

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Determinación de β -lactamasas AmpC en *Escherichia coli*
productora de BLEE, en muestras de urocultivos de pacientes
ambulatorios, durante el año 2014 y el año 2023**

Bryan Rodrigo Coro Chicaiza

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 20 de diciembre de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Determinación de β -lactamasas AmpC en *Escherichia coli* productora de BLEE, en muestras de urocultivos de pacientes ambulatorios, durante el año 2014 y el año 2023

Bryan Rodrigo Coro Chicaiza

Nombre del profesor, Título académico

Cristina Chávez, MgS

Quito, 20 de diciembre de 2023

© 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: Bryan Rodrigo Coro Chicaiza

Código: 00212865

Cédula de identidad: 1753382819

Lugar y fecha: Quito, 20 de diciembre de 2023

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UNPUBLISHED DOCUMENT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

La producción de β -lactamasas por parte de *Escherichia coli* (*E. coli*) es el principal mecanismo de resistencia a los β -lactámicos. Dentro de este grupo se encuentran: β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), cefalosporinasas (AmpC) y carbapenemasas (Bush & Bradford, 2020) (Ghafourian et al., 2015). Existen limitaciones entorno a la detección de las β -lactamasas AmpC, tales como: la falta de un método estandarizado para su detección, prevalencia variable de estas enzimas acorde al tipo y localización geográfica. Por lo que se han vuelto una preocupación clínica cada vez mayor, ya que al igual que las BLEE, contribuyen a la propagación incontrolada de la resistencia bacteriana. Esto supone una limitación en el uso de los antibióticos β -lactámicos, provocando fracasos terapéuticos y obligando al uso de fármacos de espectro más amplio (Sageerabano et al., 2015). En el presente estudio se buscó determinar la coexistencia de BLEE y AmpC en *E. coli* aisladas de urocultivos de pacientes ambulatorios durante el año 2014 y el año 2023, a través de pruebas fenotípicas y caracterizar la misma a través de pruebas moleculares buscando AmpC plasmídicas y aquellas mediadas por mutación en el promotor. Además, se realizó un ensayo de conjugación bacteriana cuyo resultado fue una transferencia efectiva del plásmido que lleva el gen CIT que da resistencia a AmpC, esto demuestra que AmpC plasmídico tiene una gran capacidad para movilizarse. La prevalencia de coexistencia de β -lactamasas tipo AmpC y BLEE en las cepas de *E. coli* correspondieron al 0,57% para los aislados de 2014 y del 0,37% para los aislados de 2023.

Palabras clave: BLEE, AmpC, conjugación, coexistencia, resistencia antimicrobiana

ABSTRACT

The production of β -lactamases by *Escherichia coli* (*E. coli*) is the main mechanism of resistance to β -lactams. Within this group are extended-spectrum β -lactamases (ESBL), cephalosporinases (AmpC) and carbapenemases (Bush & Bradford, 2020) (Ghafourian et al., 2015). There are limitations regarding the detection of AmpC β -lactamases, such as: the lack of a standardized method for their detection, variable prevalence of these enzymes according to the type and geographical location. This has made them an increasing clinical concern since, like ESBLs, they contribute to the uncontrolled spread of bacterial resistance. This represents a limitation in the use of β -lactam antibiotics, causing therapeutic failures and forcing the use of broader spectrum drugs (Sageerabano et al., 2015). In the present study, we sought to determine the coexistence of ESBL and AmpC in *E. coli* isolated from urine cultures of outpatients during the year 2014 and 2023, through phenotypic tests and to characterize it through molecular tests looking for plasmid AmpC and those mediated by mutation in the promoter. In addition, a bacterial conjugation test was carried out, the result of which was an effective transfer of the plasmid that carries the CIT gene that gives resistance to AmpC, this demonstrates that AmpC plasmidic has a great capacity to mobilize. The prevalence of coexistence of AmpC-type β -lactamase and ESBL in *E. coli* strains corresponded to 0.57% for the 2014 isolates and 0.37% for the 2023 isolates.

Key words: ESBL, AmpC, conjugation, coexistence, antimicrobial resistance

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	4
Métodos.....	8
Resultados	11
Área de estudio	11
Pruebas fenotípicas para identificación de AmpC	11
Prueba de cribado con Cefoxitina	11
Prueba confirmatoria de AmpC	11
Pruebas moleculares para identificación de AmpC	12
PCR convencional para identificación de AmpC mediada por mutación en el promotor	12
PCR multiplex para identificación de AmpC mediada por plásmidos	12
Conjugación bacteriana.....	12
Coexistencia de BLEE y AmpC en <i>E. coli</i>	13
Discusión.....	14
Conclusiones	18
Referencias bibliográficas.....	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prueba de cribado para identificación fenotípica preliminar de AmpC.....	19
Tabla 2. Prueba confirmatoria para identificación fenotípica de AmpC	19
Tabla 3. Identificación molecular de AmpC mediada por mutación en el promotor	20
Tabla 4. Identificación molecular de AmpC plasmídico	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de AmpC en <i>E. coli</i> productora de BLEE durante el año 2014 y el año 2023.....	21
---	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Prevalencia de blee en <i>E. coli</i> aisladas de urocultivos durante el año 2014 y el año 2023.....	25
Anexo 2. Patrones fenotípicos y genotípicos de las cepas empleadas en el estudio.....	26
Anexo 3. Perfil de resistencia antimicrobiana de <i>E. coli</i> productora de BLEE y AmpC.	27
Anexo 4. Amplificación de betalactamasas AmpC	28

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 70 años, los β -lactámicos han sido ampliamente empleados como agentes terapéuticos para el tratamiento de infecciones bacterianas. Sin embargo, su uso excesivo, ha conllevado a la aparición de microorganismos multirresistentes. Se han descrito tres mecanismos generales por los que las bacterias adquieren resistencia a los β -lactámicos: 1) bloqueo de la unión entre los antibióticos y las proteínas de unión a las penicilinas (PBP) diana, 2) modificación de la unión del antibiótico a las PBP y 3) hidrólisis del antibiótico por enzimas β -lactamasas, al degradar el anillo betalactámico (Bush, 2018).

