UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Prevalencia de betalactamasas AmpC en *Escherichia coli*, en muestras de urocultivos, durante el período 2023-2024

Verónica Michelle Quishpe Cuenca

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 18 de diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Prevalencia de betalactamasas AmpC en *Escherichia coli,* en muestras de urocultivos, durante el período 2023-2024

Verónica Michelle Quishpe Cuenca

Nombre del profesor, Título académico **Cristinta Chávez, MSc.**

Quito, 18 de diciembre de 2024

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Verónica Michelle Quishpe Cuenca

Código: 00320672

Cédula de identidad: 1723165930

Lugar y fecha: Quito, 18 de diciembre de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en http://bit.ly/COPETheses.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on http://bit.ly/COPETheses.

RESUMEN

Escherichia coli uropatogénica es el agente causal de la mayoría de las infecciones en vías urinarias, y el tratamiento de elección para este tipo de infecciones ha sido el uso de betalactámicos. No obstante, la resistencia bacteriana, mediada principalmente por la generación de betalactamasas (BL), representa un desafío clínico, ya que estas enzimas hidrolizan el anillo betalactámico, inactivando el efecto del antibiótico (Suárez & Gudiol, 2009). En el presente estudio se identificó dos BL: betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y de tipo AmpC, a partir de cepas de *E.coli* positivas para la infección en el tracto urinario durante el periodo abril 2023-2024. Los resultados mostraron una prevalencia de BLEE de 20.07% y 3.65% de AmpC. Asimismo, se observó una coexistencia de ambas betalactamasas en el 2.81% de las cepas analizadas. De manera adicional, 6 cepas, que corresponden al 1% del total, amplificaron para genes plasmídicos de AmpC correspondientes a la familia CIT (2) y DHA (4). Finalmente, en el análisis de susceptibilidad realizado se evidenció una alta resistencia a otros antibióticos como trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina, y una alta susceptibilidad a fosfomicina, nitrofurantoína e imipenem.

Palabras clave: AmpC, BLEE, resistencia antimicrobiana, cefalosporinas.

ABSTRACT

Uropathogenic *Escherichia coli* is the main causative agent of urinary tract infections and the treatment of choice for these infections has traditionally been the use of beta-lactam antibiotics. However, bacterial resistance, primarily mediated by the production of beta-lactamases (BL), represents a clinical challenge, due to these enzymes hydrolyze the beta-lactam ring, inactivating the effect of the antibiotic (Suárez & Gudiol, 2009). In this study, two types of beta-lactamases were identified: extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and AmpC, from *E. coli* strains isolated from urinary tract infections during the period April 2023-2024. The results showed an ESBL prevalence of 20.07% and an AmpC prevalence of 3.65%. Additionally, the coexistence of both beta-lactamases was observed in 2.81% of the analyzed strains. Furthermore, six strains, representing 1% of the total, were found to carry AmpC plasmid genes belonging to the CIT (2 strains) and DHA (4 strains) families. Finally, the susceptibility analysis revealed high resistance to other antibiotics, such as sulfamethoxazole-trimethoprim and ciprofloxacin, and a high susceptibility to fosfomycin, nitrofurantoin, and imipenem.

Key words: AmpC, ESBL, antimicrobial resistance, cephalosporins.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción 10

Métodos 13

Resultados 16

Discusión 18

Conclusiones 22

Tablas 23

Figuras 25

Referencias bibliográficas 28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas de cribado para AmpC 23

Tabla 2. AmpC plasmídica y amplificación del promotor AmpC 23

Tabla 3. Coexistencia BLEE y AmpC 24

Tabla 4. Pruebas fenotípicas y genotípicas para AmpC 24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mutación en el promotor, cepas no productoras de BL de espectro extendido.....25

Figura 2. Mutación en el promotor, cepas productoras de BL de espectro extendido.....25

Figura 3. Genes plasmídicos, cepas no productoras de BL de espectro extendido 26

Figura 4. Genes plasmídicos, cepas productoras de BL de espectro extendido 26

Figura 5. Susceptibilidad microbiana 27

INTRODUCCIÓN

Alrededor de 150 millones de personas son afectadas por infecciones bacterianas en el tracto urinario al año. Este tipo de infección se desarrolla cuando bacterias uropatógenas u oportunistas colonizan el aparato urinario afectando la uretra, vejiga, riñones, o próstata considerándose así una infección urinaria (IVU) (Choi et al., 2022) . Aproximadamente el 80% de estas infecciones son causadas por bacterias, siendo *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC) el responsable en la mayoría de los casos. Las infecciones bacterianas en el tracto urinario son más frecuentes en mujeres que en hombres, en personas entre 20 y 50 años. Sin embargo, en personas mayores de 50 años las infecciones urinarias se vuelven más frecuentes, tanto en mujeres como en hombres (Choi et al., 2022).

Durante los últimos 70 años, los antibióticos betalactámicos han sido utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas, tanto en el ámbito hospitalario como ambulatorio. Esta familia de antibióticos se caracteriza por la presencia del anillo betalactámico, el cual permite la inhibición de la pared celular bacteriana. Los betalactámicos se clasifican en: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de betalactamasas, estos últimos permiten restaurar la actividad original del antibiótico frente a microorganismos que han desarrollado resistencia mediante la producción de betalactamasas (BL) (Suárez & Gudiol, 2009). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2023), el uso indebido de estos fármacos ha acelerado el aumento de resistencia a estos antibióticos reduciendo así la efectividad de estos.

