Environmental, and Animal Origin. *Frontiers in Microbiology*, 13, 212. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.838207/bibtex>

Du, X., He, F., Shi, Q., Zhao, F., Xu, J., Fu, Y., & Yu, Y. (2018). The rapid emergence of tigecycline resistance in blaKPC-2 harboring *Klebsiella pneumoniae*, as mediated in vivo by mutation in tetA during tigecycline treatment. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00648/bibtex>

Duan, Q., Wang, Q., Sun, S., Cui, Q., Ding, Q., Wang, R., & Wang, H. (2022). ST11 Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clone Harboring blaNDM Replaced a blaKPC Clone in a Tertiary Hospital in China. *Antibiotics*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101373/s1>

Dybowska, Ł., Kotela, A., Krzemiński, J., Wróblewska, M., Marchel, H., Romaniec, M., Łęgosz, P., & Jakubowska, M. (2017). Graphene Nanolayers as a New Method for Bacterial Biofilm Prevention: Preliminary Results. *Journal of AOAC International*, 100(4), 900–904. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0164>

ECDC. (2023). *Resistencia a los antimicrobianos*. European Centre for Disease Prevention and Control.

Effah, C., Sun, T., Liu, S., & Wu, Y. (2020). *Klebsiella pneumoniae*: An increasing threat to public health. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0343-8/tables/5>

Elgendy, S., Abdel, M., & El-Mokhtar, M. (2018). Tigecycline resistance among

- Klebsiella pneumoniae* isolated from febrile neutropenic patients. *Journal of Medical Microbiology*, 67(7), 972–975. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000770>
- Emerging Infectious Diseases. (2010). *Etymologia: Klebsiella*. 16(9). <https://doi.org/10.3201/eid1609.et1609>
- Erdem, F., Oncul, O., & Aktas, Z. (2019). Characterization of Resistance Genes and Polymerase Chain Reaction-Based Replicon Typing in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Drug Resistance*, 25(4), 551–557. <https://doi.org/10.1089/MDR.2018.0231>
- Escandón-Vargas, K., Reyes, S., Gutiérrez, S., & Villegas, M. V. (2016). The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1268918>
- EUCAST. (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8), ix–xv. <https://doi.org/10.1046/J.1469-0691.2003.00790.X>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2020). *Annual Epidemiological Report for 2019*. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net).
- Fang, L., Chen, C., Cui, C., Li, X., Zhang, Y., Liao, X., Sun, J., & Liu, Y. (2020). Emerging High-Level Tigecycline Resistance: Novel Tetracycline Destructases Spread via the Mobile Tet(X). *BioEssays*, 42(8). <https://doi.org/10.1002/bies.202000014>
- Ferone, M., Gowen, A., Fanning, S., & Scannell, A. (2020). Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6).
- Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*, 7(12), 653–660. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.190>
- Germovsek, E., Barker, C. I., & Sharland, M. (2017). What do I need to know about aminoglycoside antibiotics? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, 102(2), 89–93. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2015-309069>

- Ghasemnejad, A., Douidi, M., & Amirmozafari, N. (2019). The role of the blaKPC gene in antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Iranian Journal of Microbiology*, *11*(4), 288.
- Greer, N. D. (2006). Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylicycline class of antibiotics. *Baylor University. Medical Center*, *19*(2), 155. <https://doi.org/10.1080/08998280.2006.11928154>
- Han, R., Shi, Q., Wu, S., Yin, D., Peng, M., Dong, D., Zheng, Y., Guo, Y., Zhang, R., & Hu, F. (2020). Dissemination of Carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) Among Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolated From Adult and Children Patients in China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 314. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00314/bibtex>
- He, T., Wang, R., Liu, D., Walsh, T., Zhang, R., Lv, Y., Ke, Y., Ji, Q., Wei, R., Liu, Z., Shen, Y., Wang, G., Sun, L., Lei, L., Lv, Z., Li, Y., Pang, M., Wang, L., Sun, Q., Wang, Y. (2019). Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans. *Nature Microbiology*, *4*(9), 1450–1456. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0445-2>
- Herrera, E., Andrade, D., Reinoso, Y., Herrera, E., Andrade, D., & Reinoso, Y. (2021). Resistencia antimicrobiana en *Klebsiella pneumoniae*, Ecuador. *Vive Revista de Salud*, *4*(12), 36–49. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i12.107>
- Hsieh, Y., Wu, J., Chen, Y., Quyen, T., Liao, W., Li, S., Chen, Y., & Pan, Y. (2021). An outbreak of tet(X6)-carrying tigecycline-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates with a new capsular type at a hospital in Taiwan. *Antibiotics*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101239/s1>
- Hu, N., Wang, D., Lin, Y., Zou, J., Liu, Y., Xiong, Z., Guo, J., Zeng, L., & Li, J. (2021). Molecular Analysis and Antimicrobial Resistance Pattern of Tigecycline-Non-Susceptible *Klebsiella pneumoniae* Isolated from a Tertiary Care Hospital of East Asia. *Infection and Drug Resistance*, *14*, 4147–4155. <https://doi.org/10.2147/idr.s334098>
- Izquierdo, L. (2003). *Biosíntesis del lipopolisacárico de Klebsiella pneumoniae*. Universidad de Barcelona.