Dentro de la familia de las β -lactamasas se incluyen: betalactamasas de espectro extendido, cefalosporinas AmpC y carbapenemasas (Bush & Bradford, 2020). Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), pertenecen a las clases moleculares A y D de Ambler y al grupo 2 de la clasificación de Bush-Jacoby y Medeiros. Estas enzimas tienen la capacidad de conferir resistencia o sensibilidad disminuida a penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam) (Navarro et al., 2011). No pueden hidrolizar a las cefamicinas (cefotitina), ni carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem) y son inhibidas por el ácido clavulánico.

Por otro lado, las β -lactamasas AmpC pertenecen a la clase molecular C de la clasificación de Ambler y al grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby y Medeiros. Estas enzimas confieren resistencia a las oximino-cefalosporinas, los monobactámicos y las cefamicinas (cefotitina y cefotetán). Son inhibidas por la cloxacilina, el aztreonam y el ácido borónico y a diferencia de las BLEE, no son inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Ghafourian et al., 2015) (Navarro et al., 2011) (Jacoby, 2009). Estas cefalosporinas se encuentran con mayor frecuencia en el cromosoma de muchas especies de bacterias Gram negativas como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae complex* y *Serratia*

marcescens. Ahora también se encuentran ampliamente distribuidas en plásmidos (Yan et al., 2006) y dado que poseen una gran capacidad para movilizarse, constituyen un importante reservorio para un amplio rango de infecciones y resistencia antimicrobiana.

La primera variante de AmpC codificada por plásmidos se identificó en 1989 en una *Klebsiella pneumoniae* aislada en Corea del Sur. En la década siguiente, empezaron a informarse sobre varias familias de variantes de AmpC codificadas por plásmidos, especialmente en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* (Bush & Bradford, 2020). Este grupo de β -lactamasas AmpC están codificadas por genes blaAmpC asociados a integrones de clase 1 o transposones, localizados en plásmidos conjugativos (AmpC plasmídicas). Se clasifican en 6 familias, cada una de ellas deriva del AmpC cromosomal de una bacteria que lo produce de manera natural: CIT (de *Citrobacter freundii*), DHA (de *Morganella morganii*), ACC (de *Hafnia alvei*), FOX (de *Aeromonas media*), MOX (de *Aeromonas caviae*) y EBC (de *Enterobacter cloacae* y/o *Enterobacter asburiae*) (Martínez Rojas, 2009).

Otra de las causas más comunes en cuanto a la sobreexpresión de AmpC en aislados clínicos son las mutaciones en regiones atenuadoras o promotoras. Una mutación en el gen regulador *ampD*, por ejemplo, conduce a una hiperproducción constitutiva, al igual que mutaciones en *ampR* pueden dar lugar a fenotipos altamente constitutivos o hiperinducibles. Por último, las mutaciones menos comunes son en *ampG* (proteína transmembrana encargada del transporte de oligopéptidos implicados en el reciclaje de la pared celular y la regulación del AmpC al citosol), y pueden derivar en una expresión constitutiva de bajo nivel. En el caso de *E. coli* al carecer de un gen *ampR* esta no es inducible y está regulada por mecanismos promotores y atenuadores (Jacoby, 2009). En ausencia de estos genes reguladores el gen se expresa de manera constitutiva por mutaciones en el atenuador y/o promotor del gen. Cuando se expresa

de manera inducible su grado de expresión va a depender del tipo de inductor (Calvo et al., 2011), siendo la ceftioxitina y los carbapenémicos los inductores más fuertes.

Las AmpC plasmídicas (pAmpC) tienen mayor relevancia frente a las AmpC por mutación en el promotor debido a su gran capacidad para movilizarse, y transferir plásmidos, tanto en ambientes nosocomiales como comunitarios (Mendieta et al., 2021). Debido a la falta de un método estandarizado para su detección no están disponibles datos exactos sobre su prevalencia, lo que sugiere que la misma será variable acorde al tipo de enzima y a la localización geográfica.

En Canadá, la prevalencia de pAmpC ha ido en aumento desde 1999 predominando el gen blaCYM-2, en 2005 el estudio de (Mulvey et al., 2005) realizado en 12 hospitales observó que el 11% de los *E. coli* resistentes a ceftioxitina producían pAmpC y años más se observaron que las *E. coli* resistentes a ceftioxitina ya alcanzaban un 30,5%, detectándose principalmente en muestras urinarias procedentes de pacientes ambulatorios (Pitout et al., 2007) (Mulvey et al., 2005). En Francia, un estudio llevado a cabo entre 2004 y 2008, el 6% de *E. coli* estudiados presentaban resistencia a ceftioxitina y eran portadores de la variante blaCMY-2 (Corvec et al., 2010). En tres centros hospitalarios del Reino Unido, en el año 2004, tras un screening inicial de aislados resistentes a ceftioxitina, de 67 muestras de *E. coli*, 32 (49%) eran productores de AmpC plasmídico (Woodford et al., 2007).

En la India, un estudio de 2019 encontró una prevalencia de 42,2 % de *E. coli* productoras de AmpC siendo el gen blaFOX el predominante con un 21,9% de incidencia en las AmpC confirmadas (Govindaswamy et al., 2019). En Taiwán, en un estudio multicéntrico de 2003, de 127 aislados de *E. coli* el 43,6% presentaron sensibilidad disminuida a las cefalosporinas de espectro extendido y eran productores de AmpC plasmídico (Yan et al., 2006). En Ecuador en un estudio realizado en 2017, se identificaron a través de pruebas fenotípicas 40 cepas de *E.*

coli aisladas de urocultivos de las cuales el 15 % correspondía a cepas productoras de BLEE y el 5 % a cepas de β -lactamasas tipo AmpC, con mayor prevalencia en mujeres de 51 a 60 años de edad (Toro, 2017). De igual modo, en otro estudio documental transversal realizado en 2020 en el Laboratorio Clínico Neolab de la ciudad de Cuenca en Ecuador, se reportó que el 7,62% de las muestras analizadas resultaron ser BLEE positivas; mientras que apenas solo el 0.13% eran cepas productoras de AmpC (Mendieta et al., 2021). Sin embargo, también se han logrado aislar microorganismos con resistencia a los betalactámicos de animales de granja, en un estudio de tipificación fenotípica y molecular de BLEE/AmpC en *E. coli* aisladas de pollos broiler, se identificó un nivel de resistencia a β -lactámicos >70% (Mantilla, 2019). De igual modo, en otro estudio de prevalencia de *E. coli* BLEE/AmpC aisladas de heces caninas en un parque público de Quito , 2 aislados presentaron la variante blaCMY-2 (Ortega-Paredes et al., 2019).