Las bacterias han evolucionado y desarrollado resistencia a los betalactámicos mediante diversos mecanismos como: la modificación o alflución en la diana en las proteínas de unión a las penicilinas (PBP), alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular y la generación de BL, siendo este último el principal mecanismo de resistencia. Las BL son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico del antibiótico inactivando su unión a PBP. Este

proceso puede estar mediado por plásmidos o ser cromosómicamente codificada (Suárez & Gudiol, 2009).

Existen diferentes tipos de BL y diferentes esquemas de clasificación. No obstante, el sistema Ambler es el más utilizado, se basa en la estructura de la enzima. Esta clasificación divide a las BL en 4 grupos: A, B, C y D (Hall & Barlow, 2005). Dentro del grupo A se encuentran las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) que hidrolizan las penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos (Carroll et al., 2019). Estas enzimas son principalmente mediadas por plásmidos. Por otro lado, las betalactamasas AmpC se encuentran en el grupo C que hidrolizan la mayoría de las cefalosporinas (excluyendo las de 4ta generación), penicilinas, cefamicinas y monobactámicos (Carroll et al., 2019). Estas enzimas pueden ser mediadas tanto por plásmidos como ser codificada cromosomalmente.

El gen AmpC se caracteriza por la variabilidad en su expresión ya que puede ser constitutiva o inducible (Meini et al., 2019). Adicionalmente, una AmpC a nivel cromosómico (cAmpC) se encuentra en bacterias Gram negativas. En el caso de *E.coli* una cAmpC es expresado constitutivamente por un promotor débil que se encuentra sujeto a atenuación. Sin embargo, mutaciones dentro de esta región pueden generar una sobreexpresión de la enzima, lo que genera resistencia a los diferentes antibióticos mencionados previamente (Tracz et al., 2007).

En contraste, las AmpC mediadas por plásmidos (pAmpC) derivan de AmpC cromosomal de algunas especies que lo generan intrínsicamente. En el presente estudio se trabajó con 6 familias plasmídicas: DHA proveniente de *Morganella morganii*, CIT de *Citrobacter freundii*, ACC de *Hafnia alvei*, MOX de *Aeromonas caviae*, EBC de *Enterobacter cloacae*, y FOX de *Aeromonas media* (Pérez-Pérez & Hanson, 2001).

La generación de enzimas tipo AmpC es menos frecuente que BLEE; no obstante, se encuentran en aumento. En Estados Unidos, se reportó una incidencia de pAmpC de 1.3% para

el 2016, cifra que para el 2019 incrementó a 3.42% (Rodríguez-Guerrero et al., 2022). Esto revela una creciente presencia de AmpC en *E.coli*. En contraste, existen países donde no se han reportado estudios epidemiológicos respecto a este fenómeno, lo que ha limitado el conocimiento de la prevalencia de AmpC. En consecuencia, la escasa información en estos lugares aumenta la probabilidad de presentarse fallas terapéuticas.

Por lo tanto, el objetivo principal del presente estudio es identificar la prevalencia de AmpC en *E. coli*. Además, analizar la coexistencia entre AmpC y BLEE a partir de cepas aisladas de urocultivos de pacientes ambulatorios del Laboratorio de Servicio USFQ, LABOMIC desde abril 2023 hasta abril 2024.

MÉTODOS

Declaración ética

La presente investigación fue aprobada por el Comité de Ética de Investigación de Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, bajo el código 2023-068IN.

Selección de cepas *E.coli* del año lectivo 2023-2024, para la identificación de cepas productoras de AmpC

Las cepas utilizadas dentro de esta investigación fueron obtenidas a partir del ceparío del Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco (LABOMIC). El criterio de selección fue: cepas de *E.coli* tanto productoras de BLEE como no productoras de BLEE. Estas cepas fueron aisladas dentro del periodo abril 2023 hasta abril 2024 a partir de muestras de orina positivas para infección del tracto urinario de pacientes ambulatorios.

Pruebas fenotípicas

Reactivación de cepas

Se reactivó las cepas criopreservadas a -80°C dentro del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ) en agar nutritivo mediante la técnica de agotamiento. Finalmente, se cultivó por 24 horas por 37 °C en una incubadora bacteriológica (BIOBASE).

Cribado de cepas sugerentes de AmpC y verificación de BLEE

A partir de las cepas reactivadas se realizó una prueba de resistencia a cefoxitina (FOX) lo cual permitió reconocer posibles *E.coli* productoras de cefalosporinasas (AmpC), además se volvió a confirmar la presencia BLEE. Ambos ensayos se realizaron utilizando la técnica de siembra Kirby-Bauer, para esto con un hisopo previamente esterilizado se tomó de una a dos colonias aisladas, dependiendo del tamaño, y se sumergió en 3 ml de solución salina hasta alcanzar una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland (Hudzicki, 2009). Se inoculó la bacteria en un medio de Muller Hinton y se colocaron los discos correspondientes: cefoxitina 30 µg

(FOX), para realizar un cribado de cepas sugerentes de AmpC; un disco de cefotaxima 30 µg (CTX), cefotaxima+ácido clavulánico 30 µg (CTX+CLA), ceftazidima 30 µg (CAZ), y ceftazidima+ácido clavulánico 30 µg (CAZ+CLA), para clasificar entre cepas productoras de BLEE y no productoras de BLEE. En ambos casos, se incubó durante 18-24 hrs a 37° C. Posteriormente, se midió los halos de inhibición de cada antibiótico mediante un calibrador de Vernier de la marca Mahr. Los halos ≤ 19 milímetros (mm) del disco de FOX fueron considerados como cepas sugerentes de AmpC (EUCAST, 2013). Por otro lado, se consideró como una cepa productora de BLEE cuando el halo del disco que contenía ácido clavulánico superaba en 5 mm a la cefalosporina sola.