- Jenner, L., Starosta, A., Terry, D., Mikolajka, A., Filonava, L., Yusupov, M., Blanchard, S., Wilson, D., & Yusupova, G. (2013). Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(10), 3812–3816. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216691110>
- Jiang, W., Yang, W., Zhao, X., Wang, N., & Ren, H. (2020). *Klebsiella pneumoniae* presents antimicrobial drug resistance for  $\beta$ -lactam through the ESBL/PBP signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *19*(4). <https://doi.org/10.3892/ETM.2020.8498>
- Jiménez, M., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J., Duarte, C., Salgado, N., Ramón, P., & Melano, R. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*, *1*–8. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.65>
- Jin, X., Chen, Q., Shen, F., Jiang, Y., Wu, X., Hua, X., Fu, Y., & Yu, Y. (2021). Resistance evolution of hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 during treatment with tigecycline and polymyxin. *Emerging Microbes and Infections*, *10*(1), 1129–1136. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1937327>
- Kennedy, C., & Estigarribia, G. (2021). Perfil de resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en una Unidad de Cuidados Intensivos de Paraguay. *Infectio*, *25*(2), 84–88. <https://doi.org/10.22354/IN.V25I2.924>
- Langford, B., Soucy, J., Leung, V., So, M., Kwan, A., Portnoff, J., Bertagnolio, S., Raybardhan, S., MacFadden, D., & Daneman, N. (2022). Antibiotic resistance associated with the COVID-19 pandemic: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.12.006>
- Leber, A. (2016). Broth Microdilution Test. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. <https://doi.org/10.1128/9781555818814.CH5.2.1>
- Leclercq, R., Cantón, R., Brown, D., Giske, C., Heisig, P., Macgowan, A., Mouton, J., Nordmann, P., Rodloff, A., Rossolini, G., Soussy, C., Steinbakk, M., Winstanley,

- T., & Kahlmeter, G. (2013). EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(2), 141–160. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2011.03703.X>
- Lehman, D. (2016). Triple Sugar Iron Agar Protocols. *American Society for Microbiology*.
- Liang, C., Xing, B., Yang, X., Fu, Y., Feng, Y., & Zhang, Y. (2015). Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance on *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in China. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(1), 1381.
- Liao, W., Wang, L., Zheng, X., Zhang, Y., Chen, T., Zhou, C., Xu, Y., Chen, L., & Zhou, T. (2022). Evolution of *tet(A)* variant mediating tigecycline resistance in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* during tigecycline treatment. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 28, 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.01.007>
- Lin, Y., Wang, F., Chan, Y., Fu, Y., & Fung, C. (2014). Clinical and microbiological characteristics of tigecycline non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in Taiwan. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-1>
- Linkevicius, M., Sandegren, L., & Andersson, D. I. (2016). Potential of Tetracycline Resistance Proteins To Evolve Tigecycline Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(2), 789. <https://doi.org/10.1128/AAC.02465-15>
- Lozano, M., & Clavijo, L. (2001). Evaluación de mantenimiento de bacterias por tres técnicas de congelación a mediano plazo. *Pontificia Universidad Javeriana*.
- MacWilliams, M. (2016). Indole Test Protocol. *American Society for Microbiology*. [www.asmscience.org](http://www.asmscience.org)
- Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C., Harbarth, S., Hindler, J., Kahlmeter, G., Olsson, B., Paterson, D., Rice, L., Stelling, J., Struelens, M., Vatopoulos, A., Weber, J., & Monnet, D. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired

- resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2011.03570.X>
- Martin, R., & Bachman, M. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10.3389/fcimb.2018.00004
- Martínez, D., Caña, L., Rodulfo, H., García, J., González, D., Rodríguez, L., & de Donato, M. (2020). Characteristics of dual carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from an outbreak in Venezuela: a retrospective study. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 44(1). <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.50>
- McDevitt, S. (2009). Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. *American Society for Microbiology*. [www.asmscience.org](http://www.asmscience.org)
- Medrzycka, W., Zorena, K., Dabrowski, S., Ozga, D., & Tomaszek, L. (2021). Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections in ICU COVID-19 Patients: A Scoping Review. *Journal of Clinical Medicine* , 10(10). <https://doi.org/10.3390/JCM10102067>
- Meletis, G., Tzampaz, E., Protonotariou, E., & Sofianou, D. (2010). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM and blaKPC genes. *Hippokratia*, 14(2), 139 - 140.
- Ministerio de Salud. (2018). *Reporte de Datos de Resistencia a los Antimicrobianos en Ecuador 2014-2018*.
- Ministerio de Salud Pública. (2020). *Plan de preparación y respuesta del Ecuador ante la COVID-19*. MSP.
- Moghimi, M., Haeili, M., & Mohajjel, H. (2021). Characterization of Tigecycline Resistance Among Tigecycline Non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* Isolates From Humans, Food-Producing Animals, and in vitro Selection Assay. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.702006>
- Mohapatra, S., Dwibedy, K., & Padhy, I. (2021). Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. *Journal of Biosciences*, 46(3). <https://doi.org/10.1007/S12038-021-00209-8>



- Mohsin, M., Hassan, B., Martins, W., Li, R., Abdullah, S., Sands, K., & Walsh, T. (2021). Emergence of plasmid-mediated tigecycline resistance tet(X4) gene in *Escherichia coli* isolated from poultry, food and the environment in South Asia. *Science of The Total Environment*, 787. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.147613>
- Mouloudi, E., Massa, E., Piperidou, M., Papadopoulos, S., Iosifidis, E., Roilides, I., Theodoridou, T., Kydona, C., Fouzas, I., Imvrios, G., Papanikolaou, V., & Gritsi-Gerogianni, N. (2014). Tigecycline for treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections after liver transplantation in the intensive care unit: a 3-year study. *Transplantation Proceedings*, 46(9), 3219–3221. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.09.160>
- Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Landry, M., & Pfaller, M. (2008). Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition. *Clinical Infectious Diseases*, 46, 153–157. <https://doi.org/10.1086/524076>
- Nasiri, G., Peymani, A., Farivar, T., & Hosseini, P. (2018). Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* collected from Qazvin and Tehran provinces, Iran. *Infection, Genetics and Evolution*, 64, 219–224. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2018.06.030>
- Navon, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 252–275. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX013>
- Ni, R., Onishi, M., Mizusawa, M., Kitagawa, R., Kishino, T., Matsubara, F., Tsuchiya, T., Kuroda, T., & Ogawa, W. (2020). The role of RND type efflux pumps in multidrug-resistant mutants of *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67820-x>
- Ni, W., Han, Y., Liu, J., Wei, C., Zhao, J., Cui, J., Wang, R., & Liu, Y. (2016). Tigecycline treatment for carbapenem-resistant enterobacteriaceae infections: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (United States)*, 95(11). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000003126>
- Nikaido, H., & Takatsuka, Y. (2009). Mechanisms of RND multidrug efflux pumps.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(5), 769–781. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2008.10.004>
- Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1791. <https://doi.org/10.3201/EID1710.110655>
- Noskin, G. A. (2005). Tigecycline: A New Glycylcycline for Treatment of Serious Infections. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1086/431672>
- Palasubramaniam, S., Subramaniam, G., Muniandy, S., & Parasakthi, N. (2007). Resistance to extended-spectrum beta-lactams by the emergence of SHV-12 and the loss of OmpK35 in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Malaysia. *Microbial Drug Resistance*, 13(3), 186–190. <https://doi.org/10.1089/mdr.2007.726>
- Pankey, A. (2005). Tigecycline. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(3), 470–480. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKI248>
- Park, Y., Choi, Q., Kwon, G., & Koo, S. (2020). Molecular epidemiology and mechanisms of tigecycline resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(12). <https://doi.org/10.1002/JCLA.23506>
- Perrotta, F., & Perrini, M. P. (2021). Successful Treatment of *Klebsiella pneumoniae* NDM Sepsis and Intestinal Decolonization with Ceftazidime/Avibactam Plus Aztreonam Combination in a Patient with TTP Complicated by SARS-CoV-2 Nosocomial Infection. *Medicina*, 57(5). <https://doi.org/10.3390/MEDICINA57050424>
- Petti, C., Polage, C., & Schreckenberger, P. (2005). The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misidentified by Conventional Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 6123. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.6123-6125.2005>
- Pitout, D., Nordmann, P., & Poirel, L. (2015). Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), 5873.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01019-15>