Las enfermedades producidas por microorganismos multirresistentes reducen las alternativas de tratamiento, derivando así en tratamientos más costosos, tiempo prolongando de recuperación y un aumento en el riesgo de mortalidad (Serra, 2017). Si bien las β -lactamasas AmpC se encuentran frecuentemente codificadas a nivel cromosómico, también es común encontrar este mecanismo de resistencia en especies no productoras de AmpC como *Salmonella* spp, *Klebsiella* spp y *E. coli*, por lo que se han vuelto una preocupación clínica ya que contribuye a la propagación de resistencia bacteriana. Esto supone una limitación en el uso de los antibióticos β -lactámicos, provocando fracasos terapéuticos y obligando al uso de fármacos de espectro más amplio (Sageerabano et al., 2015). Por ende, el presente estudio buscó caracterizar AmpC en *E. coli* BLEE aisladas de urocultivos de pacientes ambulatorios, a través pruebas fenotípicas y moleculares para conocer el tipo de AmpC que está circulando en la población ambulatoria que presenta infecciones de vías urinarias.

MÉTODOS

Declaración ética

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

Selección de cepas *E. coli* productoras de BLEE del año 2014 y del año 2023, para identificación de cepas productoras de AmpC

Para el desarrollo de esta investigación se usaron las cepas de *E. coli* productoras de BLEE del cepario del Laboratorio de Servicios de la Universidad San Francisco de Quito, LABOMIC, almacenadas durante el año 2014 y 2015. Así como las cepas almacenadas para este proyecto durante abril-septiembre de 2023. Los criterios de inclusión son: cepas de *E. coli* productoras de BLEE, aisladas de urocultivos de pacientes ambulatorios y confirmadas como el agente causal de la infección.

Pruebas fenotípicas

Reactivación de cepas *E. coli* productoras de BLEE.

Para la reactivación de cepas *E. coli* que estaban almacenadas bajo criopreservación, se empleó el método descrito por (Balows, 2003).

Prueba de cribado para la determinación de cepas sugerentes de AmpC.

Se utilizó el disco antibiótico cefoxitina mediante la técnica de Kirby Bauer. Se preparó el inóculo bacteriano para cada cepa, llegando a una turbidez de 0,5 de la escala McFarland. En el inóculo se sumergió, un hisopo de algodón esterilizado y se procedió a inocular la superficie de la placa de agar de Mueller-Hinton ^{BD DIFCO™} (MH) con el hisopo, pasándolo por toda la superficie del medio en tres direcciones. Posterior, con unas pinzas estériles, se colocó el disco antibiótico cefoxitina 30µg ^{BD BBL™} (FOX), sobre la superficie del agar MH, se incubó la caja

a 37° C durante 18-24 horas. Por último, se midieron los halos de inhibición con un calibrador de la marca Mahr y se interpretaron los resultados. La prueba fue considerada positiva si el halo de inhibición era ≤ 18 milímetros (mm).

Prueba fenotípica del doble disco para AmpC.

Todas las cepas resistentes a Cefoxitina fueron sometidas a la prueba del doble disco de Liofilchem, para la identificación fenotípica confirmatoria de AmpC. También se empleó la técnica de Kirby Bauer, con los discos antibióticos cefotaxima 30 μ g (CTX), ceftazidima 30 μ g (CAZ), cefotaxima más cloxacilina 30 μ g (CTC) y ceftazidima más cloxacilina 30 μ g (CAC). La prueba fue considerada positiva si el diámetro de la zona de inhibición de al menos uno de los discos antibióticos más cloxacilina (CTC y/o CAC) era ≥ 5 mm con respecto a los discos antibióticos sin cloxacilina (CTX y/o CAZ).

Pruebas moleculares

Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se empleó con modificaciones la técnica de extracción por ebullición, siguiendo el método de (Güssow & Clackson, 1989).

Cuantificación de ADN.

Se realizaron diluciones de ADN en agua grado PCR en una relación 10:90 y 50:50, respectivamente, las diluciones se cuantificaron en un espectrofotómetro de la marca NanoDrop y fueron almacenadas a -20°C, hasta la fase de ensayos moleculares.

Amplificación de genes que codifican la producción de β -lactamasas AmpC mediadas por plásmidos (PCR multiplex).

Para la identificación de AmpC plasmídico, se empleó una PCR múltiple que codifican para AmpC tipo: MOX, CIT, DHA, ACC, EBC y FOX. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 3 minutos de desnaturalización inicial a 94°C; seguido de 25 ciclos de

desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 64°C por 30 segundos y extensión de 72°C por 1 minuto; finalmente, una extensión final a 72° C por 7 minutos. Los productos de amplificación fueron observados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, teñido con el colorante SYBR™ Safe DNA a 100 milivoltios (mV) por 45 minutos. El tamaño de los productos amplificados fue comparado con el Ladder comercial Invitrogen de 100 pares de bases (pb). El tamaño de banda para las familias de AmpC codificadas en plásmidos corresponde a: CIT: 462 pb; DHA: 405 pb; ACC: 346 pb; FOX: 190 pb; MOX: 520 pb y EBC: 302 pb (Pérez & Hanson, 2002).

Amplificación de genes que codifican la producción de β -lactamasas AmpC mediadas por mutación en el promotor.

Para la identificación de β -lactamasas AmpC mediadas por una mutación en el promotor, se utilizaron los cebadores AB1 (₁₅₁GATCGTTCTGCCGCTGTG₁₃₄) (5' a 3') y ampC2 (₁₂₀GGGCAGCAAATGTGGAGCAA₁₀₁) (5' a 3') para amplificar un fragmento de 271 pb. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 90 segundos de desnaturalización inicial a 94°C; seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 90 segundos, hibridación a 57°C por 30 segundos y extensión de 72°C por 1 minuto; finalmente, una extensión final a 72° C por 10 minutos (Caroff et al., 2000). La electroforesis se realizó con la misma metodología de la técnica de PCR multiplex.

Conjugación bacteriana

Para este ensayo se usaron dos cepas con las siguientes características: cepa donadora que amplifica para el gen constitutivo purA, AmpC plasmídica tipo CIT y AmpC mediada por mutación en el promotor. Y una cepa receptora que amplifica únicamente para el gen constitutivo purA y para AmpC mediada por mutación en el promotor. El ensayo de conjugación bacteriana fue realizado siguiendo el método de (Salinas et al., 2019).