Prueba de doble disco usando el inhibidor de cloxacilina

Aquellas cepas sugerentes de AmpC fueron sometidas a un segundo ensayo: prueba de doble disco usando como inhibidor la cloxacilina de la empresa Liofilchem. En esta prueba se miden los halos de inhibición de cefalosporinas de tercera generación combinadas con cloxacilina y las cefalosporinas solas. Se realizó un antibiograma mediante la técnica Kirby-Bauer con un Mc-Farland 0.5. Los discos empleados en este caso fueron CTC (cefotaxima+cloxacilina), CTX 30 µg, CAC (ceftazidima+cloxacilina) y CAZ 30 µg. Esta prueba fue considerada como positiva para AmpC cuando al menos uno de sus antibióticos con cloxacilina superaba 5mm a la cefalosporina sola.

Pruebas moleculares

Extracción de ADN por ebullición

A partir de las colonias de *E.coli* que fueron resistentes a cefoxitina, se realizó la extracción de ADN por la técnica de ebullición. Para esto, se sembró la cepa en agar nutritivo (AN) a través de la técnica de agotamiento. Posteriormente, se colocó 500 ul de agua grado PCR en un tubo eppedorf de 1.5 ml y se colocó de 7 a 10 colonias, dependiendo del tamaño. Seguidamente, se colocó por 15 minutos en agua hirviendo y se dejó en congelación por un día

a -20°C. Previo a la cuantificación se centrifugaron los tubos eppendorf a 13 000 rpm por 5 minutos y se conservó el sobrenadante (Güssow & Clackson, 1989).

Cuantificación

Al ADN extraído se realizaron diluciones con agua grado PCR en una relación 1:1 y 1:9. Posteriormente, se determinó la concentración y calidad de ADN en un espectrofotómetro NanoDrop Thermo Scientific™ de cada una de las muestras. Para los ensayos de cAmpC se utilizó una concentración de 10 ng, mientras que para los ensayos de PCR multiplex se utilizó una concentración entre 50 y 70 ng.

Amplificación del promotor

Para la identificación de cAmpC se realizó una PCR con los primers AB1 (GATCGTTCTGCCGCTGTG) (5′ a 3′) y ampC2 (GGGCAGCAAATGTGGAGCAA) (5′ a 3′) que amplifican para un fragmento de 271 pb. Las condiciones para este PCR fueron: 94°C por 90 segundos para la desnaturalización inicial. Al finalizar este proceso se reveló mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2% + SYBR Safe DNA a 80 minivoltios (mV) durante 60 minutos (Caroff et al., 2000).

PCR multiplex para AmpC plasmídico

Para la identificación de pAmpC se realizó una PCR multiplex que amplifica para: CIT (462pb), MOX (520 pb), DHA (405 pb), ACC (346 pb), FOX (190 pb) y EBC (302 pb). Las condiciones de la amplificación fueron: 94°C por 3 minutos para la desnaturalización inicial; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 64°C por 30 segundos, y elongación a 72°C por 1 minuto; y una elongación final a 72°C por 7 minutos. Las secuencias de los primers y condiciones de la PCR fueron obtenidas de Pérez-Pérez & Hanson (2002). Al finalizar este procedimiento se realizó una electroforesis con las mismas especificaciones de PCR para la amplificación del promotor.

RESULTADOS

Área de estudio

Durante el período abril 2023-abril 2024, se analizaron un total de 603 cepas de *E.coli* aisladas de muestras de orina que fueron positivas para infección del tracto urinario, estas muestras se remitieron al laboratorio LABOMIC. Dentro de este universo 121 fueron identificadas como BLEE y 482 fueron identificadas como no BLEE. La cepa número 9 (no BLEE) y 15 (BLEE) no correspondieron a *E.coli* mientras que la número 22 (BLEE) fue aislada a partir de la zona cloxal. Estas muestras no han sido consideradas dentro de las estadísticas ni en la discusión, no obstante, se evidencian sus pruebas moleculares en las figuras del 1 al 4.

Pruebas fenotípicas para la identificación de AMPc

Cribado de cepas sugerentes de AmpC usando la resistencia a la cefoxitina (FOX)

La prueba de cribado con el antibiótico FOX se realizó mediante la separación entre cepas FOX resistentes (sugerentes de AmpC) y FOX sensibles. De las 603 cepas analizadas se identificaron 38 cepas como sugerentes de AmpC, de las cuales 17 son BLEE y 21 corresponden a no BLEE.

Prueba de doble disco usando el inhibidor de cloxacilina

A las 38 cepas FOX resistentes se les realizó la prueba de doble disco para la detección de AMPc, inhibición con cloxacilina. En total, 22 cepas resultaron fenotípicamente positivas para AMPc, de las cuales 17 corresponden a BLEE y 5 a no BLEE.

Pruebas moleculares

Amplificación para AmpC cromosomal

A las 38 cepas FOX resistentes consideradas como sugerentes de AMPc se les realizó pruebas moleculares, para esto se realizó una PCR convencional dónde se amplificó el promotor de *E.coli*, 271 pb. Todas las cepas amplificaron para el promotor.

PCR multiplex

Asimismo, a las 38 cepas sugerentes de AmpC se les realizó una PCR multiplex para identificar familias de AmpC plasmídicas: CIT (462pb), MOX (520 pb), DHA (405 pb), ACC (346 pb), FOX (190 pb) y EBC (302 pb). De estas, 2 cepas amplificaron para CIT y 4 para DHA.