- Pitout, J. D. D., Peirano, G., Kock, M. M., Strydom, K. A., & Matsumura, Y. (2019). The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clinical Microbiology Reviews*, *33*(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-19>
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(4), 589. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>
- Renggli, L., Gasser, M., Plüss-Suard, C., Harbarth, S., & Kronenberg, A. (2022). Temporal and structural patterns of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* incidence in Swiss hospitals. *Journal of Hospital Infection*, *120*, 36–42. <https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2021.11.006>
- Saharman, R., Karuniawati, A., Severin, A., & Verbrugh, A. (2021). Infections and antimicrobial resistance in intensive care units in lower-middle income countries: a scoping review. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, *10*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S13756-020-00871-X/TABLES/4>
- Santella, B., Serrettiello, E., De Filippis, A., Veronica, F., Iervolino, D., Dell'annunziata, F., Manente, R., Valitutti, F., Santoro, E., Pagliano, P., Galdiero, M., Boccia, G., & Franci, G. (2021). Lower Respiratory Tract Pathogens and Their Antimicrobial Susceptibility Pattern: A 5-Year Study. *Antibiotics*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10070851>
- Satlin, M. J., Kubin, C. J., Blumenthal, J. S., Cohen, A. B., Furuya, E. Y., Wilson, S. J., Jenkins, S. G., & Calfee, D. P. (2011). Comparative effectiveness of aminoglycosides, polymyxin B, and tigecycline for clearance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from urine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(12), 5893–5899. <https://doi.org/10.1128/AAC.00387-11>
- SENTRY. (2023). *Actividad de agentes antimicrobianos probados contra 274 aislamientos de Klebsiella pneumoniae en el programa SENTRY recolectados de centros médicos de América Latina durante 2021*. JMI Laboratories.
- Shields, K., Clancy, J., Press, G., & Nguyen, H. (2016). Aminoglycosides for Treatment of Bacteremia Due to Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*.

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5), 3187.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.02638-15>

SIGMA. (2023). *Tigecycline hydrate*. Life Science.

Silva, K., Rossato, L., Leite, A., & Simionatto, S. (2022). Overview of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 55. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0349-2021>

Sorlózano, A., Gutiérrez, J., Salmerón, A., Luna, J. D., Martínez-Checa, F., Román, J., & Piédrola, G. (2006). Activity of tigecycline against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Granada, Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28(6), 532–536. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2006.07.010>

Starke, K., Reissig, D., Petereit-Haack, G., Schmauder, S., Nienhaus, A., & Seidler, A. (2021). The isolated effect of age on the risk of COVID-19 severe outcomes: a systematic review with meta-analysis. *BMJ Global Health*, 6(12). <https://doi.org/10.1136/BMJGH-2021-006434>

Stojowska, K., Lupkowska, A., Kuczynska, D., & Laskowska, E. (2021). Heterorressistencia a antibióticos en *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682239>

Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2008.12.001>

Sun, Y., Cai, Y., Liu, X., Bai, N., Liang, B., & Wang, R. (2013). The emergence of clinical resistance to tigecycline. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41(2), 110–116. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2012.09.005>

Tártara, S. (2013). Patógenos emergentes: *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas (KPN-KPC). Educación Médica Continua.

Tesfa, T., Mitiku, H., Edae, M., & Assefa, N. (2022). Prevalence and incidence of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* colonization: systematic review and meta-analysis. *Systematic Reviews*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13643-022->

- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Editorial Médica Panamericana.
- Tsai, Y., Fung, C., Lin, J., Chen, J., Chang, F., Chen, T., & Siu, L. (2011). *Klebsiella pneumoniae* Outer Membrane Porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in both Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.01275-10>
- Uzairue, L., Rabaan, A., Adewumi, F., Okolie, O., Folorunso, J., Bakhrebah, M., Garout, M., Alfouzan, W., Halwani, M., Alamri, A., Halawani, S., Alshahrani, F., Hasan, A., Mutair, A., Alhumaid, S., Etafo, J., Utip, I., Odoh, I., & Uwaezuoke, N. (2022). Global Prevalence of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* from Bloodstream Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/pathogens11101092>
- Venkataramana, P., Vijaya, K., Aishwarya, L., Mariappan, S., & Sekar, U. (2020). Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Laboratory Physicians*, 12(02), 121–125. <https://doi.org/10.1055/S-0040-1716478>
- Vera, A., Barria, C., Carrasco, S., Lima, C., Aguayo, A., Domínguez, M., Bello, H., & González, G. (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista Chilena de Infectología*, 34(5), 476–484. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476>
- Wang, Q., Wang, X., Wang, J., Ouyang, P., Jin, C., Wang, R., Zhang, Y., Jin, L., Chen, H., Wang, Z., Zhang, F., Cao, B., Xie, L., Liao, K., Gu, B., Yang, C., Liu, Z., Ma, X., Jin, L., Wang, H. (2018). Phenotypic and Genotypic Characterization of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Data From a Longitudinal Large-scale CRE Study in China (2012–2016). *Clinical Infectious Diseases*, 67, S196–S205. <https://doi.org/10.1093/CID/CIY660>
- Wang, X., Chen, H., Zhang, Y., Wang, Q., Zhao, C., Li, H., He, W., Zhang, F., Wang, Z., Li, S., & Wang, H. (2015). Genetic characterisation of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates with reduced susceptibility to tigecycline: Role of the global

- regulator RamA and its local repressor RamR. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(6), 635–640. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.12.022>
- Wang, X., Zhao, J., Ji, F., Chang, H., Qin, J., Zhang, C., Hu, G., Zhu, J., Yang, J., Jia, Z., Li, G., Qin, J., Wu, B., & Wang, C. (2021). Multiple-Replicon Resistance Plasmids of *Klebsiella* Mediate Extensive Dissemination of Antimicrobial Genes. *Frontiers in Microbiology*, 12, 754931. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.754931>
- Wang, Y., Cao, W., Zhu, X., Chen, Z., Li, L., Zhang, B., Wang, B., Tian, L., Wang, F., Liu, C., & Sun, Z. (2012). Characterization of a novel *Klebsiella pneumoniae* sequence type 476 carrying both blaKPC-2 and blaIMP-4. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(8), 1867–1872. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1512-7>
- Wang, Y., Luo, Q., Xiao, T., Zhu, Y., & Xiao, Y. (2022). Impact of Polymyxin Resistance on Virulence and Fitness among Clinically Important Gram-Negative Bacteria. *Engineering*, 13, 178–185. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2020.11.005>
- Williams, P., Isaacs, D., & Berkley, J. (2018). Antimicrobial resistance among children in sub-Saharan Africa. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(2). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30467-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30467-X)
- World Health Organization. (2017). *La OMS publica lista de bacterias para las que se necesitan con urgencia nuevos antibióticos*. OMS.
- Xu, J., Zhao, Z., Ge, Y., & He, F. (2020). Rapid Emergence of a Pandrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 Isolate in an Inpatient in a Teaching Hospital in China After Treatment with Multiple Broad-Spectrum Antibiotics. *Infection and Drug Resistance*, 13, 799. <https://doi.org/10.2147/IDR.S243334>
- Yang, W., Moore, F., Koteva, P., Bareich, C., Hughes, W., & Wright, D. (2004). TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52346–52352. <https://doi.org/10.1074/JBC.M409573200>
- Yin, D., Guo, Y., Li, M., Wu, W., Tang, J., Liu, Y., Chen, F., Ni, Y., Sun, J., Zhang,

- H., Zhao, H., & Hu, F. (2021). Performance of VITEK 2, E-test, Kirby-Bauer disk diffusion, and modified Kirby-Bauer disk diffusion compared to reference broth microdilution for testing tigecycline susceptibility of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in a multicenter study in China. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *40*, 1149–1154. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04123-z>/Published
- Zhai, W., Tian, Y., Lu, M., Zhang, M., Song, H., Fu, Y., Ma, T., Sun, C., Bai, L., Wang, Y., Liu, D., & Zhang, Y. (2022). Presence of Mobile Tigecycline Resistance Gene tet(X4) in Clinical *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, *10*(1). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01081-21>
- Zhan, Q., Xu, Y., Wang, B., Yu, J., Shen, X., Liu, L., Cao, X., Guo, Y., & Yu, F. (2021). Distribution of fluoroquinolone resistance determinants in Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with bloodstream infections in China. *BMC Microbiology*, *21*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12866-021-02238-7>/TABLES/3
- Zhang, J., Zhao, C., Chen, H., Wang, X., Li, H., Zhang, Y., & Wang, H. (2015). Comparative evaluation of tigecycline susceptibility testing methods for *Acinetobacter baumannii* and Enterobacteriaceae. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *3*(2), 75–79. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2015.02.004>
- Zhang, Q., Lin, L., Pan, Y., & Chen, J. (2021). Characterization of Tigecycline-Heteroresistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates From a Chinese Tertiary Care Teaching Hospital. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 2178. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.671153>/BIBTEX
- Zhang, R., Dong, N., Shen, Z., Zeng, Y., Lu, J., Liu, C., Zhou, H., Hu, Y., Sun, Q., Cheng, Q., Shu, L., Cai, J., Chan, E. W. C., Chen, G., & Chen, S. (2020). Epidemiological and phylogenetic analysis reveals Flavobacteriaceae as potential ancestral source of tigecycline resistance gene tet(X). *Nature Communications* *2020 11:1*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18475-9>
- Zhang, R., Liu, L., Zhou, H., Chan, W., Li, J., Fang, Y., Li, Y., Liao, K., & Chen, S. (2017). Nationwide Surveillance of Clinical Carbapenem-resistant