RESULTADOS

Área de estudio

Se analizaron un total de 193 cepas de *E. coli* BLEE aisladas de urocultivos de pacientes ambulatorios con infecciones de vías urinarias procesadas en el año 2014 y el año 2023. Las cepas de 2014 fueron obtenidas del cepario de *E. coli* productora de BLEE del laboratorio de servicios de la Universidad San Francisco de Quito, LABOMIC, realizado durante el año 2014 y 2015. En el año 2014 se procesaron 1016 urocultivos de *E. coli*, de los cuales 188 fueron identificadas mediante pruebas fenotípicas y moleculares como cepas productoras de BLEE. De estas, solo 145 fueron contempladas para este estudio. Por otro lado, durante los meses de abril a septiembre de 2023 se procesaron un total de 545 urocultivos de *E. coli* de los cuales 48 fueron identificados como cepas productoras de BLEE, mediante pruebas fenotípicas. Todas estas fueron consideradas para el presente estudio.

Pruebas fenotípicas para identificación de AmpC

Prueba de cribado con Cefoxitina

Para la prueba de cribado con cefoxitina, fueron consideradas como positivas las cepas que presentaban un diámetro en la zona de inhibición ≤ 18 mm según las directrices del CLSI. De las 145 cepas aisladas en 2014, solo 12 fueron positivas. Es decir que presentaron un fenotipo de resistencia a cefoxitina, por lo que estas cepas fueron consideradas como sugerentes de AmpC. Por otro lado, de las 48 cepas aisladas en 2023, únicamente 3 presentaron el fenotipo de resistencia a cefoxitina (Tabla 1).

Prueba confirmatoria de AmpC

Las 15 cepas (12 cepas de 2014 y 3 cepas de 2023) que resultaron positivas para la prueba de cribado, fueron sometidas a la prueba fenotípica confirmatoria de AmpC de Liofilchem. Los aislados que presentaron un diámetro en la zona de inhibición ≥ 5 mm, en el disco que contiene

el inhibidor (cloxacilina) más la cefalosporina con respecto al diámetro de la zona de inhibición de la cefalosporina sin inhibidor, fueron consideradas como positivas. En total, de las 12 cepas de 2014, solo 9 aislados de *E. coli* fueron confirmados para la producción de β -lactamasas AmpC. Mientras que, de las 3 cepas aisladas en 2023, solo 2 fueron confirmados para la producción de β -lactamasas AmpC, a nivel fenotípico (Tabla 2).

Pruebas moleculares para identificación de AmpC

PCR convencional para identificación de AmpC mediada por mutación en el promotor

Para evaluar más a fondo la sensibilidad y especificidad del procedimiento de detección fenotípica. Los 15 aislados productores potenciales de AmpC (resistentes a la cefoxitina), fueron sometidos a pruebas moleculares. Para la identificación de la mutación en el promotor se llevó a cabo la PCR convencional. Se identificó que 14 de los 15 aislados amplificaron la banda esperada de 271pb (Tabla 3).

PCR multiplex para identificación de AmpC mediada por plásmidos

Por otro lado, para la identificación de betalactamasas codificadas en plásmidos se empleó la PCR multiplex, para determinar si alguna de las cepas codificaba para alguna de las 6 familias de AmpC plasmídicas: ACC, FOX, MOX, DHA, CIT, EBC. De los 15 aislados analizados, 2 cepas amplificaron para una región de 462pb que corresponde a AmpC tipo CIT (Tabla 4).

Conjugación bacteriana

En cuanto a los ensayos de conjugación bacteriana, se seleccionaron los 2 aislados de *E. coli* productoras de β -lactamasas AmpC plasmídicas como donadoras y la cepa *E. coli* TOP 10 seleccionada en cambio como la bacteria receptora. Las cepas donadoras compartieron el mismo patrón fenotípico y genotípico para la producción de β -lactamasas AmpC, mientras que

la cepa receptora mostró un perfil fenotípico negativo para la producción de β -lactamasas AmpC y un genotipo positivo para la producción de AmpC por mutación en el promotor. Se obtuvieron 2 bacterias conjugadas, de las cuales solo un aislado transfirió su patrón completo de resistencia fenotípica (resistencia a cefoxitina y positivo para la técnica de difusión del doble disco) y el plásmido a la bacteria receptora, esto se confirmó luego de haber realizado la PCR multiplex, en donde el gel de electroforesis reveló una banda de 462pb correspondiente a la familia AmpC tipo CIT. El otro aislado transfirió un patrón fenotípico parcial a la bacteria receptora (resistencia a cefoxitina y negativo para la técnica de difusión del doble disco), pero no transfirió el plásmido, esto se evidenció ya que luego de haber sometido dicho aislado a las pruebas moleculares no amplificó para ninguna región en la PCR multiplex.

Coexistencia de BLEE y AmpC en *E. coli*

Por último, la coexistencia de BLEE y AmpC es evidente, ya que, en las cepas aisladas tanto en 2014 como en 2023, se encontró una prevalencia relativamente baja. Mismas que corresponden a 0,57% para las cepas aisladas en 2014 y un 0,37% para las cepas aisladas en 2023 (Figura 1).

DISCUSIÓN

De las 193 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas tanto en el año 2014 como en el año 2023, únicamente 15 cepas mostraron un perfil de resistencia a Cefoxitina y por lo tanto fueron consideradas como sugerentes de AmpC (Tabla 1). Para la prueba fenotípica confirmatoria del doble disco. De las 15 cepas que fueron sometidas al método de discos combinados con inhibidor (cefalosporina sola y cefalosporina más inhibidor), solo 11 cepas fueron confirmadas fenotípicamente como productoras de AmpC. Estas enzimas no poseen un método estandarizado por el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos (CLSI), para su identificación fenotípica. Esto se debe principalmente a que las β -lactamasas AmpC poseen una estructura y origen genético variado, por lo que al estar codificadas en el cromosoma de diferentes bacterias de manera natural se dificulta la creación de un método unificado para su identificación. Esto implica además que su detección con pruebas convencionales no sea tan precisa (Mirelis et al., 2006).