Susceptibilidad microbiana

Asimismo, se analizó la resistencia antimicrobiana de las 38 cepas FOX frente a antibióticos como: amoxicilina+ácido clavulánico 20/10 µg (AMC), cefazolina 30 µg (CZ), ceftazidima 30 µg (CAZ), cefuroxima 30 µg (CXM), trimetroprim 1.25 µg y sulfametoxazol 23.75 µg (SXT), nitrofurantoína 300 µg (F/M), fosfomicina 200 µg (FOS), ciprofloxacina 5 µg (CIP) e imipenem 10 µg (IMP), estos datos fueron recopilados de antibiogramas previos realizados en LABOMIC. Se evidenció un 47.37% de resistencia a AMC, 52.63% a CAZ, 62.63% a CXM, 55.26% a CZ, 55,26% SXT, 57,89% a CIP, 18,42% a FOS, 5.26% a F/M y 0% a IMP.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evaluó 603 cepas de *E.coli* aisladas a partir de urocultivos positivos para infección de vías urinarias, se investigó la prevalencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y de tipo AmpC. No obstante, se tuvo un enfoque en el estudio de AmpC, expresada tanto a nivel cromosómico como plasmídico. Las muestras utilizadas en el presente estudio corresponden a pacientes ambulatorios entre el año 2023-2024.

Primero, dentro del cribado fenotípico se obtuvo que 38 cepas (6.3 %) fueron resistentes a cefoxitina (FOX) (Tabla 1). FOX es un antibiótico ampliamente utilizado para la identificación de resistencia a cefamicinas por lo que determinar cepas resistentes a este antibiótico nos puede sugerir la presencia de betalactamasas que hidrolizan cefamicinas como es el caso de AmpC (Bala et al., 2020). Posteriormente, se realizó un segundo cribado para la identificación fenotípica de enzimas AmpC mediante la inhibición con cloxacilina, método fenotípico más utilizados para la detección enzimática de AmpC (EUCAST, 2013). En este cribado se obtuvo que el 3.65% (22 cepas) dieron un fenotipo positivo para AmpC (tabla 1). Sin embargo, se requiere realizar pruebas moleculares adicionales para la clasificación entre cAmpC y pAmpC, además de identificar el tipo de mutación y/o genes plasmídicos que tiene cada una de las cepas (Hinić et al., 2024).

Por otro lado, se observa que 16 cepas (2.65%) presentaron resistencia a FOX; no obstante, demostraron tener un fenotipo negativo en la prueba de inhibición con cloxacilina. En otras palabras, fenotípicamente no poseen la enzima AmpC por lo que la resistencia a FOX podría estar asociada a otros mecanismos de resistencia como mutaciones en los genes OmpF u OmpC. Esto genera una pérdida de porinas reduciendo la permeabilidad celular y limitando la entrada del antibiótico a la célula (Viveiros et al., 2007).

Ahora bien, en *Escherichia coli* la enzima AmpC puede derivarse tanto cromosomalmente (cAmpC) como plasmídicamente (pAmpC). En el primer caso, cAmpC es

transcrito constitutivamente por un promotor débil y un atenuador transcripcional. Estudios previos demostraron que tanto la región del promotor como la del atenuador tienden a acarrear mutaciones generando niveles alto de expresión de AmpC, dando así resistencia a los antibióticos mencionados en la introducción (Mulvey et al., 2004). Sin embargo, la mutación más relevante es aquella que genera un promotor fuerte ya que desestabilizan al atenuador, llegando a generar una sobreexpresión de hasta 46 veces lo que genera una resistencia fenotípica evidente (Tracz et al., 2007). Es por esta razón que para identificar una cAmpC se amplificó esta la región del promotor a las 38 cepas (tabla 2) que fenotípicamente fueron sugerentes de AmpC, el 100% amplificaron exitosamente para esta región de 271 pb (figura 1 y 2).

En contraste, se identificó que la incidencia de pAmpC fue del 1% (tabla 2), siendo CIT y DHA los genes plasmídicos más predominantes (figura 3 y 4). Estos resultados refuerzan investigaciones previas dónde CMY-2 (variante de la familia CIT) es la variante más prevalente alrededor del mundo (Da Silva et al., 2017). Este porcentaje obtenido en el presente estudio no pudo ser comparado con estadísticas presentes en el Ecuador debido a la ausencia de datos confiables. No obstante, cifras encontradas dentro de la región como en Argentina la prevalencia de pAmpC fue de 0.9% dónde CIT y DHA fueron los genes plasmídicos más comunes (Cejas et al., 2012). En contraste, la prevalencia de BLEE encontrada en nuestra investigación para el período abril 2023-2024 fue de 20.07% (tabla 3). Este resultado se relaciona con análisis realizado por Solís et al. (2022) dentro del Hospital Metropolitano de Quito en el año 2020 dónde la prevalencia de BLEE en *E.coli* fue del 18.31%.

Ahora bien, al analizar la coexistencia entre BLEE y AmpC se obtuvo un porcentaje de 2.81% (tabla 3). Asimismo, un estudio realizado en India a partir de *E.coli* UPEC resistentes a cefoxitina demostró que la coexistencia entre BLEE y AmpC es frecuente debido a que ambos tipos de resistencia se transmiten a través de plásmidos conjugativos. En consecuencia, se

identificó que estas cepas se encuentran asociadas a resistencias a múltiples antibióticos (Ghosh & Mukherjee, 2016). Adicionalmente, *Escherichia coli* ha demostrado tener una alta capacidad de adaptarse a distintos entornos debido a la transferencia horizontal de genes, proceso mediante el cual acumula genes de resistencia de otras bacterias, incluso de especies distintas (Poirel et al., 2018).