Enterobacteriaceae (CRE) Strains in China. *EBioMedicine*, *19*, 98–106.  
<https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2017.04.032>

Zhang, R., Sun, J., Sun, R., Wang, M., Cui, C., Fang, L., Liao, M., Lu, X., Liu, Y., Liao, X., & Liu, Y. (2021). Source Tracking and Global Distribution of the Tigecycline Non-Susceptible tet (X) . *Microbiology Spectrum*, *9*(3).  
[https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01164-21/SUPPL\\_FILE/SPECTRUM01164-21\\_SUPP\\_3\\_SEQ11.XLSX](https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01164-21/SUPPL_FILE/SPECTRUM01164-21_SUPP_3_SEQ11.XLSX)

Zhang, S., Wen, J., Wang, Y., Wang, M., Jia, R., Chen, S., Liu, M., Zhu, D., Zhao, X., Wu, Y., Yang, Q., Huang, J., Ou, X., Mao, S., Gao, Q., Sun, D., Tian, B., & Cheng, A. (2022). Dissemination and prevalence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance gene tet (X4). *Frontiers in Microbiology*, *13*.  
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.969769/BIBTEX>

Zhang, X., Li, Q., Lin, H., Zhou, W., Qian, C., Sun, Z., Lin, L., Liu, H., Lu, J., Lin, X., Li, K., Xu, T., Zhang, H., Li, C., & Bao, Q. (2021). High-Level Aminoglycoside Resistance in Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Complex Isolates and Characteristics of armA-Carrying IncHI5 Plasmids. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 617. <https://doi.org/10.1063/5.0097479>



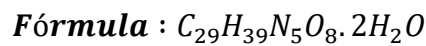
## ANEXOS

### Anexo 1.

Preparación de la Solución Madre de tigeciclina utilizando Dimetilsulfóxido (DMSO) y agua destilada estéril.

$$\text{Peso tigeciclina} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{Concentración} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right)}{\text{Potencia} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}\right)}$$

- **Cálculo del porcentaje de agua:**



$$585.65 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 36 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 621.65 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$\%H_2O = \frac{36\text{g/mol}}{621.65 \text{ g/mol}}$$

$$\%H_2O = 0.0579$$

- **Cálculo de la Potencia**

$$\text{Potencia} = \text{Pureza} \times \text{Fracción Act} (1 - \%H_2O)$$

$$\text{Potencia} = 981 \times 0.31(1 - 0.0579)$$

$$\text{Potencia} = 286.502 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}\right)$$

- **Cálculo de la concentración:**

**Datos:**

Volumen DMSO: 1 ml

Volumen agua destilada estéril: 1ml

Peso de la Tigeciclina :7 mg

Potencia: 286.502  $\mu\text{g} / \text{mg}$

$$\text{Concentración} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right) = \frac{\text{Peso tigeciclina} \times \text{Potencia} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}\right)}{\text{Volumen (ml)}}$$

$$\text{Concentración} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right) = \frac{7\text{mg} \times 286.502 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}\right)}{2 \text{ (ml)}}$$

$$\text{Concentración} = 1002.75 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right)$$

**Anexo 2.**

*Ejemplo de la preparación de diluciones a partir de la Solución de trabajo (ST) de tigeciclina*

| Concentración de la Solución ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Concentración en el pocillo ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Volumen ST ( $\mu\text{l}$ ) | Volumen del Solvente ( $\mu\text{l}$ ) |
|---|--|------------------------------|--|
| 8   | 4  | 6600                         | -                                      |
| 4   | 2  | 3300                         | 3300                                   |
| 2   | 1  | 1650                         | 4950                                   |
| 1   | 0.5  | 825                          | 5775                                   |