La producción de AmpC esta puede darse por: resistencia cromosómica inducible, que se debe a la exposición directa de la bacteria a ciertos β -lactámicos, desrepresión estable debido a mutaciones en genes reguladores de AmpC, y presencia de genes *ampC* mediados por plásmidos (Martínez Rojas, 2009). Las 4 cepas en las que no se identificó un fenotipo positivo para la producción de AmpC podría deberse a una expresión variable de dicha enzima. Sin embargo, dado que no se puede identificar el mecanismo de producción de AmpC, a través de pruebas fenotípicas resulta necesario recurrir a pruebas moleculares para una identificación más precisa.

Si bien, la producción de β -lactamasas AmpC puede deberse a mutaciones en regiones promotoras, también puede deberse la presencia de genes *ampC* mediados por plásmidos. Estos genes derivan del cromosoma bacteriano de ciertas bacterias que son productoras

naturales y se clasifican en 6 familias que se diferencian por la homología de sus genes: CIT, DHA, ACC, FOX, MOX y EBC (Martínez Rojas, 2009). En la (Tabla 4), se observa que, de las 15 cepas analizadas, 14 cepas codifican para una AmpC mediada por mutaciones en el promotor. Dentro de este grupo también se encuentran 2 cepas que codifican para una AmpC plasmídica (pAmpC) del grupo CIT, en base a estos resultados se evidencia la coexistencia de dos tipos de β -lactamasas tanto AmpC como BLEE en una misma cepa. Estos resultados contrastan con los de (Luna et al., 2023) quien también identificó en cepas de *E. coli* aisladas de urocultivos una producción simultánea de BLEE y AmpC correspondientes al 16,7% del total de aislados analizados.

Con respecto a la cepa que no amplificó esto puede deberse a que su producción puede estar asociada a mutaciones en otras regiones o su vez por daños en las porinas. Estas últimas, actúan como canales por los que los β -lactámicos atraviesan la membrana externa y ejercen su actividad bactericida. Por lo que, cuando existen cambios o daños en estos canales este mecanismo se ve comprometido ya que reduce la entrada de los antibióticos y aumenta la producción de las enzimas β -lactamasas (Tamma et al., 2019) (Jacoby, 2009). Por otro lado, en *E. coli* la producción de AmpC está regulado por un promotor débil y un atenuador fuerte, lo que da como resultado una expresión constitutiva de bajo nivel. Sin embargo, cuando ocurren mutaciones en el promotor puede llegar a desarrollarse una hiperexpresión de AmpC, que no puede ser identificada de manera fenotípica, pero sí de manera molecular. Se han descrito diversas mutaciones en la región promotora de AmpC que conducen a la sobreexpresión (Polsfuss et al., 2011).

Por otro lado, en el ensayo de conjugación ambas cepas que amplificaron tanto para una AmpC plasmídica como para una por mutación en el promotor, fueron consideradas para con la finalidad de determinar si la producción de AmpC estaba siendo mediada por el plásmido o por

la mutación. Determinar si la resistencia se está produciendo por el plásmido resulta importante ya que esta puede contribuir significativamente a la propagación de genes de resistencia a los antibióticos, lo que promueve a la par su diseminación tanto en ambientes nosocomiales como comunitarios (Saliu et al., 2019).

Fueron *E.coli* AmpC-002 y *E.coli* AmpC-008 (Anexo B) las cepas que para el ensayo de conjugación, se consideran como donadoras ya que ambas poseen el plásmido y la cepa de *E.coli* TOP10 se considera como receptora. *E.coli* TCampC-002 y *E.coli* TCampC-008 fueron las cepas transconjugadas, para su identificación fueron sembradas en medio agar MacConkey Lactosa con antibióticos ceftriaxona y rifampicina (MKL/RIF/CRO) y su fenotipo fue cepas lactosa positivas, resistentes a ceftriaxona y rifampicina lo que sugiere que el ensayo de conjugación se llevó con éxito. Sin embargo, en las pruebas de cribado y confirmación tanto fenotípica como genotípica se evidenció que únicamente la cepa *E.coli* TCampC-002 fue la que presentó el patrón completo para la producción de AmpC, resistente a cefoxitina, positivo para el test de doble disco y positivo para la amplificación del plásmido CIT en la PCR. Estos resultados sugieren que AmpC plasmídico tiene una gran capacidad para moverse. De hecho, dada su gran capacidad de diseminación mediante plásmidos han hecho que la prevalencia de AmpC en continentes como Sudeste Asiático y Europa en 2017 sea 12% y 10%, respectivamente, en comparación con una menor prevalencia registrada en 2010 (Astocondor-Salazar, 2018).

Los mecanismos de resistencia de las β -lactamasas tipo AmpC se clasifican en 3 categorías: resistencia cromosómica inducible, desrepresión estable mediada por mutaciones en los promotores y/o atenuadores del gen AmpC y la resistencia mediada por plásmidos (Tamma et al., 2019). La producción de esta enzima puede ser constitutiva cuando los genes reguladores de la enzima AmpC están ausentes en la bacteria. Si se da una expresión a niveles basales bajos,

se expresa un fenotipo de resistencia natural o salvaje, pero cuando ocurren mutaciones en el promotor o atenuador de AmpC se da una hiperproducción que confiere a la bacteria la resistencia a todos los β -lactamámicos (cefalosporinas de 1^{ra}, 2^{da} y 3^{ra} generación y a las cefamicinas). Por otro lado, también puede darse una producción inducible de AmpC y esta ocurre cuando su resistencia es inducida al estar expuesta a algún β -lactámico.

Por último, la prevalencia de AmpC en *E. coli* productoras de BLEE corresponden al 0,57% para 2014 y 0,37% para 2023. Estos datos son consistentes con los reportados en la literatura en dónde se muestra una prevalencia baja de este tipo de enzimas a nivel mundial (Seral et al., 2012). La baja prevalencia de AmpC evidenciada en este estudio, se correlaciona con los resultados de (Seral et al., 2012) quien también obtuvo un bajo porcentaje de Enterobacterales productores de AmpC con resistencia mediada por plásmidos y por mutaciones en la región promotora del gen *ampC*. Sin embargo, (Mendieta et al., 2021) asegura que se está promoviendo un proceso evolutivo lento en estas bacterias ya que al ser enfrentados con los antibióticos de rutina, cada vez es más evidente el desarrollo de nuevos microorganismos multirresistentes. Por lo que, si su prevalencia en los datos existentes actualmente es baja, hay una tendencia a que estos casos puedan incrementar en el tiempo.