En contraste, es preocupante las cepas que fueron reportadas como no BLEE y poseían algún tipo de AmpC (0.83%) (tabla 3). Este hallazgo cobra relevancia clínica, ya que en estos casos puede ocurrir falla terapéutica al administrar cefalosporinas como tratamiento de elección, debido a la capacidad de AmpC para hidrolizar estos antibióticos. Por esta razón, se vuelve fundamental incluir de forma rutinaria el análisis de cefamicinas, como cefoxitina y cefotetan, en los antibiogramas (Carroll et al., 2019), lo que permite una mejor prescripción médica. Aunque la probabilidad de que este acontecimiento ocurra es baja, es importante considerarlo en el momento de la interpretación del antibiograma.

El Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos o EUCAST sugiere que detectar una pAmpC debe cumplir parámetros como: resistente ceftazidima (CAZ) y FOX así como presentar un fenotipo positivo en la prueba de inhibición con cloxacilina (Carroll et al., 2019).En la tabla 4 se observa que molecularmente se encontraron 6 genes plasmídicos, los cuales se ajustaron dentro de este perfil. Sin embargo, 16 cepas con este perfil no demostraron poseer una pAmpC. Esto nos revela que aún no es posible diferenciar fenotípicamente entre una AmpC cromosomal y plasmídica, es por esto que es relevante realizar pruebas moleculares para verificar la presencia el origen de la resistencia a cefamicinas.

De igual forma, en la figura 5 se observa un análisis de susceptibilidad microbiana de las 38 cepas identificadas como FOX resistentes, dónde se evaluó la resistencia hacia a otras familias de antibióticos utilizado para un antibiograma de rutina. Se identificó que existe una

alta resistencia a la amoxicilina+ácido clavulánico y a todas las cefalosporinas analizadas, teniendo una resistencia de más del 50%. Esto se debe en gran parte a la presencia de BLEE y/o AmpC que generan resistencia a esta clase de antibióticos. Asimismo, se evidencia una alta resistencia a trimetroprim/sulfametoxazol (SXT) y ciprofloxacina (CIP). Si bien la resistencia a estos antibióticos no se encuentra directamente relacionados a las BL analizadas, se sugiere que existen otros mecanismos por lo cual las cepas han presentado resistencia, dentro de estas se encuentran bombas de eflujo para bombear activamente los antibióticos hacia el exterior de la célula, disminución en la permeabilidad externa reduciendo así el ingreso del antibiótico y generación de biofilms (Muteeb et al., 2023). Asimismo, la alta probabilidad de acarrear genes adicionales de resistencia dentro de un mismo plásmido como es el caso del clon *E.coli* ST131, el cual se asocia fuertemente con la resistencia de cefalosporinas y anfluoroquinolonas (Mathers et al., 2015).

En contraste, se evidenció una baja tasa de resistencia a fosfomicina (FOS), nitrofurantoina (F/M) e imipenem (IMP). Este resultado concuerda con el estudio realizado en Quito dónde F/M y FOS presentaron un bajo índice de resistencia y una ausencia de cepas resistentes al carbapenémico (Solís et al., 2022). Estos resultados son alentadores ya que tanto FOS como F/M siguen siendo antibióticos de primera línea para el tratamiento de UTIs no complicadas (Raja, 2019). Asimismo, la ausencia en la resistencia ante IMP indica inexistencia de carbapenemasas dentro de las cepas analizadas, otra problemática creciente a nivel mundial.

CONCLUSIONES

Se determinó que el 6.3% de las cepas analizadas presentan una resistencia a cefamicinas, en la mayoría de los casos esto se debe a la presencia de BL AmpC mientras en el resto puede darse por otros mecanismos de resistencia antibióticos. Dentro de los análisis moleculares se obtuvo que el 100% amplificaron para la región del promotor, por lo que se recomienda realizar un secuenciamiento del promotor amplificado. Esto nos permitirá identificar el tipo de mutación que presenta cada una de las cepas. Asimismo, la prevalencia de pAmpC es del 1%, dónde se encontró genes plasmídicos de CIT y DHA. Este dato es uno de los primeros que se puede encontrar dentro del Ecuador, realizados a partir de urocultivos. De este modo, la prevalencia de BLEE encontrada fue del 20.07% dónde el 2.65% de las cepas analizadas presentó una coexistencia entre BLEE y AmpC. Es relevante el estudio de pAmpC debido a que la diseminación de resistencia bacteriana está estrechamente relacionada por la transferencia de plásmidos. Estos elementos genéticos móviles no solo poseen genes de resistencia AmpC, sino también se encuentran asociados con resistencia a otras clases de antibióticos. Finalmente, las sugerencias por parte del EUCAST no se correlacionan con nuestros datos ya que la inhibición con cloxacilina y la resistencia a FOX y CAZ, no necesariamente indican una AmpC plasmídica.

TABLAS

Tabla 1. Prueba de cribado para AmpC

Prueba	Interpretación	Número de aislamientos	
Cefoxitina (FOX)	Resistente	38	6,3%
	Sensible	565	93,7%
	Total	**603**	100%
Inhibición con cloxacilina	Positivo	22	3,65%
	Negativo	16	2,65%
	Total	**38**	6,3%

Descripción: Esta tabla muestra que 38 cepas mostraron resistencia a cefoxitina y en el segundo cribado (inhibición con cloxacilina) 22 cepas (BLEE y no BLEE) arrojaron un fenotipo positivo en esta prueba.