**Anexo 3.**

*Plantilla para la recolección de datos de los valores de MIC de la Tigeciclina*

| Placa<br>— | Muestras |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
|            |          | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 4          | A        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| 2          | B        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| 1          | C        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| 0.5        | D        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| 4          | E        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| 2          | F        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| 1          | G        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| 0.5        | H        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| Muestras   |          | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|            |          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |

**Anexo 4.**

*Distribución de las concentraciones del antibiótico ( $\mu\text{g/ml}$ ) en la placa de microdilución de Tigeciclina*

|   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   |
| B | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   |
| C | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| D | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| E | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   | 4   |
| F | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   |
| G | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| H | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

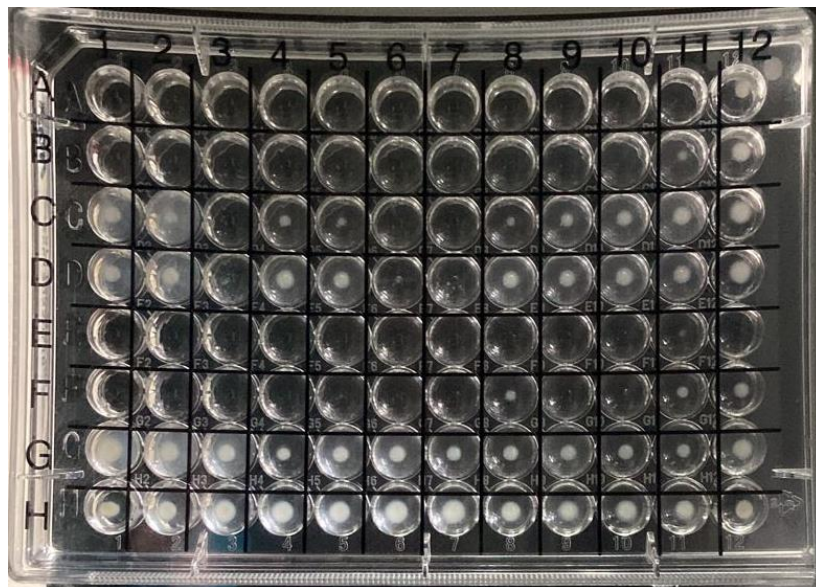
**Anexo 5.**

*Morfología de *K. pneumoniae* en Agar MacConkey*



**Anexo 6.**

*Placa de microdilución (lectura a las 24 horas)*



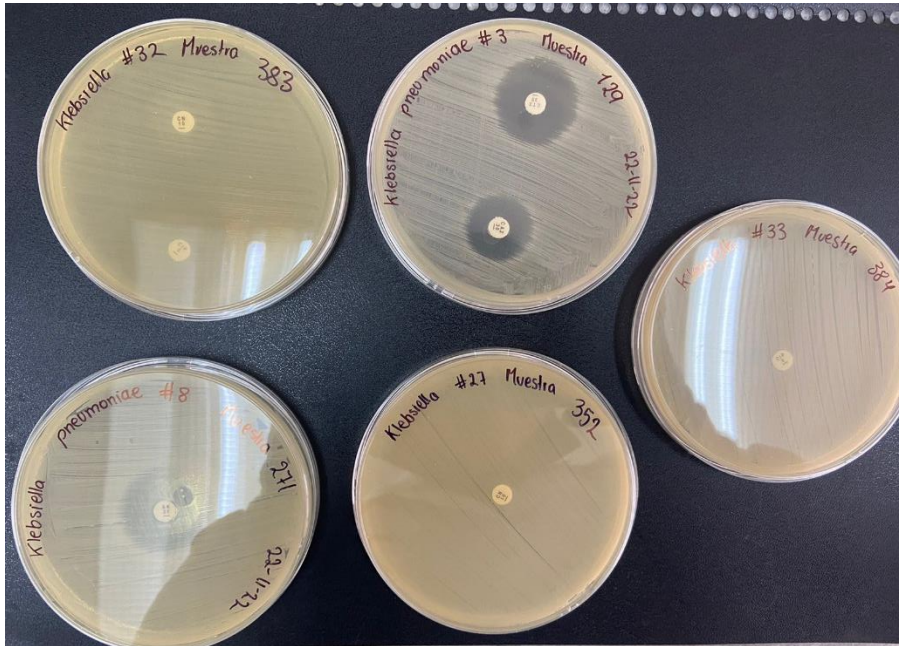
**Anexo 7.**

*Distribución de los datos para el análisis estadístico de los aislados de K. pneumoniae resistentes a distintos antibióticos en el periodo 2020-2021*

| <b>Antibióticos</b> | <b>2020</b> | <b>2021</b> |
|---------------------|-------------|-------------|
| CTX                 | 187         | 183         |
| CRO                 | 188         | 183         |
| CAZ                 | 189         | 183         |
| CIP                 | 166         | 171         |
| GEN                 | 93          | 129         |
| MEM                 | 187         | 183         |
| IPM                 | 187         | 183         |
| FEP                 | 188         | 183         |
| AMK                 | 68          | 99          |
| ETP                 | 187         | 183         |
| COL                 | 32          | 48          |
| ATM                 | 188         | 183         |
| TGC                 | 20          | 15          |

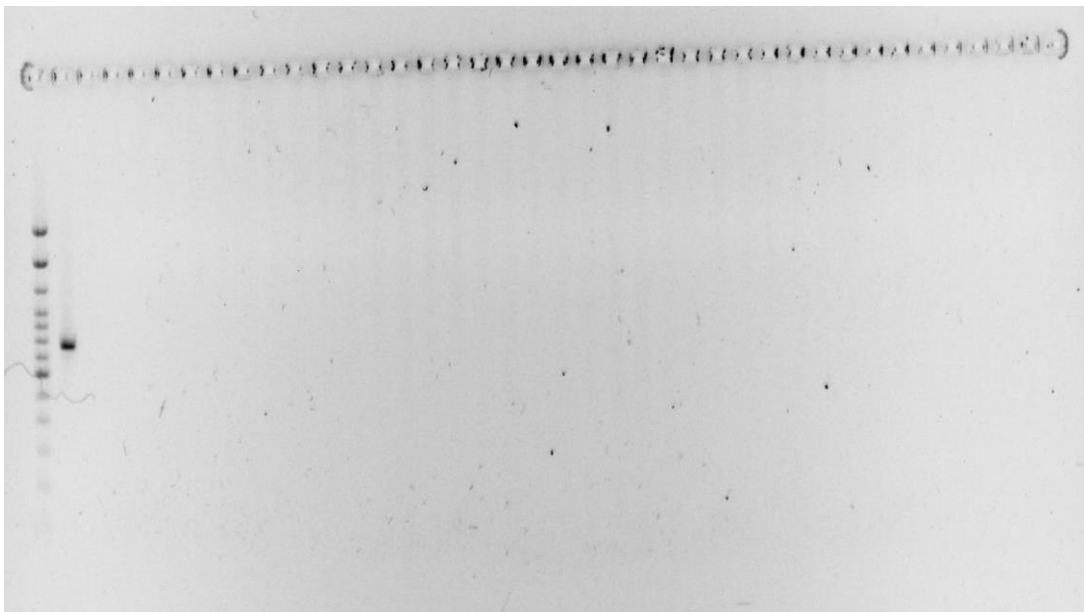
**Anexo 8.**

*Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana mediante el método Kirby-Bauer en cepas de K. pneumoniae*



**Anexo 9.**

*Análisis de la presencia del gen tetX mediante PCR y electroforesis*



**Anexo 1010.**

*División de Clústers respecto al porcentaje de aislados resistentes a Tigeciclina*

| <b>Antibióticos</b> | <b>Tamaño</b> | <b>TGC</b> |
|---------------------|---------------|------------|
| C3                  | 4             | 100.00     |
| C12                 | 7             | 100.00     |
| C2                  | 10            | 100.00     |
| C21                 | 9             | 50.00      |
| C22                 | 5             | 20,00      |
| C13                 | 4             | 25.00      |
| C9                  | 33            | 18.18      |
| C18                 | 10            | 10.00      |
| C1                  | 55            | 0.00       |
| C4                  | 34            | 0.00       |
| C5                  | 21            | 0.00       |
| C6                  | 7             | 0.00       |
| C7                  | 53            | 0.00       |
| C8                  | 4             | 0.00       |
| C10                 | 23            | 0.00       |
| C11                 | 19            | 0.00       |
| C14                 | 29            | 0.00       |
| C15                 | 4             | 0.00       |
| C16                 | 16            | 0.00       |
| C17                 | 10            | 0.00       |
| C19                 | 9             | 0.00       |
| C20                 | 8             | 0.00       |



**Anexo 11.**

*Distribución de la resistencia a tigeciclina en el Ecuador en el año 2020-2021*