Por último, se destaca que la identificación de este tipo de β -lactamasas es de vital importancia ya que al existir coexistencia se anula el uso de betalactámicos como cefalosporinas de tercera generación, penicilinas e inhibidores de betalactamasas, lo que además de derivar en fracasos terapéuticos también limita las opciones de tratamiento y aumenta la complejidad del manejo de las infecciones.

CONCLUSIONES

Se determinó que la prevalencia de β -lactamasas AmpC en *E. coli* productoras de BLEE, para las cepas analizadas de 2014 corresponde al 0,57%; mientras que para las de 2023 al 0,37%. Estos resultados se correlacionan con la literatura, en dónde se determinan niveles bajos de incidencia en cuanto a la coexistencia de ambas β -lactamasas. Por otro lado, se logró determinar que la prueba de cribado con Cefoxitina es una alternativa prometedora para la detección preliminar de cepas sugerentes de AmpC. Sin embargo, no se dejan de requerir pruebas adicionales, ya que la resistencia a la Cefoxitina no es exclusiva de AmpC y podrían verse involucradas otras enzimas o mecanismos de resistencia. Posterior a la caracterización fenotípica de las cepas analizadas. Se realizaron pruebas moleculares y se logró identificar 2 cepas de *E.coli* que codifican para una pAmpC. Finalmente, en el ensayo de conjugación bacteriana se evidenció una transferencia efectiva del plásmido de la cepa donadora *E. coli* AmpC hacia la cepa receptora *E. coli* TOP10, lo que sugiere que las AmpC plasmídicas poseen una gran capacidad para moverse. Esto constituye un importante reservorio para un amplio rango de infecciones, así como para la diseminación de la resistencia antimicrobiana entre especies. Por lo que a futuro se recomienda secuenciar las cepas AmpC plasmídicas para saber el tipo de variante que está circulando en la población del presente estudio.

TABLAS

Tabla 1. Prueba de cribado para identificación fenotípica preliminar de AmpC

Método de examen	No. de aislamientos examinados BLEE		No. Aislamientos confirmados
	Año	Total	
Prueba de cribado			
Resistencia cefoxitina	2014	145	12
	2023	48	3
TOTAL		193	15

Tabla 2. Prueba confirmatoria para identificación fenotípica de AmpC

Método de examen	No. de aislamientos examinados BLEE		No. Aislamientos confirmados
	Año	Total	
Prueba confirmatoria			
Test AmpC Disk	2014		9
	2023		2
TOTAL			11

Tabla 3. Identificación molecular de AmpC mediada por mutación en el promotor

No. Aislados confirmados mediante prueba de cribado		Genotipo AmpC	
		Mutación en el promotor	
Año	Total	AB1/ampC2	
2014	12	12	
2023	3	2	
TOTAL		14	

Tabla 4. Identificación molecular de AmpC plasmídico

No. Aislados confirmados mediante prueba de cribado		Genotipo AmpC					
		Plásmidos					
Año	Total	ACC	FOX	MOX	DHA	CIT	EBC
2014	12	0	0	0	0	2	0
2023	3	0	0	0	0	0	0
TOTAL	15					2	

FIGURAS

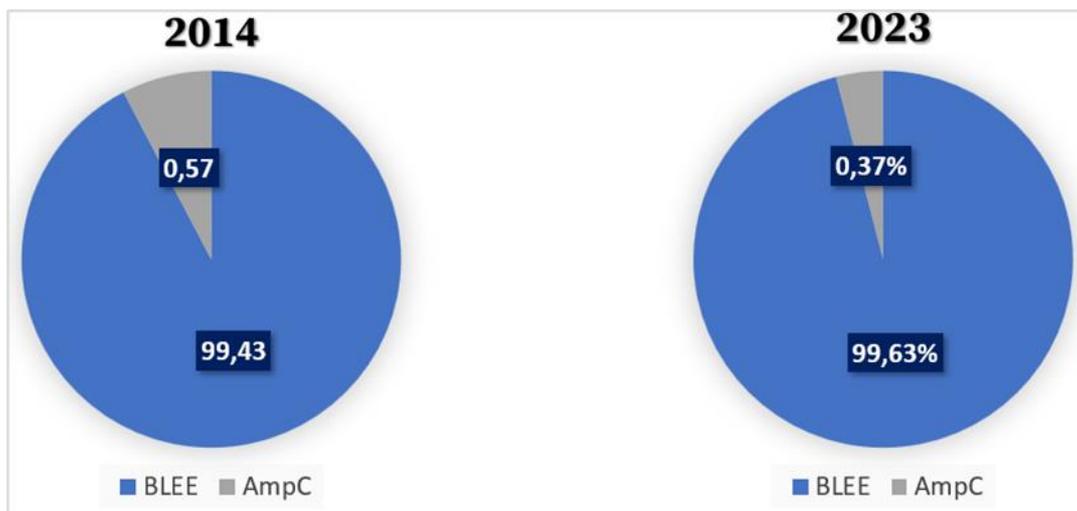


Figura 1. Prevalencia de AmpC en *E. coli* productora de BLEE durante el año 2014 y el año 2023.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