Tabla 2. AmpC plasmídica y amplificación del promotor AmpC

Característica		Número de cepas	Porcentaje
Amplificación del promotor AmpC		38	6.3%
AmpC plásmido (pAmpC)	DHA	4	1%
	CIT	2	
	Total	6	

Descripción: En la tabla se muestra que todas las cepas analizadas molecularmente amplificaron para la región del promotor, 38 cepas. Por otro lado, 6 cepas demostraron tener una pAmpC, DHA (4) y CIT (2).

Tabla 3. Coexistencia BLEE y AmpC

Característica	Aislamientos	Total (603)
	Cantidad de cepas	**Porcentaje**
Productora de BLEE	121	20.07%
Productora de BLEE + AmpC	17	2,81%
No productora de BLEE + AmpC	5	0.83%

Descripción: En la tabla se muestra que de las 603 cepas analizadas, hubo una prevalencia de BLEE del 20.07% y 0.83% solo de AmpC. Adicionalmente, se obtuvo que el 2.81% de las cepas poseen tanto BLEE como AmpC.

Tabla 4. Pruebas fenotípicas y genotípicas para AmpC

	Pruebas fenotípicas			**Pruebas moleculares**	
	Inhibición con cloxacilina	FOX	CAZ	pAmpC	cAmpC
BLEE	17	17	17	3	14
No BLEE	5	5	3	3	2

Descripción: En la tabla se muestra que 22 cepas (17 BLEE y 5 no BLEE) dieron positivo para el cribado con inhibición con cloxacilina, de igual manera las 22 cepas fueron FOX resistentes. Sin embargo, solo 20 cepas fueron resistentes a CAZ (17 BLEE y 3 no BLEE). Adicionalmente, de todas estas cepas analizadas solo 6 cepas demostraron tener una pAmpC, por lo que se infiere que el resto de cepas (16) poseen una cAmpC.

FIGURAS

Figura 1. Mutación en el promotor, cepas no productoras de BL de espectro extendido

Descripción: En la figura se muestra el resultado de la electroforesis realizada en gel de agarosa al 2%, para amplificar la región del promotor de cepas no productoras de BLEE. La cepa #9 no corresponde a *E.coli* por lo que no fue tomado en cuenta en este estudio, no obstante se encuentra representado en la figura.

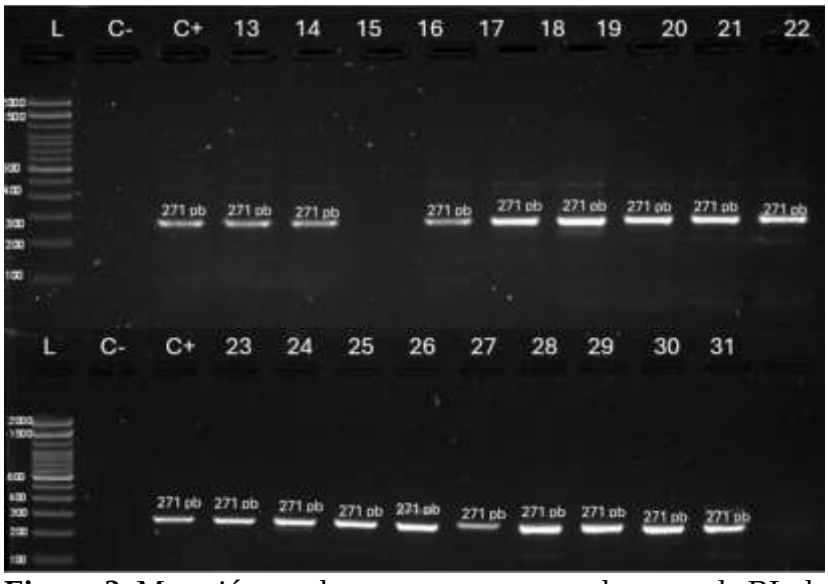

Figura 2. Mutación en el promotor, cepas productoras de BL de espectro extendido

Descripción: En la figura se muestra el resultado de la electroforesis realizada en gel de agarosa al 2%, para amplificar la región del promotor de cepas productoras de BLEE. La cepa #15 no corresponde a *E.coli*, mientras que la cepa #22 se aisló a partir de una la zona cloxal. Ambas cepas no fueron tomadas en cuenta en este estudio, no obstante se encuentran representadas en la figura.