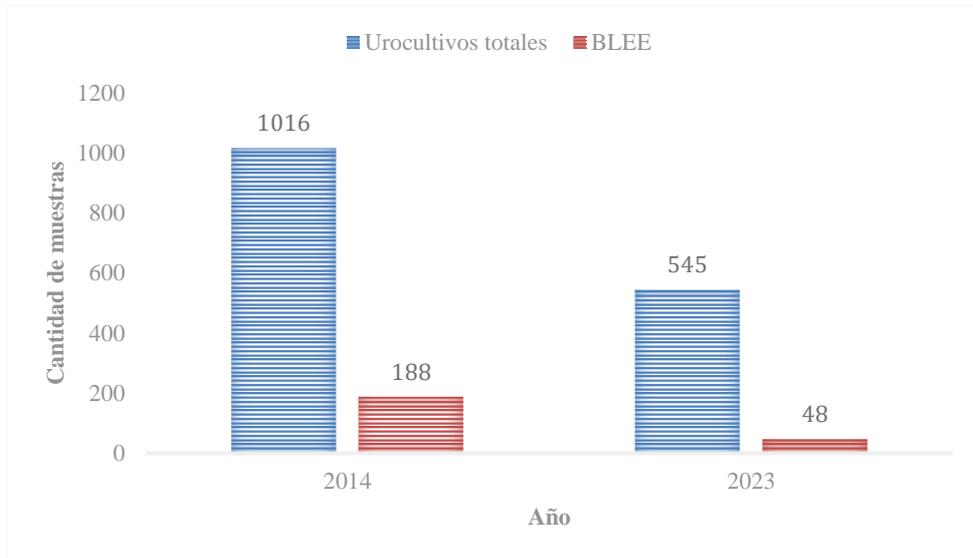
- Astocondor-Salazar, L. (2018). Betalactamasas: La Evolución Del Problema. *Revista Peruana de Investigación en Salud*, 2(2), 42-49.
- Balows, A. (2003). Manual of clinical microbiology 8th edition. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47(4), 625-626. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00160-3](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00160-3)
- Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(10), e01076-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2), e00047-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19>
- Calvo, J., Cantón, R., Fernández, F., Mirelis, B., & Navarro, F. (2011). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 11-13.
- 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. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(6), 783-788. <https://doi.org/10.1093/jac/45.6.783>
- Corvec, S., Crémet, L., Leprince, C., Dauvergne, S., Reynaud, A., Lepelletier, D., & Caroff, N. (2010). Epidemiology of Escherichia coli clinical isolates producing AmpC plasmidic beta-lactamase during a 5-year period in a French teaching Hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67(3), 277-281. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.02.007>
- Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S., & Sekawi, Z. (2015). Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Current Issues in Molecular Biology*, 17, 11-21.
- Govindaswamy, A., Bajpai, V., Khurana, S., Aravinda, A., Batra, P., Malhotra, R., & Mathur, P. (2019). Prevalence and characterization of beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates from a tertiary care hospital in India. *Journal of Laboratory Physicians*, 11(2), 123-127. https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_122_18
- 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>
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161-182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
- Luna, D. de, Rodríguez, G. F. T., Lora, A. J. M., Guzmán, J. D., Abreu, O. L., Acevedo, N., & Varela, S. C. (2023). Análisis de las beta-lactamasas de espectro extendido y tipo

- AmpC y el perfil de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* aisladas de orina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 74(3), Article 3.
<https://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/819>
- Mantilla, J. (2019). *Tipificación fenotípica y molecular de resistencias a los antimicrobianos en Escherichia coli BLEE/AmpC aislados de ciegos y carcasas de pollos broiler*.
<https://www.dspace.uce.edu.ec/entities/publication/0484bb9c-9e13-4672-ba5f-db09236ba376>
- Martínez Rojas, D. D. V. (2009). Betalactamasas tipo AmpC: Generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(2), 78-83.
- Mendieta, V., Gallegos Merchan, J. D., & Peña Cordero, S. J. (2021). Frecuencia de (BLEE) (AmpC) y CARBAPENEMASAS en muestras de urocultivo, en cepas de *Escherichia Coli* de origen comunitario. *Revista Vive*, 4(11), 387-396.
<https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i11.101>
- Mirelis, B., Rivera, A., Miró, E., Mesa, R. J., Navarro, F., & Coll, P. (2006). A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 24(6), 370-372. <https://doi.org/10.1157/13089690>
- Mulvey, M. R., Bryce, E., Boyd, D. A., Ofner-Agostini, M., Land, A. M., Simor, A. E., & Paton, S. (2005). 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>
- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., & Mirelis, B. (2011). [Detection of resistance phenotypes in gram-negative bacteria]. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(7), 524-534. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>
- Ortega-Paredes, D., Haro, M., Leoro-Garzón, P., Barba, P., Loaiza, K., Mora, F., Fors, M., Vinueza-Burgos, C., & Fernández-Moreira, E. (2019). Multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from canine faeces in a public park in Quito, Ecuador. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 18, 263-268.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.04.002>
- Pérez-Pérez, F. J., & Hanson, N. D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase 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>
- Pitout, J. D. D., Gregson, D. B., Church, D. L., & Laupland, K. B. (2007). Population-based laboratory surveillance for AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, Calgary. *Emerging Infectious Diseases*, 13(3), 443-448.
<https://doi.org/10.3201/eid1303.060447>
- Polsfuss, S., Bloemberg, G. V., Giger, J., Meyer, V., Böttger, E. C., & Hombach, M. (2011). Practical Approach for Reliable Detection of AmpC Beta-Lactamase-Producing

Enterobacteriaceae ▽. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(8), 2798-2803.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00404-11>

- Sageerabano, S., Malini, A., Mangaiyarkarasi, T., & Hemalatha, G. (2015). Phenotypic detection of extended spectrum β -lactamase and Amp-C β -lactamase producing clinical isolates in a Tertiary Care Hospital: A preliminary study. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 6(2), 383-387.
- Salinas, L., Cárdenas, P., Johnson, T. J., Vasco, K., Graham, J., & Trueba, G. (2019). Diverse Commensal *Escherichia coli* Clones and Plasmids Disseminate Antimicrobial Resistance Genes in Domestic Animals and Children in a Semirural Community in Ecuador. *mSphere*, 4(3), e00316-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00316-19>
- Saliu, E.-M., Eitinger, M., Zentek, J., & Vahjen, W. (2019). Nutrition Related Stress Factors Reduce the Transfer of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Resistance Genes between an *Escherichia coli* Donor and a *Salmonella Typhimurium* Recipient In Vitro. *Biomolecules*, 9(8), 324. <https://doi.org/10.3390/biom9080324>
- Seral, C., Gude, M. J., & Castillo, F. J. (2012). [Emergence of plasmid mediated AmpC β -lactamasas: Origin, importance, detection and therapeutical options]. *Revista Espanola De Quimioterapia: Publicacion Oficial De La Sociedad Espanola De Quimioterapia*, 25(2), 89-99.
- Serra, M. A. S. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3), Article 3.
- Tamma, P. D., Doi, Y., Bonomo, R. A., Johnson, J. K., & Simner, P. J. (2019). A Primer on AmpC β -Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-resistant World. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 69(8), 1446-1455. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz173>
- Toro, L. (2017). *Repositorio Universidad Técnica de Ambato: "Determinación de betalactamasas de espectro extendido tipo AMPC en cepas de escherichia coli y su relación con la resistencia antimicrobiana"*.
<https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/26482?mode=full>
- Woodford, N., Reddy, S., Fagan, E. J., Hill, R. L. R., Hopkins, K. L., Kaufmann, M. E., Kistler, J., Palepou, M.-F. I., Pike, R., Ward, M. E., Cheesbrough, J., & Livermore, D. M. (2007). Wide geographic spread of diverse acquired AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. In the UK and Ireland. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(1), 102-105. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl456>
- Yan, J.-J., Hsueh, P.-R., Lu, J.-J., Chang, F.-Y., Shyr, J.-M., Wan, J.-H., Liu, Y.-C., Chuang, Y.-C., Yang, Y.-C., Tsao, S.-M., Wu, H.-H., Wang, L.-S., Lin, T.-P., Wu, H.-M., Chen, H.-M., & Wu, J.-J. (2006). Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC enzymes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from seven medical centers in Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(5), 1861-1864. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1861-1864.2006>

ANEXO 1. PREVALENCIA DE BLEE EN E. COLI AISLADAS DE UROCULTIVOS DURANTE EL AÑO 2014 Y EL AÑO 2023.



**ANEXO 2. PATRONES FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS DE LAS CEPAS
EMPLEADAS EN EL ESTUDIO.**

Muestra	Prueba de Cribado	Fenotipo AmpC	Genotipo AmpC	
	Cefoxitin	Test AmpC Disk	AmpC Plasmídico	AmpC cromosomal
<i>E.coli</i> AmpC -001	R	+	-	+
<i>E.coli</i> AmpC-002	R	+	+	+
<i>E.coli</i> AmpC-003	R	+	-	+
<i>E.coli</i> AmpC-004	R	+	-	+
<i>E.coli</i> AmpC-005	R	-	-	+
<i>E.coli</i> AmpC-006	R	+	-	+
<i>E.coli</i> AmpC-007	R	-	-	+
<i>E.coli</i> AmpC-008	R	+	+	+
<i>E.coli</i> AmpC-009	R	+	-	+
<i>E.coli</i> AmpC-010	R	+	-	+
<i>E.coli</i> AmpC-011	R	+	-	+
<i>E.coli</i> AmpC-012	R	-	-	+
<i>E.coli</i> AmpC-013	R	+	-	+
<i>E.coli</i> AmpC-014	R	-	-	+
<i>E.coli</i> AmpC-015	R	+	-	-
<i>E. coli</i> TOP 10	S	-	-	+
<i>E. coli</i> TCampC-02	R	+	+	+
<i>E. coli</i> TCampC-08	S	+	-	+

**ANEXO 3. PERFIL DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE *E. COLI*
PRODUCTORA DE BLEE Y AMPC.**

Antimicrobianos	No. (%) de muestras:	
	AmpC 2014 (n=12)	AmpC 2023 (n=2)
Cefoxitina	100	100
Ciprofloxacina	100	100
Fosfomicina	0	100
Imipenem	0	0
Nitrofurantoína	25	50
Trimetoprim Sulfametoxazol	75	100

ANEXO 4. AMPLIFICACIÓN DE BETALACTAMASAS AMPC

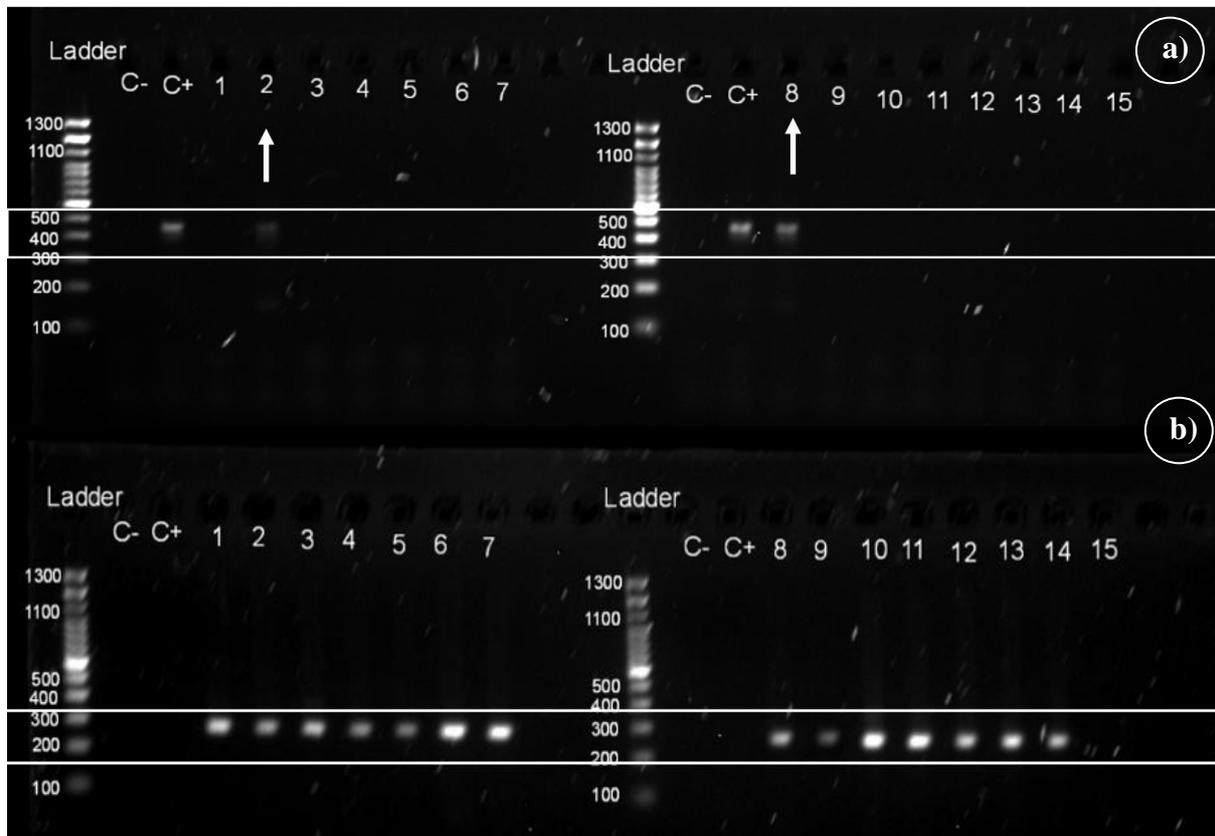


Imagen 1. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 2% para amplificación de a) AmpC plasmídico y b) AmpC por mutación en el promotor