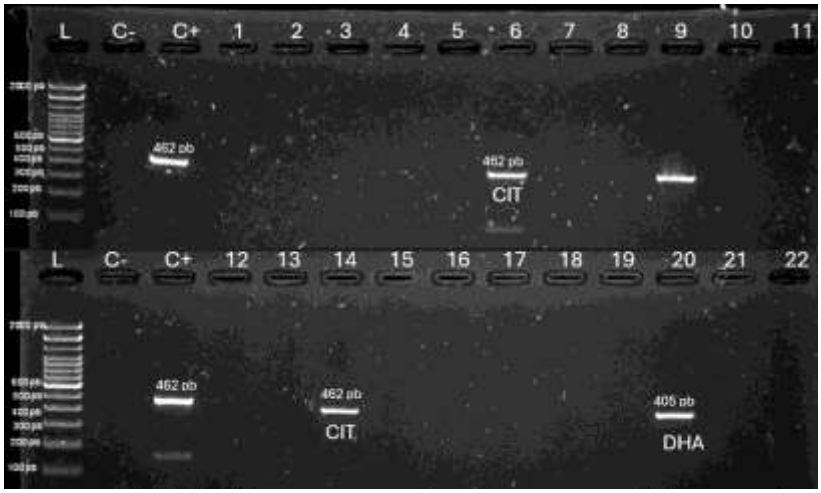

Figura 3. Genes plasmídicos, cepas no productoras de BL de espectro extendido

Descripción: En la figura se muestra el resultado de la electroforesis realizada en gel de agarosa al 2%, para amplificar la existencia de genes plasmídicos de cepas no productoras de BLEE. La cepa # 6 y 5 amplificaron para CIT mientras que la #20 para DHA. Por otro lado, la cepa 6 y 14 amplificó para CIT y la cepa 20 para DHA. La cepa #9 no corresponde a *E.coli* por lo que no fue tomado en cuenta en este estudio, no obstante se encuentra representado en la figura.

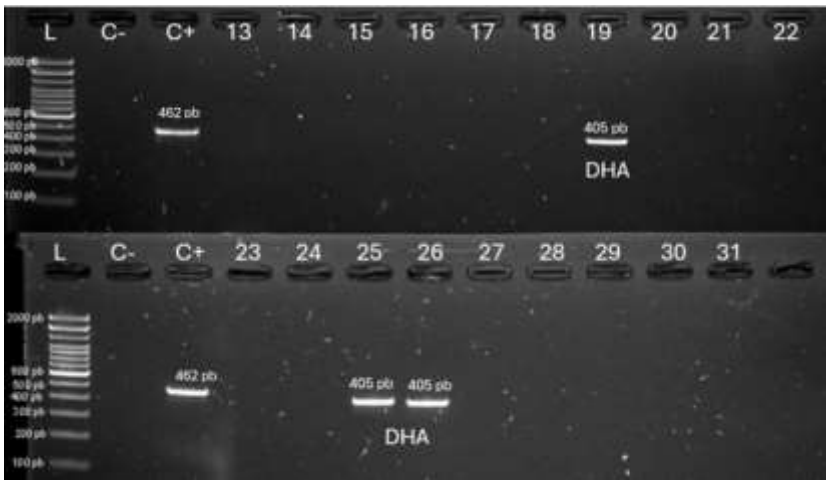

Figura 4. Genes plasmídicos, cepas productoras de BL de espectro extendido

Descripción: En la figura se muestra el resultado de la electroforesis realizada en gel de agarosa al 2%, para amplificar %, para amplificar la existencia de genes plasmídicos de cepas productoras de BLEE. La cepa # 19, #25 y #26 amplificaron para DHA. Por otro lado, la cepa #15 no corresponde a *E.coli*, mientras que la cepa #22 se aisló a partir de una la zona cloxal. Ambas cepas no fueron tomadas en cuenta en este estudio, no obstante se encuentran representadas en la figura.

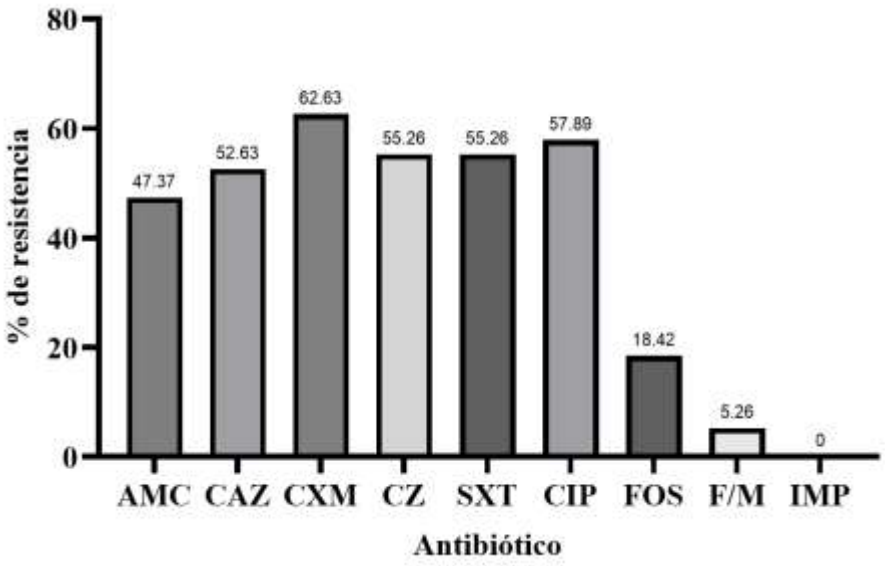

Figura 5. Susceptibilidad microbiana

Descripción: En la presente figura se observa un alto porcentaje de resistencia a AMC, CAZ, CXM, CZ, SXT y CIP. Sin embargo, se obtuvo un bajo porcentaje de resistencia para FOS, FM e IMP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bala, R., Singh, V. A., Gupta, N., & Rakshit, P. (2020). Prevalence, multidrug-resistance and risk factors for AmpC β-lactamases producing *Escherichia coli* from hospitalized patients. *The Journal Of Infection In Developing Countries*, *14*(12), 1466-1469. https://doi.org/10.3855/jidc.13483

Caroff, N., Espaze, E., Gautreau, D., Richet, H., & Reynaud, A. (2000). Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, *45*(6), 783-788. https://doi.org/10.1093/jac/45.6.783

Carroll, K. C., Pfaller, M. A., Landry, M. L., McAdam, A. J., Patel, R., Richter, S. S., & Warnock, D. W. (2019). *Manual of Clinical Microbiology*. John Wiley & Sons.

Cejas, D., Fernández Canigia, L., Quinteros, M., Giovanakis, M., Vay, C., Lascialandare, S., Mutti, D., Pagniez, G., Almuzara, M., Gutkind, G., & Radice, M. (2012). Plasmid-Encoded AmpC (pAmpC) in Enterobacteriaceae: epidemiology of microorganisms and resistance markers. Revista Argentina de microbiologia, 44(3), 182–186.

Choi, H. J., Jeong, S. H., Shin, K. S., Kim, Y. A., Kim, Y. R., Kim, H. S., Shin, J. H., Shin, J. H., Uh, Y., Bae, S., Yoon, E., & Yoo, J. S. (2022). Characteristics of *Escherichia coli* Urine Isolates and Risk Factors for Secondary Bloodstream Infections in Patients with Urinary Tract Infections. *Microbiology Spectrum*, *10*(4). https://doi.org/10.1128/spectrum.01660-22

Da Silva, K. C., Cunha, M. P. V., Cerdeira, L., de Oliveira, M. G. X., de Oliveira, M. C. V., Gomes, C. R., … Moreno, A. M. (2017). High-virulence CMY-2- and CTX-M-2-producing avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from commercial

turkeys. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 87(1), 64–67. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.001

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2013). Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance (Version 1.0). https://www.amcli.it/wp-content/uploads/2015/10/EUCAST_detection_resistance_mechanisms_V1.pdf

Ghosh, B., & Mukherjee, M. (2016). Emergence of co-production of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase and ESBL in cefoxitin-resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *35*(9), 1449-1454. https://doi.org/10.1007/s10096-016-2683-z

Güssow, D., & Clackson, T. (1989). Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. Nucleic Acids Research, 17(10), 4000. https://doi.org/10.1093/nar/17.10.4000

Hall, B. G., & Barlow, M. (2005). Revised Ambler classification of β-lactamases. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, *55*(6), 1050-1051. https://doi.org/10.1093/jac/dki130

Hinić, V., Seth-Smith, H. M., Stammler, S., & Egli, A. (2024). Rapid detection of plasmid-mediated AmpC-producers by eazyplex® SuperBug AmpC assay compared to whole-genome sequencing. *Journal Of Microbiological Methods*, *221*, 106938. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2024.106938

Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American society for microbiology, 15(1), 1-23.

Mathers, A. J., Peirano, G., &te Pitout, J. D. D. (2015). The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 565-591. https://doi.org/10.1128/cmr.00116-14

Matinfar, S., Ahmadi, M., Sisakht, A. M., Sadeghi, J., & Javedansirat, S. (2021). Phylogenetic and antibiotics resistance in extended-spectrum B-lactamase (ESBL) Uropathogenic *Escherichia coli*: An update review. *Gene Reports*, *23*, 101168. https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101168

Meini, S., Tascini, C., Cei, M., Sozio, E., & Rossolini, G. M. (2019). AmpC β-lactamase-producing Enterobacterales: what a clinician should know. *Infection*, *47*(3), 363-375. https://doi.org/10.1007/s15010-019-01291-9

Mulvey, M. R., Bryce, E., Boyd, D. A., Ofner-Agostini, M., Land, A. M., Simor, A. E., & Paton, S. (2004). Molecular Characterization of Cefoxitin-Resistant *Escherichia coli* from Canadian Hospitals. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, *49*(1), 358-365. https://doi.org/10.1128/aac.49.1.358-365.2005

Muteeb, G., Rehman, M. T., Shahwan, M., & Aatif, M. (2023). Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. Pharmaceuticals, 16(11), 1615. https://doi.org/10.3390/ph16111615

Pérez-Pérez, F. J., & Hanson, N. D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC betalactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, 40(6), 2153-2162. https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002

Poirel, L., Madec, J., Lupo, A., Schink, A., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, *6*(4). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017

Raja, N. S. (2019). Oral treatment options for patients with urinary tract infections caused by extended spectrum βeta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae. Journal of Infection and Public Health, 12(6), 843–846. https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2019.05.012

Rodríguez-Guerrero, E., Callejas-Rodelas, J. C., Navarro-Marí, J. M., & Gutiérrez-Fernández, J. (2022). Systematic Review of Plasmid AmpC Type Resistances in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and Preliminary Proposal of a Simplified Screening Method for ampC. *Microorganisms*, *10*(3), 611. https://doi.org/10.3390/microorganisms10030611

Solís, M. B., Romo, S., Granja, M., Sarasti, J. J., Miño, A. P. Y., & Zurita, J. (2022). Infección comunitaria del tracto urinario por *Escherichia coli* en la era de resistencia antibiótica en Ecuador. *Metro Ciencia, 30*(1), 37-48. https://doi.org/10.47464/metrociencia/vol30/1/2022/37-48

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

Tracz, D. M., Boyd, D. A., Hizon, R., Bryce, E., McGeer, A., Ofner-Agostini, M., Simor, A. E., Paton, S., & Mulvey, M. R. (2007). ampCgene expression in promoter mutants of cefoxitin-resistantEscherichia coliclinical isolates. *FEMS Microbiology Letters*, *270*(2), 265-271. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00672.x

Viveiros, M., Dupont, M., Rodrigues, L., Couto, I., Davin-Regli, A., Martins, M., Pagès, J., & Amaral, L. (2007). Antibiotic Stress, Genetic Response and Altered Permeability of *E. coli*. *PLoS ONE*, *2*(4), e365. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000365

World Health Organization: WHO. (2023). *Resistencia a los antimicrobianos*. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance