



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
Acinetobacter baumannii de origen ecuatoriano.

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de 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: Rosa Nayely López Cajamarca

Patricio Alejandro Vayas Arcos

TUTOR: William Ricardo Calero Cáceres, PhD.

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, autoriza la presentación de este Informe Final de Integración Curricular bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de la Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 30 de enero de 2023.

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

C.I.: 1714344885-9

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Nosotros, Rosa Nayely López Cajamarca y Patricio Alejandro Vayas Arcos, 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.



Rosa Nayely López Cajamarca

C.I.: 230022571-7

AUTOR



Patricio Alejandro Vayas Arcos

C.I.: 185006910-3

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 de Tribunal

PhD. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

C.I.: 1803601853

PhD. Irvin Ricardo Tubon Usca

C.I.: 0604250357

Ambato, 08 de Marzo de 2023

DERECHOS DE AUTOR

Autorizamos a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Informe Final de Integración Curricular o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos 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.



Rosa Nayely López Cajamarca

C.I.: 230022571-7

AUTOR



Patricio Alejandro Vayas Arcos

C.I.: 185006910-3

AUTOR

DEDICATORIA

*Para los que ven y encuentran
a la ciencia como un arte
y una herramienta.*

*Porque...
¿Qué es la investigación,
sino una cita a ciegas con el conocimiento?
-W. Harvey.*

Rosa Nayely López Cajamarca

*A mi familia
En especial a mi madre, mi ejemplo a seguir
A mis hermanos Sebastián y Emilio, mis compañeros de la vida
A mi padre, por todo su apoyo
A todos mis amigos que siempre estuvieron conmigo*

Patricio Alejandro Vayas Arcos

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por ser la luz que guía mi camino y quien me brinda una nueva oportunidad cada día. A mi papá y mi hermano por ser un pilar fundamental en mi vida. A toda mi familia quienes directa o indirectamente aportaron en mi crecimiento como persona y profesional.

A mi compañero de tesis Patricio, porque durante la ejecución de esta investigación hemos congeniado como un equipo. El tiempo, la paciencia y el esfuerzo fueron factores primordiales a lo largo de estos meses de arduo trabajo.

Al equipo del Laboratorio 1.3 Patógenos por abrirme sus puertas. A mi tutor de tesis, el Dr. William Calero quien me ha brindado de su conocimiento y me incentivó a realizar esta investigación. A mis amigos y tesistas del laboratorio Jenny, Anabelle, Liss, Cris y Joyce, Pauli, Kathy, Gaby L. Gaby J, por todas las experiencias compartidas.

A Katita y todos quienes forman parte de CRN-RAM INSPI como Xavi, Carito, Wlady, Karlita, Ruthcita, Dany, Byron, Pedro José por siempre estar predispuestos a ayudar en el desarrollo de esta investigación.

Y, para terminar, a mis amigos Elvis, Jhommy, Joao, Sharon, José y Marlon por los buenos y malos momentos que vivimos desde nuestro inicio en las aulas hasta el final en nuestra graduación.

Rosa Nayely López Cajamarca

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco, a Dios, que ya hace 5 años cuando debía decidir mi destino, lo puse en sus manos y a pesar de todas las enseñanzas puestas a mi alrededor veo que estuvo junto a mí y me ayudo a tomar la decisión correcta. El camino ha sido largo pero muy gratificante. Todo tiene su final y esta etapa de la vida culmina de la mejor manera posible, es por ello que deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que formaron parte de este proceso.

Quiero agradecer a mi madre, mi primera maestra de la vida, gracias por nunca haberte dado por vencida y siempre darme tu mano en cada paso que doy.

A mis hermanos y mi padre que me brindaron su apoyo, amor y motivación para seguir adelante.

A mi amiga y compañera de tesis Rosita, por su paciencia, esfuerzo, dedicación y su colaboración para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al PhD. William Calero, por ser la guía y eje de esta investigación con su apoyo, paciencia y conocimientos en el área. A los amigos: Anabelle, Jenny, Liss, Kathy, Pauly, Gaby J. y Gaby L., Joyce y Cristian del laboratorio de Patógenos 1.3 por todos los momentos compartidos.

A la Bq. Cl. Katherine Jaramillo por todo su apoyo y paciencia, sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible. Por otro lado, al grupo de trabajo del CRN-RAM INSPI: Xavy, Carito, Karlita, Ruthcita, Dany, Byron, Wlady, Pedro José por toda su colaboración y consejos durante el desarrollo de esta investigación.

Y, finalmente, a mis amigos Liss, Erick, José Carlos, Taty, Luis, Diego, Cami, Juanjo, Josafat, Juan V. y Monse por todos los momentos vividos a lo largo de la vida universitaria.

Patricio Alejandro Vayas Arcos

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICES DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO 1	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos entorno a <i>Acinetobacter baumannii</i>.....	1
1.1.1. Contexto a nivel mundial	1
1.1.2. Contexto a nivel nacional.....	2
1.1.3. Generalidades sobre <i>A. baumannii</i>	3
1.1.4. Métodos de identificación bacteriana.....	3
1.1.4.1. Métodos fenotípicos	3
1.1.5. Cuadro clínico causado por <i>A. baumannii</i>	4
1.1.6. Categorías de resistencia a antimicrobianos.....	4
1.1.7. Mecanismos de resistencia en <i>A. baumannii</i>	5
1.1.7. Resistencia de <i>A. baumannii</i> a carbapenémicos.....	5
1.1.8. Resistencia de <i>A. baumannii</i> a tetraciclinas	7
1.1.8.1. Sobreexpresión de bombas de flujo	9
1.1.8.2. Modificación en la permeabilidad de la membrana celular	10
1.1.9. Resistencia mediada por plásmidos portadores de genes <i>tet(X)</i>	10
1.1.10. Métodos de determinación de sensibilidad antimicrobiana	12
1.1.11. Microdilución en Caldo.....	13
1.2. Objetivos	14
1.2.1. Objetivo General	14

CAPÍTULO 2	16
METODOLOGÍA.....	16
2.1. Materiales.....	17
2.2. Métodos	20
2.2.1. Selección de la población.....	20
2.2.2. Reactivación de cepas	21
2.2.3. Identificación bioquímica.....	22
2.2.4. Generación de copias de las cepas seleccionadas del cepario.....	22
2.2.5. Perfil de resistencia fenotípico	23
2.2.5.1. Microdilución en caldo de tigeciclina	23
2.2.5.2. Lectura de Placas.....	25
2.2.6. Perfil de resistencia genotípico	26
2.2.6.1. Extracción de ADN	26
2.2.6.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Electroforesis	27
2.3. Análisis estadístico.....	34
CAPÍTULO 3	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1. Descripción de la población.....	35
3.2. Evaluación de los perfiles de resistencia a tigeciclina mediante el método de microdilución en caldo.....	38
3.3. Identificación de los genes de resistencia a tigeciclina codificados en plásmidos a partir de técnicas moleculares.	40
3.4. Contraste de los porcentajes de resistencia a tigeciclina y a otros antibióticos en los períodos prepandemia y pandemia.	47
CAPÍTULO 4	60
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	60
4.1. CONCLUSIONES.....	60
4.2. RECOMENDACIONES	62
MATERIALES DE REFERENCIA	63
Referencias Bibliográficas	63
Anexos	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Origen de las oxacilinasas según su tipo.....	6
Tabla 2.	Equipos de Laboratorio	17
Tabla 3.	Instrumental de Laboratorio	18
Tabla 4.	Reactivos	19
Tabla 5.	Insumos de escritorio	20
Tabla 6.	Modelo de placa de microdilución con 4 concentraciones para 24 muestras.	24
Tabla 7.	Puntos de corte MIC para <i>A. baumannii</i>	26
Tabla 8.	Secuencias de los primer utilizados en PCR.	29
Tabla 9.	Descripción de la población según variables epidemiológicas.	35
Tabla 10.	Frecuencia de genes que presentan resistencia a antibióticos en <i>A. baumannii</i>	40
Tabla 11.	Antibióticos utilizados para evaluar los perfiles de susceptibilidad en <i>A. baumannii</i>	47
Tabla 12.	Análisis estadístico de variables epidemiológicas con muestras resistentes durante el período 2017-2021	58

ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de las tetraciclinas.....	7
Figura 2. Mecanismos de resistencia de <i>A. baumannii</i> a tigeciclina.....	9
Figura 3. Inactivación de la tigeciclina por mediada por tet(X).....	12
Figura 4. Procedimiento de reactivación de cepas.....	21
Figura 5. Generación de copias de las cepas en BHI+glicerol 30% desde viales del cepario.	22
Figura 6. Técnica de microdilución en caldo.....	25
Figura 7. Extracción de ADN por ebullición.....	26
Figura 8. Condiciones de reacción de PCR para genes de resistencia a tigeciclina y carbapenémicos.	31
Figura 9. Condiciones de reacción de PCR para genes de resistencia a betalactámicos.	32
Figura 10. PCR y electroforesis en gel de agarosa.	33
Figura 11. Perfil de susceptibilidad a TGC en cepas de <i>A. baumannii</i>	38
Figura 12. Heatmap de la presencia de oxacillinasas (OXA) y sus combinaciones detectadas en aislamientos de <i>A. baumannii</i> con respecto a la provincia y año.....	45
Figura 13. Porcentajes de resistencia de <i>A. baumannii</i> a otros antibióticos en los período prepandemia y pandemia.....	49
Figura 14. Dendograma del perfil fenotípico y otras variables epidemiológicas de las cepas de <i>A. baumannii</i> del período 2017-2021 analizadas.....	52
Figura 15. Clasificación de las subdivisiones según categorías de antimicrobianos para fenotipos resistentes.....	56

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Listado de muestras por año clasificadas según la plataforma WHONET 5.6.	80
Anexo 2. Pruebas bioquímicas para la identificación fenotípica de <i>A. baumannii</i>	89
Anexo 3. Preparación de solución madre de tigeciclina (SM).....	92
Anexo 4. Preparación de diluciones dobles seriadas a partir de una solución de trabajo (ST) para la preparación de 4 placas.	93
Anexo 5. Muestras compuestas para reacción de PCR según MIC de TGC.	95
Anexo 6. Resultado de la placa de microdilución con tigeciclina a 24 horas de incubación	98
Anexo 7. Genes de resistencia OXA en las cepas de <i>A. baumannii</i> analizadas en este estudio.	99
Anexo 8. Porcentaje de aislamientos resistentes considerando su lugar de origen. ..	101

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana (RAM) amenaza los sistemas de salud del mundo. *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) se cataloga como patógeno de prioridad crítica porque integra fácilmente material genético mediante elementos móviles como plásmidos. Esto promueve la transmisión de genes de resistencia emergentes como *tet(X)* y sus homólogos (*tet(X3)* y *tet(X4)*) que codifican enzimas degradadoras de antibióticos de última línea, como tigeciclina (TGC). En Ecuador, no existen estudios sobre la detección de estos genes. Por esta razón, se evaluaron los perfiles de resistencia fenotípicos a TGC mediante microdilución en caldo y, genotípicos mediante técnicas moleculares en la colección de *A. baumannii* del período 2017-2021 de muestras de tipo respiratorio (esputo, esputo inducido, bronquial, traqueal y aspirado traqueal) de pacientes de Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). La línea de investigación fue Microbiología y Biotecnología. Los resultados obtenidos apuntaron a que los 32 aislamientos resistentes a TGC (10,9 por ciento) agrupados en las subdivisiones R4, R9, R11, R13 y R14 de la colección (n=292) no presentaron genes *tet(X)* ni sus homólogos. Gran parte de los aislamientos poseen diferentes combinaciones de dobles y triples carbapenemasas OXA. A pesar de que existe una disminución de casi el 3 por ciento en la tasa de resistencia a TGC entre los períodos prepandemia (2017-2019) y pandemia (2020-2021), el porcentaje de resistencia a otros antibióticos se mantuvo (CIP5, MEM10, IMP10, FEP30, TPZ110) e incluso aumentó (COL, CN10, CAZ30). Se espera que se realicen investigaciones futuras para monitorear la diseminación y posibles reservorios de *tet(X)* y sus variantes.

Palabras claves: RAM, *A. baumannii*, tigeciclina, *tet(X)*, *tet(X3)*, *tet(X4)*, microdilución en caldo, período 2017-2021, UCI.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) threatens the world's health systems. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) is classified as a critical priority pathogen due to acquire easily genetic material through mobile elements such as plasmids. The emerging resistance *tet(X)* genes and its homologs, (*tet(X3)* and *tet(X4)*), encode enzymes that break down last-line antibiotics such as tigecycline (TGC). In Ecuador, there are no studies on the detection of these genes. For this reason, the phenotypic profiles of TGC resistance were evaluated by broth microdilution and genotypic by molecular techniques in the *A. baumannii* collection from the period 2017-2021 from respiratory samples (sputum, induced sputum, bronchial, tracheal, and tracheal aspirate) in Intensive Unit Care patients (ICU). The line of research was Microbiology and Biotechnology. The results obtained indicated that the 32 TGC resistant isolates (10.9 percent), clustered in subdivisions R4, R9, R11, R13, and R14 of the total collection (n=292), did not have *tet(X)* genes or its homologs. Most of the isolates have different combinations of double and triple OXA carbapenemases. Even though there is a decrease of about 3 percent in the TGC resistance rate between the pre-pandemic (2017-2019) and pandemic (2020-2021) periods, the percentage of resistance to other antibiotics was maintained (CIP5, MEM10, IMP10, FEP30, TPZ110) and even increased (COL, CN10, CAZ30). Future research is essential to monitor the spread and potential reservoirs of *tet(X)* and its variants.

Keywords: AMR, *A. baumannii*, tigecycline, *tet(X)*, *tet(X3)*, *tet(X4)*, broth microdilution, 2017-2021 period, ICU.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos entorno a *Acinetobacter baumannii*

1.1.1. Contexto a nivel mundial

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es uno de los fenómenos más antiguos reconocido como una epidemia silenciosa que mantiene una acelerada evolución y amenaza el bienestar de futuras generaciones, causando cada año más muertes y provocando un costo significativo para los sistemas de salud mundiales (**Centers for Disease Control, 2019**). Para el año 2001, la Organización Mundial de la Salud declaró a la resistencia antibiótica como un problema de salud pública (**World Health Organization, 2021a**). En base a datos recolectados durante el año 2019 previo a la pandemia ocasionada por SARS COV-2, a nivel mundial en 204 países se identificó que existe un promedio de muertes de al menos 1,27 millones de personas por año a causa de la resistencia a antibióticos y 4,95 millones a enfermedades asociadas a resistencia (**Murray et al., 2022**).

Durante el año 2019, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades desarrolló una comparación retrospectiva al año 2018 de los pacientes con RAM y las enfermedades asociadas a estos. El estudio determinó una disminución en los porcentajes de muertes por RAM y con índices hospitalarios que se redujeron en un 18-30% para los Estados Unidos (**Centers for Disease Control, 2019**). Sin embargo, para el 2022 por los problemas ocasionados por la pandemia y el descontrol en el uso de antibióticos, el último reporte establece que los esfuerzos han sido en vano con un panorama complejo debido al aumento de bacterias multirresistentes como el caso de *Acinetobacter baumannii* (**Center for Disease Control and Prevention, 2022**).

En el año 2017, *A. baumannii* se describió como una de las amenazas prioritarias para la Organización Mundial de la Salud principalmente por las características descubiertas en los últimos años donde resalta la resistencia a un amplio número de antibióticos de último recurso como tigeciclina (TGC), la asociación con infecciones crónicas y la habilidad para sobrevivir en condiciones extremas (**Abadi et al., 2019**).

Reportes recientes revelan un mecanismo de resistencia mediado por plásmidos *tet(X)* que reduce la actividad de la tigeciclina significativamente. La propagación de estos genes ha alcanzado 30 países de 6 continentes, entre ellos los países vecinos del Ecuador como Colombia y Perú (**Anyanwu et al., 2022; R. Zhang et al., 2021**).

1.1.2. Contexto a nivel nacional

La diseminación del género *Acinetobacter spp.* multirresistente a lo largo de Latinoamérica es mucho más frecuente en países como Brasil y Argentina. En el año 2013 se generó un reporte evolutivo de la resistencia del género en aislados de Latinoamérica por la Organización Panamericana de la Salud. Por medio de la plataforma de seguimiento ReLAVRA-PAHO, se reportó que el 90% de aislados presentaban a la especie *A. baumannii* como responsable de infección nosocomial en pacientes en cuidados intensivos (UCI). Para Ecuador específicamente en el 2013, se describió un 83% de aislados con la especie en cuestión (**Rodríguez et al., 2018**).

Los estudios desarrollados en Ecuador sobre *A. baumannii* se perfilan entorno a epidemias ocasionadas en ambientes hospitalarios y la vigilancia a la resistencia antimicrobiana del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) (**Ministerio de Salud Pública, 2018**). Es importante realizar estudios enfocados en el análisis molecular de epidemiologías ocasionadas por *A. baumannii* en el Ecuador demostrando la necesidad de implementar medidas preventivas en la vigilancia y tratamiento de RAM (**Núñez Quezada et al., 2020; Villacís et al., 2019**).

Ecuador para el año 2019, desarrolló el Plan Nacional para la prevención y control de la resistencia antimicrobiana como parte de la 68ª Asamblea Mundial de la Salud. En este se estableció como centro de vigilancia y control a los antimicrobianos al INSPI y que la plataforma WHONET 5.6 sea la guía estadística de reportes hospitalarios

para la toma de decisiones a nivel nacional (**Viceministerio de Gobernanza y Vigilancia de la Salud, 2019**).

1.1.3. Generalidades sobre *A. baumannii*

El género *Acinetobacter* fue aislado por primera vez en 1911 por Beijerinck que lo describió como *Micrococcus calcoaceticus*, con el paso del tiempo ha adquirido otros nombres y cambios a diversos géneros por las características que cada investigador observaba (**Ayoub Moubareck & Hammoudi Halat, 2020**). En 1968, Baumann y su grupo de trabajo estableció que todos los aislados con características similares pertenecen al género *Acinetobacter*, reconociendo como única especie a *A. calcoaceticus*. Cuatro años más tarde el comité de taxonomía de *Moraxella* y Allied Bacteria lo aprobó (**Almasaudi, 2018**). Bouvet y Grimont en 1986 por medio de una hibridación de DNA diferenció 12 especies. El desarrollo de nuevas técnicas moleculares permitió diferenciar 20 especies de *Acinetobacter* hasta la actualidad, siendo *A. baumannii* la más peligrosa en el ámbito clínico (**Kyriakidis et al., 2021a**).

Entre las características principales de *A. baumannii* se puede destacar que es un cocobacilo no fermentador, gram negativo y un patógeno considerado como crítico. Pertenece al grupo de microorganismos “Escape” por sus siglas en inglés “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*). Estos patógenos adquieren esta denominación por su facilidad de transmisión entre poblaciones a través del medio ambiente y su resistencia a un amplio grupo de antibióticos (**O. Vrancianu et al., 2020**).

1.1.4. Métodos de identificación bacteriana

1.1.4.1. Métodos fenotípicos

El complejo *A. baumannii* complex (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* y *A. calcoaceticus*) está constituido por 3 especies relacionadas con infecciones y por la última (*A. calcoaceticus*) la cual rara vez se la considera como patógeno. La identificación fenotípica para las especies del complejo es similar. Estas son

caracterizadas como bacterias gran negativas, cocobacilos que se observan en un rango de 1 a 1,5 μm bajo microscopía (Asif et al., 2018).

De manera nutricional, son bacterias aerobias que no requieren de condiciones especiales para su crecimiento, producen catalasa, no son fermentadoras, no presentan esporulación, ni motilidad y carecen de producción de citocromo oxidasa, urea, citrato e indol. Para el crecimiento del complejo se requiere una temperatura entre 35°C-44°C, la aparición de colonias es lenta y se suele utilizar agar sangre, agar chocolate y agar MacConkey. El último medio de cultivo inhibe el crecimiento de bacterias gram positivas y permite observar colonias mucoides, la coloración es opaca y, como no fermentan lactosa, el medio se torna amarillo (Biswas & Rather, 2019).

1.1.5. Cuadro clínico causado por *A. baumannii*

Los microorganismos pertenecientes al género *Acinetobacter* son considerados como parte natural de la flora de la piel, las secreciones respiratorias y las membranas mucosas de la faringe (C. O. Vrancianu et al., 2020). La característica que los convierte en peligrosos para el ámbito clínico es su capacidad de sobrevivir a condiciones extremas, la formación de biofilms, la habilidad hidrofóbica para adherirse a materiales plásticos y fácil colonización en pacientes con cuadros clínicos complicados. En consecuencia, generan infecciones en el tracto urinario, neumonía, infecciones de la tráquea, daño en tejidos blandos con consecuencias sobre la piel y meningitis nosocomial (Martín-Aspas et al., 2018).

1.1.6. Categorías de resistencia a antimicrobianos

Los microorganismos pueden categorizarse en 3 tipos dependiendo su perfil de resistencia a los antibióticos: Multidrogo resistente (MDR), Extensivo drogo resistente (XDR) y Pan drogo resistente (PDR) (Chapartegui-González et al., 2021). Un microorganismo MDR es aquel que posee resistencia a un agente en más de 3 clases de antibióticos. Los microorganismos XDR son resistentes en al menos un antibiótico en todas las clases de antibióticos, sin embargo, en esta categoría es necesario que el aislamiento sea susceptible a 1 o 2 clases de antibióticos; mientras que los PDR son aquellos que tienen resistencia en todas las clases de antibióticos y

todos los agentes dentro de cada clase (**Alkofide et al., 2020**). En el caso de *A. baumannii*, los reportes indican una resistencia a carbapenémicos creciente en la región. Por la capacidad de combinar los mecanismos de resistencia enzimáticos, adquiridos y no enzimáticos, algunas cepas se las considera como MDR y XDR (**Chapartegui-González et al., 2021**).

1.1.7. Mecanismos de resistencia en *A. baumannii*

A. baumannii exhibe una resistencia natural a antibióticos utilizados para combatir patógenos gram negativos. Entre ellos se puede nombrar a las aminopenicilinas, cefalosporinas de primer y segunda generación, fosfomicina, cloranfenicol, ertapenem, aztreonam y trimetoprim (**Jamal et al., 2018**). Por otra parte, su habilidad de adquirir resistencia a una diversa clase de antibióticos e incluso a los antibióticos de último recurso como tigeciclina y colistina, la ha catalogado como un patógeno emergente y de vigilancia clínica (**Karakonstantis, 2020**).

1.1.7. Resistencia de *A. baumannii* a carbapenémicos

A. baumannii resistente a carbapenémicos (CRAB, por sus siglas en inglés) fue reconocido por la OMS como un patógeno crítico (Prioridad 1) (**World Health Organization, 2017b**). Los carbapenémicos como meropenem e imipenem, mismos que pertenecen a la familia de betalactámicos, continúan siendo las opciones de tratamiento para bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (**Hamidian & Nigro, 2019**). A pesar de que se han descrito algunos mecanismos de resistencia a carbapenémicos, el más común es la producción de enzimas que hidrolizan carbapenémicos denominadas carbapenemasas. Estas enzimas pertenecen a las clases A, B y C porque hidrolizan los antibióticos de las categorías del mismo nombre basados en la clasificación molecular de Amber (**Nasiri et al., 2020**). CRAB es resistente a carbapenémicos por la presencia de los genes de la familia OXA (**Özçelik et al., 2020**).

Las enzimas oxacilinasas (OXA), o también llamadas carbapenemasas hidrolizantes de clase D, presentan secuencias de inserción (IS, por sus siglas en inglés) débiles que regulan la expresión génica como promotores fuertes en genes aguas abajo e

interrumpiendo otros promotores para disminuir o inactivar genes (**Farajzadeh et al., 2021; Özçelik et al., 2020**). Las OXA se clasifican en 4 grupos principalmente: OXA-51, OXA-58, OXA-23 y OXA-24, de las cuales la OXA-51 y OXA-23 están estrechamente relacionadas con la resistencia a carbapenémicos (**Özçelik et al., 2020**). A continuación, en la **Tabla 1** se describe el origen de algunos genes OXA.

Tabla 1.

Origen de las oxacilinasas según su tipo.

Tipo de OXA	Origen
OXA-21	I
OXA-23	C, P
OXA-24/40	C, P
OXA-51	C, P
OXA-58	C, P
OXA-143	P

Nota: Dependiendo de su ubicación en el genoma bacteriano, las oxacilinasas (OXA) o carbapenemasas hidrolizantes del tipo D pueden ubicarse en el cromosoma (C), plásmido (P) o integrón (I). *Basado en* (C. O. Vrancianu et al., 2020).

En algunos lugares de Europa las tasas de resistencia CRAB superan el 90% lo cual indica una rápida diseminación de estos clones resistentes (**World Health Organization, 2017a**). Estos clones atacan con mayor facilidad a pacientes con otras afecciones ocasionando neumonía e infecciones en la sangre con una elevada tasa de mortalidad (**Piperaki et al., 2019**). Los aislados del tipo CRAB son sensibles a un limitado número de antibióticos. De esta manera, se reducen las opciones de tratamiento dejando como último recurso el uso de antibióticos como las tetraciclinas de tercera generación (tigeciclina) y polimixinas (colistina) (**Lucaßen et al., 2021**).

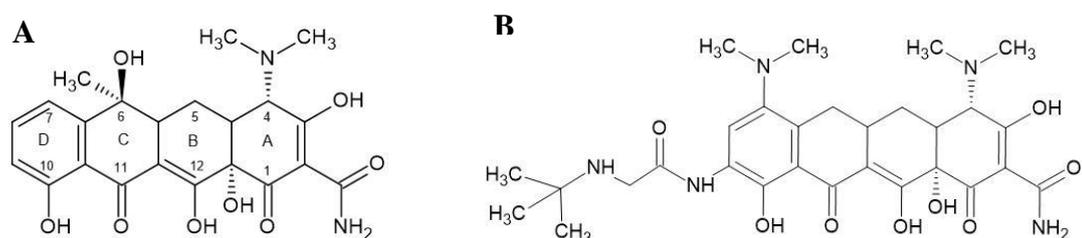
1.1.8. Resistencia de *A. baumannii* a tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro por su efecto bacteriostático en bacterias gram positivas, gram negativas, microorganismos intracelulares y parásitos protozoarios (Benett et al., 2020). Su mecanismo de acción consiste en adherirse de forma irreversible en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano para evitar la unión del ARNt al sitio ribosomal A inhibiendo así la síntesis de proteínas (Fang et al., 2020). Sin embargo, poco tiempo después de su descubrimiento, las bacterias desarrollaron resistencia por el uso indiscriminado de tetraciclinas tanto en el ámbito clínico para el tratamiento de infecciones, así como promotores de crecimiento en los alimentos de animales ocasionando una diseminación de clones resistentes (Benett et al., 2020).

En respuesta a esta rápida diseminación de clones resistentes, se crearon las tetraciclinas semisintéticas o *glicilciclinas*. Un ejemplo de esto fue la síntesis de tigeciclina, la primera glicilciclina de tercera generación con una estructura similar a la tetraciclina. Para crear una molécula de tigeciclina, el grupo hidroxilo de la posición 5 y el grupo metilo de la posición 6 de una tetraciclina son reemplazados por un hidrógeno; mientras que un sustituyente dimetilamino y (N-terc-butilglicil) amino se añade en las posiciones 7 y 9 respectivamente (Figura 1) (PubChem, 2022).

Figura 1.

Estructura química de las tetraciclinas.



Nota: La adición de otros sustituyentes a una tetraciclina de primera generación (A) puede crear una tetraciclina semisintética de tercera generación como la tigeciclina (B).

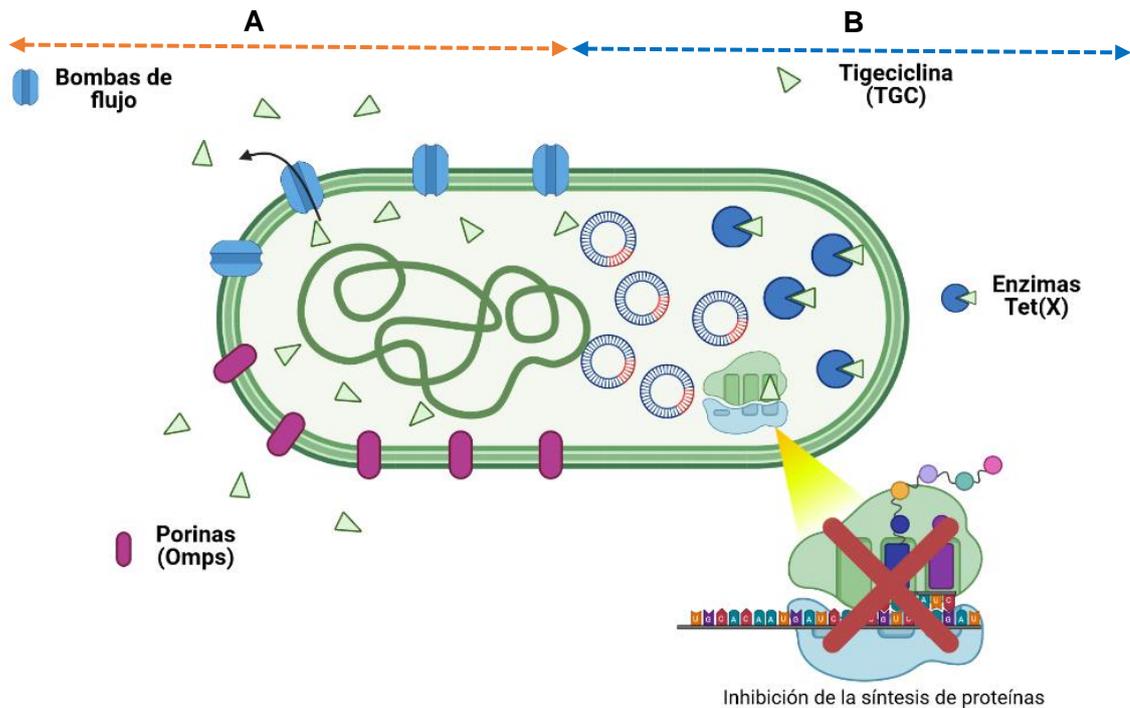
La tigeciclina fue el primer antibiótico aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) en el año 2005. En el año 2013, la misma entidad determinó que el uso de tigeciclina debe reservarse únicamente para situaciones donde no se hayan obtenido buenos resultados en tratamientos con otros antibióticos. En ensayos de fase clínica 3 y 4 en pacientes tratados con tigeciclina, se encontró que la tasa de muerte es del 2.5%. De este porcentaje, se deduce que las muertes fueron el resultado del empeoramiento y complicación de la infección o comorbilidades adyacentes de los pacientes (**Food and Drug Administration, 2011**).

El uso frecuente de tigeciclina para tratar infecciones en *A. baumannii* multirresistente ha ocasionado el desarrollo de cepas resistentes a tigeciclina (**Pucci et al., 2017**). *A. baumannii* es considerada como una de las especies con una gran plasticidad genética, rapidez para generar mutaciones y reordenamientos en su código genético y la facilidad para integrar material genético mediante elementos genéticos móviles (**Kyriakidis et al., 2021b**). Los mecanismos de resistencia de *A. baumannii* a tetraciclina pueden clasificarse en mecanismos de resistencia que pueden estar codificados a nivel *cromosómico* y en *elementos genéticos móviles* como plásmidos, y a su vez, estos pueden ser enzimáticos y no enzimáticos (**Jamal et al., 2018; C. O. Vrancianu et al., 2020**).

En los últimos años se ha reportado un mecanismo de resistencia emergente mediado por *plásmidos* portadores de genes *tet(X)* que codifican para enzimas hidrolizantes de tetraciclinas (**Fang et al., 2020**). Adicional a esto, existen otros mecanismos de resistencia enzimáticos como la producción de carbapenemasas OXA; así como la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos como acetiltransferasas, fosfotransferasas y nucleotidil transferasas; y metilasas de ARNr 16S (**C. O. Vrancianu et al., 2020**). Respecto a los mecanismos de resistencia que están codificados a nivel *cromosómico* del tipo no enzimáticos, se han identificado a la modificación de la permeabilidad de la membrana celular y la sobreexpresión de bombas de flujo AdeABC (**Figura 2A**) (**Jamal et al., 2018**).

Figura 2.

Mecanismos de resistencia de A. baumannii a tigeciclina.



Nota: Los mecanismos de resistencia a TGC en *A. baumannii* pueden dividirse principalmente en dos tipos: (A) Mecanismos de resistencia codificados a *nivel cromosómico* del tipo no enzimáticos como la sobreexpresión de bombas de flujo y la modificación en la permeabilidad de la membrana mediante las porinas (Omps) (B) Mecanismos de resistencia codificados en *elementos genéticos móviles* (p.ej. plásmidos) del tipo enzimáticos que son transferibles entre individuos de la misma o diferente especie.

1.1.8.1. Sobreexpresión de bombas de flujo

Las bombas de flujo son un mecanismo natural en todas las células procariontas para la eliminación de moléculas extrañas o compuestos tóxicos producto del metabolismo. Es así como las bacterias pueden utilizar este sistema para eliminar de manera específica un grupo de moléculas o antibióticos (Abdi et al., 2020). Se han determinado 5 familias de bombas de flujo como RND (Resistance-Nodulation-Division), MSF (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance), MATE (Toxic Compound Extrusion por sus siglas en inglés) y los transportadores de cassette de unión a ATP (ABC) (Verma et al., 2021). La adeABC fue primera bomba de flujo descubierta en *A. baumannii* que juega un papel principal en la resistencia a tigeciclina, carbapenémicos y aminoglucósidos (C. F. Xu et al., 2019).

1.1.8.2. Modificación en la permeabilidad de la membrana celular

La permeabilidad de la membrana celular bacteriana puede regularse haciendo uso de los canales de intercambio entre el espacio intracelular y el exterior. Estos canales o mejor conocidos como porinas de difusión general (Omps) son altamente específicos en especies de *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Bhamidimarri et al., 2019). Las membranas celulares de bacterias están compuestas por una bicapa asimétrica compuesta por lipopolisacáridos y fosfolípidos (Ghai & Ghai, 2018). En la parte externa de la membrana se encuentran diferentes tipos de proteínas porinas diana que han sido descubiertas en *A. baumannii* como OmpA, CarO y OccAB1 (Bhamidimarri et al., 2019). La modificación en su estructura puede comprometer la eficiencia en la absorción de los antibióticos al interior de las células y convertirlas en resistentes (Ghai & Ghai, 2018).

1.1.9. Resistencia mediada por plásmidos portadores de genes *tet(X)*

Las bacterias pueden obtener la resistencia por medio de dos rutas: la primera involucrada en la *mutación cromosomal* y la segunda como la adquisición de *elementos genéticos móviles* conocidos como plásmidos que son transferidos por medio de transferencia genética horizontal (Salgado-Camargo et al., 2020). Los plásmidos son moléculas de ADN que se replican de manera independiente del cromosoma y puede transferirse a la bacteria por medio de conjugación, lo cual representa un peligro por su fácil diseminación entre patógenos de prioridad crítica como *A. baumannii* (He et al., 2019).

En RAM reportes actualizados indican que *A. baumannii* posee la habilidad de adquirir mecanismos de resistencia de manera veloz (Ayoub Moubareck & Hammoudi Halat, 2020) y posee amplio repertorio de carbapenemasas de las que resaltan las oxacilinasas grupo OXA (Özçelik et al., 2020); impidiendo así la actividad de antibióticos convencionales. Por esta razón, es necesario recurrir a otros antibióticos como la tigeciclina. Sin embargo, se han identificado nuevos mecanismos resistentes a este antibiótico del cual resaltan aquellos codificados en plásmidos portadores de los genes *tet(A)* y *tet(K)* asociados a bombas de flujo que generan

resistencia (**Foong et al., 2020**). No obstante, la diseminación de genes *tet(X)* y sus variantes se ha convertido en una preocupación de importancia clínica.

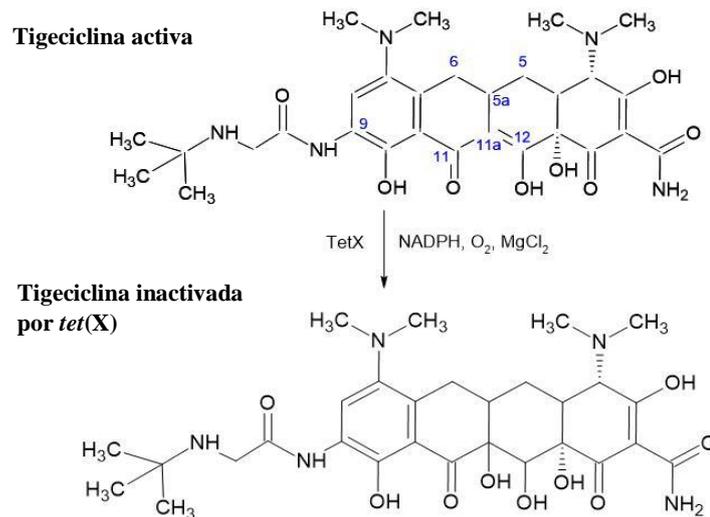
La resistencia a tigeciclina mediada por plásmidos es una amenaza emergente. Los genes *tet(X)* codificados en plásmidos se reportaron por primera vez en especies de Bacteroides (**He et al., 2019**). *tet(X)* y *tet(X2)* se han encontrado en países vecinos como Chile, Perú y Colombia. Los reservorios de estos genes se asocian con ecosistemas como el intestino humano, suelo, sedimentos, aerosoles ambientales y aguas provenientes de hospitales, ganado y ríos. A partir de *tet(X)*, las bacterias han desarrollado nuevas variantes (**Fang et al., 2020**).

Se han encontrado otros genes homólogos a *tet(X)* denominados *tet(X3)* y *tet(X4)* que codifican para enzimas que poseen una mayor actividad en la inactivación de la tigeciclina en comparación a *tet(X)* (**Figura 2B**) (**C.-Y. Cui et al., 2021**). Se piensa que se originaron por la transmisión de *tet(X)* entre *Flavobacteriaceae* y *E. coli/Acinetobacter spp* (**R. Zhang et al., 2021**). Además de *tet(X3)* y *tet(X4)*, *tet(X5)* se ha encontrado en plásmidos transferibles e inducibles en *Acinetobacter spp.* y otras especies de *Enterobacteriaceae* de origen humano y animal (**Wencewicz, 2019**), en lugares como África, China y Europa (**He et al., 2019**).

Las proteínas codificadas por *tet(X)* y sus homólogos son enzimas monooxigenasas dependientes de flavina que se caracterizan por la degradación de tetraciclina y sus derivados incluido tigeciclina, omadaciclina y eravaciclina (**Z.-H. Cui et al., 2020**). *tet(X)* solo es activado bajo condiciones aerobias ya que necesita de FAD, NADPH, Mg^{+2} y O_2 (**Fang et al., 2020**). La inactivación de tigeciclina mediada por estos genes se produce por la adición de un grupo hidroxilo en la posición C11a (11a-hidroxitigeciclina) lo cual produce la fragmentación irreversible del antibiótico (**Figura 3**) (**Wencewicz, 2019; Y. Xu et al., 2020**). El mecanismo de degradación de *tet(X3)*, *tet(X4)* y *tet(X5)* es similar a *tet(X)* pero con actividades más altas (**Fang et al., 2020**).

Figura 3.

Inactivación de la tigeciclina por mediada por *tet(X)*.



Nota: La tigeciclina puede inactivarse o degradarse mediante enzimas *tet(X)* y sus homólogos *tet(X3)* y *tet(X4)* que utilizan NADPH, O₂, MgCl₂ para la adición de un grupo hidroxilo a la posición C11a produciendo una 11a-hidroxitigeciclina, compuesto ha perdido su actividad antimicrobiana.

1.1.10. Métodos de determinación de sensibilidad antimicrobiana

Los métodos de determinación de sensibilidad antimicrobiana constituyen una primera fuente de información para escoger la mejor terapia antibiótica frente a una infección (Gajic et al., 2022). Entre los métodos de determinación de sensibilidad antimicrobiana se encuentran los de difusión en disco, dilución en agar y caldo, métodos automatizados y moleculares como MALDI-TOF MS, entre otros (Tenover, 2017). Debido a que el presente estudio utilizó un método de dilución en caldo para determinar el perfil de susceptibilidad a TGC, se explicará el fundamento del mismo.

Los métodos de dilución en caldo son los primeros métodos de susceptibilidad que se desarrollaron. Existen dos tipos principalmente: la macrodilución y la microdilución. En estos se utilizan diluciones dobles seriadas (p. ej. 16, 8, 4, 2 y 1 µg/ml) donde se evalúa la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) a la cual un antibiótico inhibe el crecimiento de un determinado microorganismo (Khan et al., 2019). La diferencia entre macrodilución y microdilución es el volumen final de caldo utilizado (1 ml y 50-100 µl respectivamente) (Jindal & Goswami, 2020).

1.1.11. Microdilución en Caldo

La microdilución en caldo es un prototipo reducido de la macrodilución en caldo y se desarrolla en una placa de 96 pocillos, donde cada pocillo tiene la capacidad de 100 μ l. En cada uno se colocan 50 μ l de medio Muller Hinton ajustado y 50 μ l de solución bacteriana a una concentración de 5×10^5 UFC/ml (**Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018**). La placa se debe incubar a 37 °C por 24 horas. Luego del tiempo de incubación, se determina la MIC como el valor de la concentración mínima a la cual no se observa turbidez o crecimiento (**Jindal & Goswami, 2020**). Las ventajas de la microdilución en caldo son economizar los recursos, asegurar la reproducibilidad de la técnica, la eficiencia y facilidad en comparación de la macrodilución en caldo. Sin embargo, los resultados, indistintamente del método, deben interpretarse en base a puntos de corte determinados (**Benkova et al., 2020**).

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son interpretados en base a los puntos de corte del microorganismo bajo la acción del antibiótico como susceptible, intermedio y resistente (**Syal et al., 2017**). Estos puntos de corte se han determinado en manuales o guías propuestos por organizaciones como el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) o EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing por sus siglas en inglés). Sin embargo, al no existir puntos de corte establecidos de tigeciclina para *A. baumannii*, el *Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes con resistencia extendida o panresistentes* sugirió utilizar los puntos de corte para Enterobacteriales ($R \geq 4\mu\text{g/ml}$, $I=2\mu\text{g/ml}$, $S \leq 1\mu\text{g/ml}$) (**Jiménez Pearson et al., 2019**).

1.2.Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Caracterizar los mecanismos de resistencia a tigeciclina en *A. baumannii* de origen ecuatoriano.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar los perfiles de resistencia a tigeciclina mediante el método de microdilución en caldo a los aislamientos de *A. baumannii* de la colección de microorganismos del CN-RAM.
- Identificar la presencia de los genes de resistencia a tigeciclina codificados en plásmidos a partir de técnicas moleculares en aislamientos de *A. baumannii* de la colección de microorganismo del CN-RAM.
- Contrastar los porcentajes de resistencia a tigeciclina y a otros antibióticos en los períodos prepandemia y pandemia.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

La presente investigación es de tipo cuantitativa debido a que se determinaron los perfiles de susceptibilidad a tigeciclina los cuales permitieron obtener las tasas de resistencia a este antibiótico durante los períodos prepandemia (2017-2018) y pandemia (2019-2021). La variable independiente son los aislamientos de *A. baumannii* de la colección de microorganismos del CN-RAM del INSPI. La variable dependiente es el perfil fenotípico y genotípico a tigeciclina y otros antibióticos.

Hipótesis nula

Los aislamientos de *A. baumannii* de la colección de microorganismos del CN-RAM recolectados en el período (2017-2021) seleccionados bajo criterios de inclusión-exclusión, no presentan tasas de resistencia elevadas a tigeciclina, ni genes *tet(X)*.

Hipótesis alternativa

Los aislamientos de *A. baumannii* de la colección de microorganismos del CN-RAM recolectados en el período (2017-2021) seleccionados bajo criterios de inclusión-exclusión, presentan tasas de resistencia elevadas a tigeciclina y genes *tet(X)*.

2.1.Materiales

Tabla 2.

Equipos de Laboratorio

Nombre	Cantidad
Autoclave Hiramaya (HV-85)	1
Estufa Memmert	1
Incubadora Memmert	1
Microcentrífuga Eppendorf	1
Cabina de flujo laminar Bioseguridad 2 Labconco	1
Ultracongelador (-80 °C)	1
Congelador GE (-20 °C)	1
Refrigerador General Electric (4 °C)	1
Balanza Analítica OHAUS	1
Mechero Bunsen	1
Vórtex Mixer	1
Turbidímetro	1
Termobloque Eppendorf	1
Termociclador Memmert	1
Cámara de Electroforesis	1
Transiluminador Memmert	1

Tabla 3.*Instrumental de Laboratorio*

Nombre	Cantidad
Asa de inoculación de metal	2
Asa desechable	150
Cajas mono Petri de plástico	300
Cajas bi Petri de plástico	20
Gradilla	4
Espátula	1
Juego de micropipetas Boeco	1 de cada tipo
Puntas de micropipeta	1 caja de cada tipo
Micropipeta multicanal 8 puestos	1
Tubos de vidrio con tapa rosca	300
Tubos de vidrio sin tapa	600
Tubos Eppendorf	600
Tubos para microcentrífuga	300
Cajas de congelación para crioviales	4
Pipeta 25 ml	2
Pera de succión	1
Matraz de vidrio	3
Palillos de madera	300
Hisopos	300
Cooler	1
Placas de 96 pocillos	18

Nombre	Cantidad
Fundas Ziploc	18

Tabla 4.

Reactivos

Nombre	Cantidad
Agar Nutritivo Oxoid®	100 g
Agar Muller - Hinton Oxoid®	20 g
Agar MacConkey Oxoid®	200 g
Agar TSI	10 g
Caldo Muller - Hinton ajustado	5 g
Caldo BHI	75 g
Caldo RMVP	10 g
Medio semisólido SIM	10 g
Solución fisiológica	2 litros
Glicerol	125 ml
Disco de antibióticos	1
Buffer TE	1 botella
Buffer de carga (Blue Juice)	1 paquete x 3 unidades
SYBR® Safe DNA Gel Strain	1 unidad
Agarosa	5 g
Agua destilada	1 galón
Agua bidestilada	1 botella

Tabla 5.*Insumos de escritorio*

Nombre	Cantidad
Toallitas desechables	1
Alcohol antiséptico	1
Rotulador	2
Cinta adhesiva	1
Cinta testigo de esterilización	1
Papel aluminio	1 rollo
Cloro	1 botella
Computador	1
Impresora	1
Esferos	1
Algodón	1
Guantes de nitrilo	1 caja x 100 unidades
Guantes de calor	1 par
Mascarilla	1 caja x 100 unidades

2.2.Métodos

2.2.1. Selección de la población

Por medio de la plataforma estadística y de registro WHONET 5.6 se filtraron los datos para la selección y clasificación de las muestras pertenecientes a INSPI en el estudio retrospectivo de *A. baumannii complex*. El primer filtro consistió en el período comprendido entre los años 2017 – 2021 de cepas recolectadas durante estos años. El segundo filtro se basó en el origen de las muestras las cuales debían proceder específicamente de pacientes en unidad de cuidados intensivos (UCI). El tercer y

último filtro recolectó la información de la fuente a partir de la cual se aisló el microorganismo con 5 variantes: traqueal, aspirado traqueal, bronquial, esputo inducido y esputo.

Se partió de una población de 299 cepas de *A. baumannii* recolectadas durante los años 2017 al 2021, de estos, se descartaron 7 cepas debido a que: no fueron viables (M73, M163, M274), no estaban presentes en la colección de microorganismos (M101) o presentaban contaminación por otras bacterias (M242, M243, M276). En total se tomaron 292 cepas con las cuales se procedió a realizar el presente estudio (**Anexo 1**).

2.2.2. Reactivación de cepas

Las cepas se tomaron de la colección de CRN-RAM y se inocularon en caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) con la finalidad de determinar su viabilidad. Luego de 24 horas se sembró cada cepa viable por método de estría escocesa en medio MacConkey con la finalidad de determinar la pureza de las cepas y se incubó por 24 horas a 37°C en aerobiosis (**Figura 4**). Las cepas que presentaron una morfología similar a *A. baumannii* con contaminación del vial se volvieron a purificar en agar MacConkey (**Bello-López et al., 2020**). Durante la verificación de viabilidad se descartaron las cepas número 73, 163 y 274, debido a que no presentaron crecimiento en los dos ensayos realizados en caldo BHI.

Figura 4.



Procedimiento de reactivación de cepas

Nota: La reactivación de cepas es necesaria para verificar la viabilidad y pureza de los aislamientos que se encuentran criopreservados en el banco de cepas.

2.2.3. Identificación bioquímica

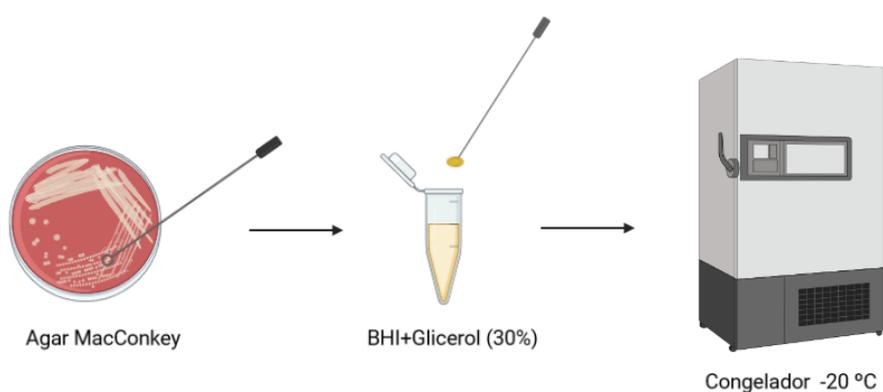
La identificación bioquímica se realizó a las cepas que presentaron una morfología distinta a *A. baumannii* en agar MacConkey. Las pruebas bioquímicas realizadas fueron: sulfuro, indol y motilidad (SIM), agar hierro triple azúcar (TSI) y el caldo rojo de metilo/Voges Proskauer (RM-VP) (De Vos et al., 2009). Se tomó una colonia de un cultivo en agar MacConkey, se inoculó en los medios descritos y se incubó por 24 horas. En el **Anexo 2** se indica el fundamento y los resultados de cada una de las pruebas bioquímicas. En este punto, se descartaron las cepas número 242, 243 y 276 por presentar contaminación desde el criovial.

2.2.4. Generación de copias de las cepas seleccionadas del cepario

Luego de sembrar los viales en agar MacConkey y verificar que las cepas pertenecen a *A. baumannii* mediante pruebas bioquímicas, se generan copias de los viales del cepario en tubos con BHI+ glicerol 30% (m/v). Se toma con un asa estéril una cantidad suficiente de inóculo y se coloca en un tubo de BHI+glicerol 30% (**Figura 5**). Se debe tomar una cantidad prudente de colonias para que las copias sean viables por mayor tiempo (**American Type Culture Collection, 2022**).

Figura 5.

Generación de copias de las cepas en BHI+glicerol 30% desde viales del cepario.



Nota: La generación de copias o réplicas evita contaminación cruzada por manipulación o el ambiente en el banco de cepas inicial.

2.2.5. Perfil de resistencia fenotípico

2.2.5.1. Microdilución en caldo de tigeciclina

La microdilución en caldo es un método que permite evaluar la MIC de un antibiótico en específico. Primero, es esencial estandarizar la placa de tigeciclina. Para ello, se preparó una solución madre (SM) en diferentes viales a una concentración de 1002.75 $\mu\text{g/ml}$ disolviendo el antibiótico en polvo en un disolvente apropiado, en este caso agua y DMSO (**Anexo 3**). Los viales con la SM se almacenaron a -80°C . Una vez que se utiliza un vial de SM para preparar placas de tigeciclina, este debe ser descartado (**Albán Marañón, 2017**).

Se preparó una solución de trabajo (ST) a una concentración de 8 $\mu\text{g/ml}$ a partir de la SM. Se utilizó medio MHB fresco, es decir, preparado el mismo día de la placa. Se realizaron diluciones seriadas a partir de la ST para obtener concentraciones finales en el pocillo de 4, 2 y 1 $\mu\text{g/ml}$ (**Anexo 4**). La organización de la placa se muestra en la **Tabla 6**. La placa tiene 8 filas y 12 columnas dando un total de 96 pocillos. En cada fila se coloca una concentración distinta y en cada columna se ubican 1 muestra. Al utilizar 4 concentraciones (4, 2, 1 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$), se puede dividir la placa en dos partes. Por lo tanto, se colocaron 12 muestras en las 4 primeras filas (A-D) y otras 12 muestras en las 4 filas restantes (E-H) (**Albán Marañón, 2017; Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021**).

Tabla 6.

Modelo de placa de microdilución con 4 concentraciones para 24 muestras.

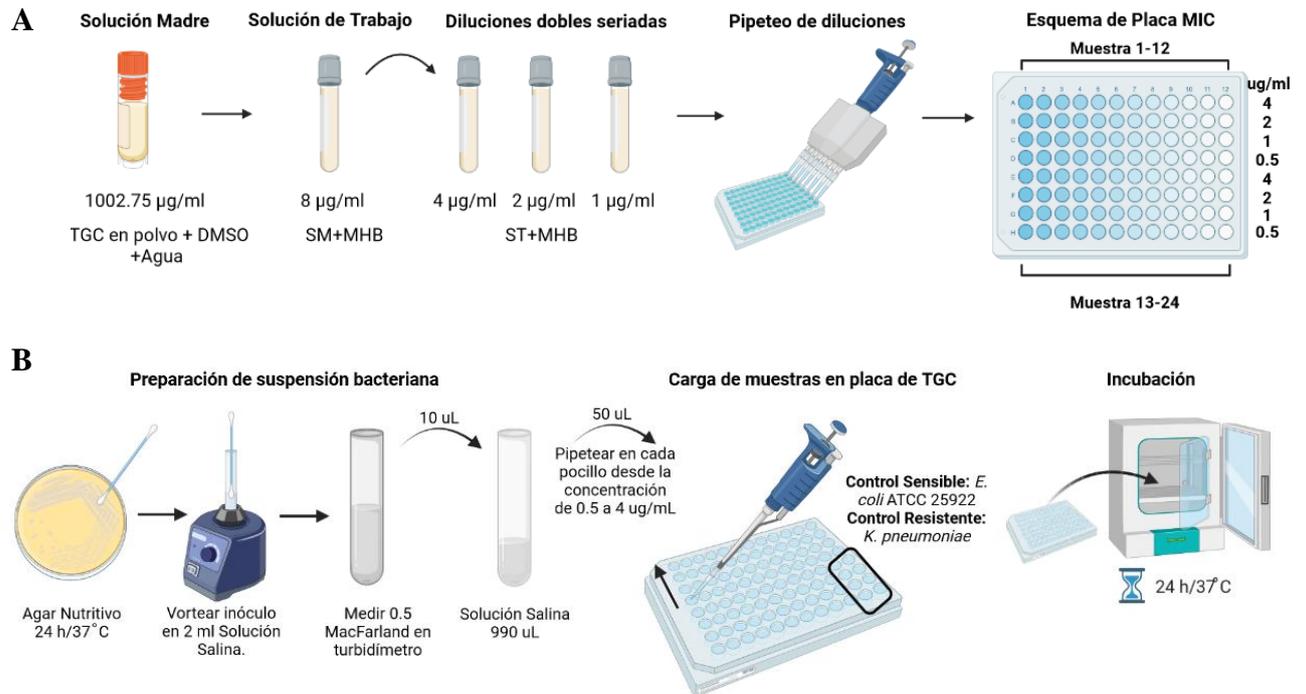
Filas (TGC µg/ml)	Columnas (Muestras)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A (4)												
B (2)												
C (1)												
D (0.5)												
E (4)												
F (2)												
G (1)												
H (0.5)												
Filas (TGC µg/ml)	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	Columnas (Muestras)											

Nota: Cada fila tiene una concentración de antibiótico TGC distinta. El rango de concentraciones a evaluar va desde 4 a 0,5 µg/ml y permite examinar 24 suspensiones bacterianas (columnas). Las suspensiones bacterianas número 1-12 se colocan en las filas A-B (azul) mientras que las suspensiones número 13-24 se colocan en las filas E-H (amarillo). El control positivo y negativo usualmente se ubica en las columnas finales (23 y 24).

Cepas puras de *A. baumannii* se sembraron en agar nutritivo y se incubaron por 24 horas. Se prepararon soluciones bacterianas con solución salina 0.9% a una concentración de 0.5 MacFarland que equivale a 1.5×10^8 UFC/ml. Se tomaron 10 µl de solución bacteriana y se colocaron en 990 µl de solución salina (dilución 1/100) para obtener una concentración final de solución bacteriana de 1.5×10^6 UFC/ml. Se tomaron 50 µl de solución bacteriana y se colocaron en los pocillos desde la concentración de 0.5 a 4 µg/ml (**Figura 6**). El volumen final del pocillo es de 100 µl puesto que se colocan 50 µl de dilución con el antibiótico y 50 µl de solución bacteriana. Las placas se incubaron a 37 °C de 18 a 24 horas (**Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022**).

Figura 6.

Técnica de microdilución en caldo.



Nota: (A) Preparación de una placa de tigeclina para 24 muestras (TGC). (B) Preparación de solución bacteriana y carga de muestras en la placa. La concentración final del pocillo luego de añadirse la suspensión bacteriana es de 4 a 0,5 µg/ml.

2.2.5.2. Lectura de Placas

Se realizó la lectura de la placa de tigeclina luego de 24 horas de incubación. Se registró la Concentración Mínima Inhibitoria de cada muestra. La CMI se considera como la concentración donde no se observa crecimiento en el pocillo de la placa de tigeclina. Los controles que se utilizaron fueron dos cepas: una sensible y una resistente. La cepa sensible utilizada fue la *E. coli* ATCC 25922 y la cepa resistente fue una *K. pneumoniae* perteneciente al CN-RAM. Para la interpretación de los datos, se consideraron los puntos de corte presentados en la **Tabla 7**.

Tabla 7.

Puntos de corte MIC para A. baumannii.

Antibiótico	Puntos de Corte MIC (ug/ml)		
	S	I	R
Tigeciclina	≤ 1	2	≥ 4

Nota: El perfil de susceptibilidad a un antibiótico está determinado por tres categorías. S: susceptible. I: intermedio. R: resistente. Los puntos de corte MIC fueron tomados de (Jiménez Pearson et al., 2019).

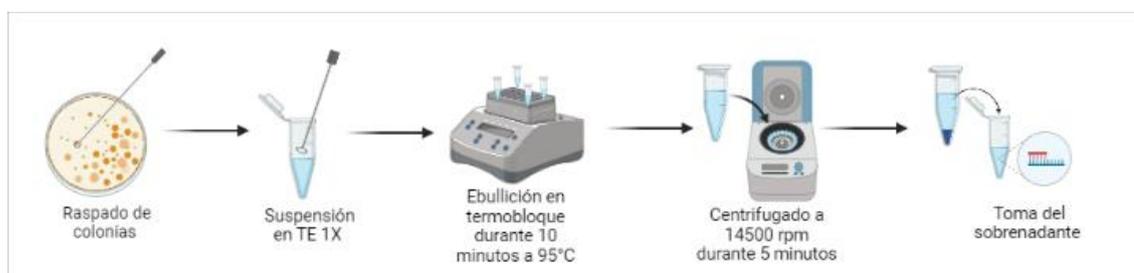
2.2.6. Perfil de resistencia genotípico

2.2.6.1.Extracción de ADN

Se sembró en agar nutritivo las 292 cepas, pasado 24 horas por medio de raspado de colonias se cargó en viales con 250 µl de solución TE 1X y se homogenizó por medio de agitación en vórtex. Para la extracción del material genético se empleó el método de ebullición, por medio de Termobloques *Eppendorf* y *Labnet* se ajustó a la temperatura a 95°C durante 10 minutos. Posteriormente las suspensiones obtenidas se centrifugaron a 14500 rpm durante 5 minutos. Finalmente se recolectó el sobrenadante en otro vial y se almacenó a una temperatura de -20°C. El proceso puede visualizarse en la **Figura 7**.

Figura 7.

Extracción de ADN por ebullición.



Nota: Al finalizar el proceso se conservan los viales a -20°C. Las muestras deben ser agitadas en vórtex previamente antes de ponerse en el termobloque.

2.2.6.2.Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Electroforesis

Se diseñaron muestras compuestas de cepas sensibles y sensibles intermedias a TGC tomando 100 µl de cada aislamiento como se detalla en el **Anexo 5**. Las muestras sensibles a TGC se agruparon en 7 y se colocaron en un vial, mientras que en las muestras compuestas intermedias se tomaron 3 aislamientos individuales y las muestras resistentes fueron evaluadas individualmente para identificar los genes de interés. El total de muestras compuestas procesadas para PCR fueron 99.

Para la detección de los genes *tet(X)* y sus homólogos *tet(X3)* y *tet(X4)*, se utilizaron *primers* generales porque pueden identificar hasta 14 variantes de *tet(X)*. Las condiciones se describen como: una desnaturalización inicial a 96 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C por 30 segundos, alineamiento a 52 °C por 30 segundos, una extensión a 72 °C durante 30 segundos y elongación final a 72 °C por 7 minutos. Como no se detectó ninguna de las variantes de *tet(X)* al usar los *primers* generales, no fue necesario el uso de los *primer* específicos para *tet(X3)* y *tet(X4)*. En la **Tabla 8** y **Figura 8A-C** se puede observar un esquema general de las condiciones de PCR para los genes descritos anteriormente.

Una vez identificadas las muestras que presenten los genes de resistencia *tet(X)*, se evaluó si las mismas poseen resistencia a otras carbapenemasas (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*). Las condiciones de PCR son una desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 minutos, seguido de 36 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento por 40 segundos, el detalle de las temperaturas de alineamiento se describe en la **Tabla 8**, una extensión a 72 °C por 50 segundos y una elongación final a 72 °C por 5 minutos (**Albán Maraño, 2017; Poirel et al., 2011**). En la **Figura 8D** se puede observar un esquema general de las condiciones de PCR para los genes de carbapenemasas descritos anteriormente.

Las condiciones de PCR para los genes *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M general}*, comienzan con una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 15 segundos, alineamiento por 1 minuto, el detalle de las temperaturas de alineamiento se describe en la **Tabla 8** y **Figura 9A-B**, una extensión a 72 °C durante 1.3 minutos y una elongación final a 72 °C por 4 (**Albán**

Marañon, 2017; Colomer-Lluch et al., 2011). Mientras que los genes *bla_{SHV}* y *bla_{CMY}* comienzan con una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento por 30 segundos (el detalle de las temperaturas de alineamiento se encuentra en la **Tabla 8** y **Figura 9C-D**), una extensión a 72 °C durante 1 minuto y una elongación final a 72 °C por 5 minutos (**Albán Marañon, 2017; Dierikx et al., 2012**). Al no detectarse *tet(X)* no se examinó la presencia de estos genes.

Tabla 8.*Secuencias de los primers utilizados en PCR.*

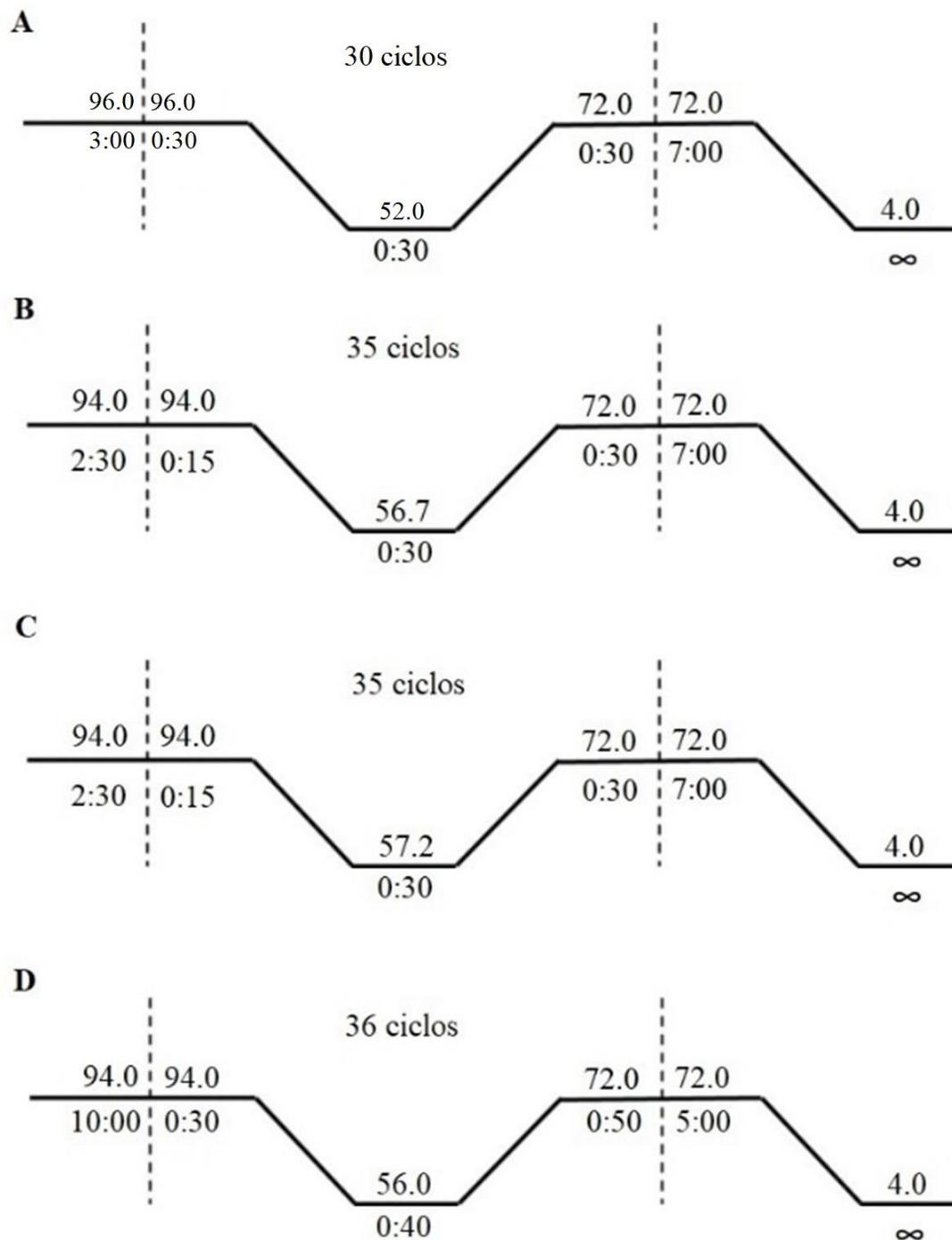
Proteína	Gen	Orientación	Secuencia 5' – 3'	Producto de PCR (pb)	T(°C) alineamiento	Referencia
Monooxigenasas dependientes de flavina	<i>tet(X)</i> general	Forward	TTCAGGTCAGGAAGCAATGAAAA	780	52	(Hsieh et al., 2021)
		Reverse	TTTACGCCTTGTCTGCAAAAGG			
	<i>tet(X3)</i>	Forward	TAATGGCGGGACATCAGG	294	56.7	(He et al., 2019)
		Reverse	AGGCGACATCAAATGAGCAG			
	<i>tet(X4)</i>	Forward	CCGATATTCATCATCCAGAGG	328	57.2	(He et al., 2019)
		Reverse	CGCTTACTTTTCCAAGACTTACCT			
Carbapenemasas	<i>bla_{OXA-48}</i>	Forward	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	56	(Poirel et al., 2011)
		Reverse	CATCAAGTTCAACCCAACCG			
	<i>bla_{KPC}</i>	Forward	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798	56	(Poirel et al., 2011)
		Reverse	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG			
	<i>bla_{NDM}</i>	Forward	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621	56	(Poirel et al., 2011)
		Reverse	CGGAATGGCTCATCACGATC			

Proteína	Gen	Orientación	Secuencia 5' – 3'	Producto de PCR (pb)	T(°C) alineamiento	Referencia
β-lactamasas	<i>bla_{VIM}</i>	Forward	GATGGTGTGGTTCGCATA	390	56	(Poirel et al., 2011)
		Reverse	CGAATGCGCAGCACCAG			
	<i>bla_{IMP}</i>	Forward	GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC	232	56	(Poirel et al., 2011)
		Reverse	GGTTTAAAYAAAACAACCACC			
	<i>bla_{TEM}</i>	Forward	CTCACCCAGAAACGCTGGTG	569	63	(Colomer-Lluch et al., 2011)
		Reverse	ATCCGCCTCCATCCAGTCTA			
	<i>bla_{CTX-M}</i> general	Forward	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	593	50	(Colomer-Lluch et al., 2011)
		Reverse	TGGGTRAARTARGTSACCAGA			
	<i>bla_{SHV}</i>	Forward	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	796	56	(Dierikx et al., 2012)
		Reverse	GAT TTGCTGATTCGCTCGG			
	<i>bla_{CMY}</i>	Forward	ATGATGAAAAAATCGTTATGCTGC	1138	58	(Dierikx et al., 2012)
		Reverse	GCTTTTCAAGAATGCGCCAGG			

Nota: Código IUPAC de las bases de nitrogenadas. A= Adenina. T= Timina. G= Guanina. C= Citosina. Y = C o T. R= A o G. S= G o C.

Figura 8.

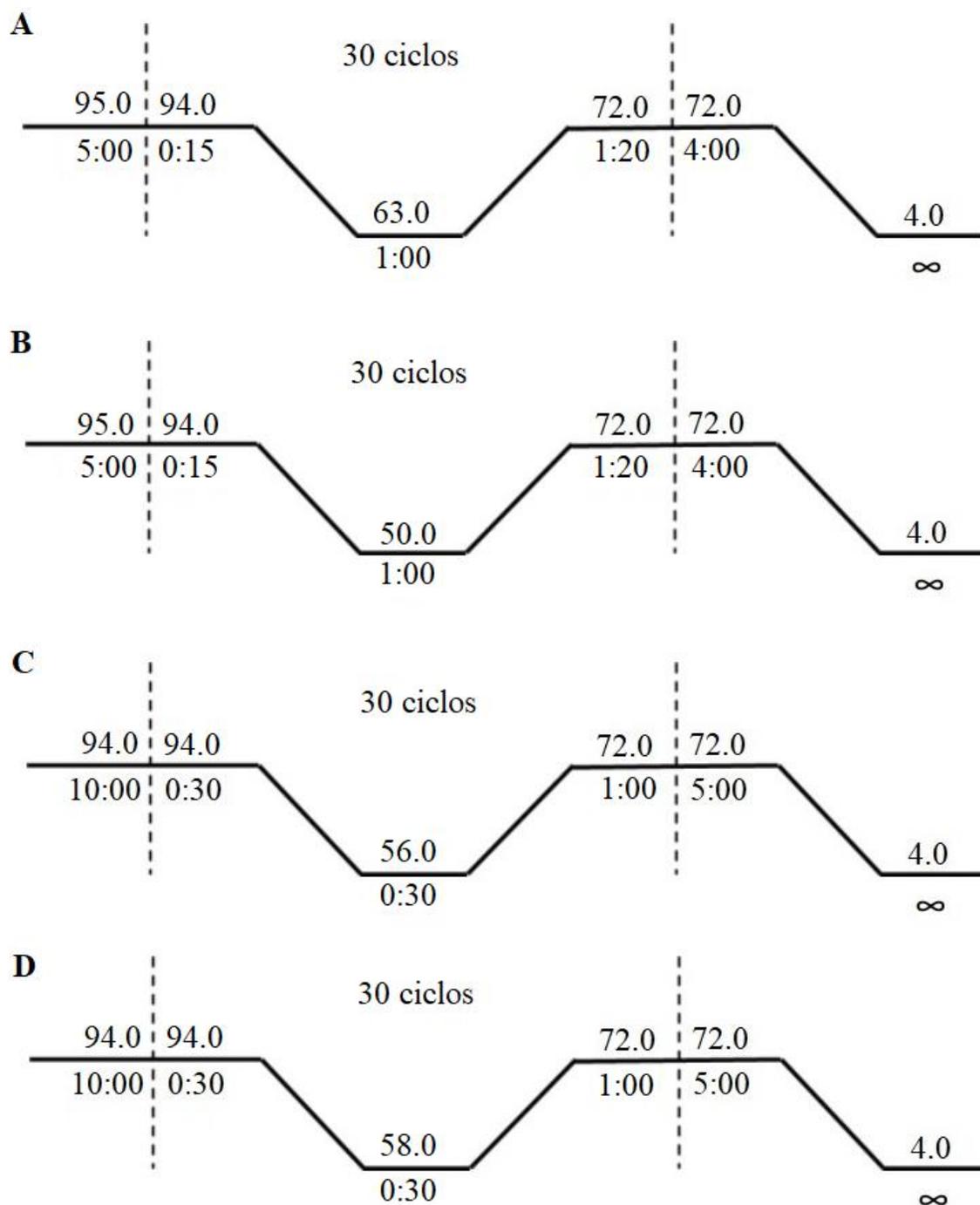
Condiciones de reacción de PCR para genes de resistencia a tigeciclina y carbapenémicos.



Nota: Condiciones de PCR. (A) PCR *tet(X)* general. (B) PCR *tet(X3)*. (C) PCR *tet(X4)*. (D) PCR para los genes de carbapenemasas (*bla_{OXA-48}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*).

Figura 9.

Condiciones de reacción de PCR para genes de resistencia a betalactámicos.

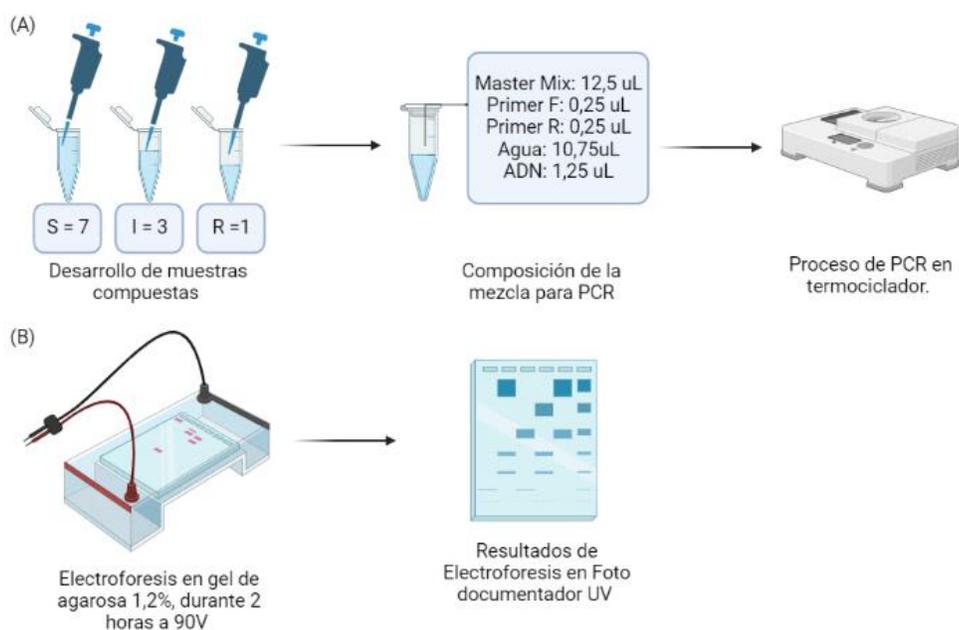


Nota: Condiciones de PCR para los genes de betalactamasas. **A.** PCR *bla_{TEM}*. **B.** PCR *bla_{CTX-M general}*. **C.** PCR *bla_{SHV}*. **D.** PCR *bla_{CMY}*.

Para cada PCR desarrollada se empleó la misma cantidad de Máster Mix y *primers*, con un valor de 12,5 μ l de la polimerasa *Dream Taq*, 0,25 μ l de cada *primer* (Forward y Reverse), 10,75 μ l de agua grado molecular libre de nucleasas y de DNA 1,25 μ l ajustando un volumen final de 25 μ l. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa 1,2% teñido con *SYBR® Safe DNA Gel Stain* y cada muestra cargada con 5 μ l de gel de carga *BlueJuice*, junto a las muestras se encontró un marcador de peso molecular para la comparación con las bandas resultantes. La corrida de electroforesis duró 2 horas a 90V y los resultados se visualizaron en un fotodocumentador UV. El proceso se detalla en la **Figura 10**.

Figura 10.

PCR y electroforesis en gel de agarosa.



Nota: El ADN extraído de cada muestra se clasificó en base a su perfil de susceptibilidad a TGC. Las muestras sensibles se agruparon en equipos de 7, mientras que aquellas con susceptibilidad intermedia hicieron grupos de 3. Las muestras resistentes se analizaron individualmente. Se realizó una (A) PCR y los productos obtenidos se corrieron en una (B) Electroforesis en gel de Agarosa.

2.3. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los porcentajes de resistencia a tigeciclina y otros antibióticos en los períodos prepandemia y pandemia se realizaron mediante la prueba chi cuadrado (χ^2) desarrollado en el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 25. Se consideró como estadísticamente significativo a un p-valor menor a 0.05. Por medio de un análisis de conglomerados representado en un *heatmap* o mapa de calor, se realizó una clasificación de datos a través del criterio de distancia Euclídea y se compararon los perfiles fenotípicos a antibióticos en los años 2017-2021.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este estudio describe el perfil fenotípico de susceptibilidad a tigeciclina y otros antibióticos, así como su perfil genotípico en aislamientos bacterianos de *A. baumannii* recolectados entre los años 2017 al 2019 (período prepandemia) y 2020-2021 (período pandemia).

3.1.Descripción de la población

Las variables epidemiológicas proporcionadas por la base de datos WHONET 5.6 del CN-RAM se describen en la **Tabla 9**. Entre ellas se encuentran el *tipo de muestra* respiratoria (br, ei, es, tq, tr) que permitió inicialmente la selección de las cepas; el género (masculino y femenino); *categoría de edad* dividido en neonatal (hasta un mes de edad), adultos (mayores a 18 y menores a 60 años) y tercera edad (mayor o igual a 60 años), cabe destacar que no existieron cepas pertenecientes a niños y adolescentes; el *diagnóstico* se agrupó en 8 tipos de patologías como genitourinarias, cerebrovasculares, isquémicas, septicemia, respiratorias donde se coloca como una división importante al COVID-19, neoplasias y traumatismos; y, por último, la *localización* representada por la provincia origen de cada cepa. A las características no registradas se las agrupó como *sin especificar* y respecto a las patologías que representaban un pequeño porcentaje del total se las clasificó como *otros*.

Tabla 9.

Descripción de la población según variables epidemiológicas.

Característica	<i>f</i>	%
Género		
Masculino	191	65,4
Femenino	100	34,2
^a Sin especificar	1	0,3

Característica	f	%
Tipo de muestra		
Bronquial (br)	15	5,1
Espujo inducido (ei)	1	0,3
Espujo (es)	11	3,8
Traqueal aspirado (tq)	151	51,7
Traqueal (tr)	114	39,0
Categoría de edad		
Neonatal	4	1,4
Adultos	122	41,8
Tercera Edad	165	56,5
^a Sin especificar	1	0,3
Diagnóstico		
COVID-19	68	23,3
Patologías del sistema respiratorio	63	21,6
Patologías del sistema genitourinario	20	6,8
Septicemia	26	8,9
Neoplasias	5	1,7
Patologías cerebrovasculares	5	1,7
Traumatismos	4	1,4
Patologías isquémicas	4	1,4
^a Sin especificar	79	27,1
^b Otros	18	6,2
Localización		
Azuay	8	2,7
Pichincha	54	18,5
Santo Domingo de los Tsáchilas	27	9,2
Guayas	202	69,2
Tungurahua	1	0,3

Nota: La información sobre las variables epidemiológicas de género, tipo de muestra, categoría de edad, diagnóstico y localización fue tomada de la base de datos WHONET 5.6 del CRN-RAM.

^a Sin especificar: Características no registradas.

^b Otros: Otras patologías que no pertenecen a la clasificación descrita.

En el presente estudio se tomaron todos los aislamientos provenientes de muestras de tipo respiratorio en pacientes de UCI donde se observa que el tipo traqueal aspirado fue el predominante con el 51,7%. *A. baumannii* se caracteriza por ser uno de los patógenos clínicos más asociado a infecciones comunitarias y nosocomiales como la neumonía asociada a ventilación (NAV), infecciones del torrente sanguíneo, tracto urinario, piel y tejidos blandos en pacientes de UCI. Este patógeno ha sido el responsable del 8 al 14% de NAV en Europa

y en mayor medida del 19 al >50% en países de Asia, Latinoamérica y Oriente Medio. La tasa de mortalidad de *A. baumannii* es del 52 al 66% y el sitio de infección más frecuente es de tipo respiratorio con el 53,1% a diferencia de las provenientes de heridas quirúrgicas, sangre u orina (**Sarshar et al., 2021**). Cabe mencionar que del origen los aislamientos examinados pueden destacarse otras características como edad, diagnóstico y localización.

Las personas de tercera edad representan el 56,5% de las cepas aisladas. Es frecuente que pacientes de este tipo sean propensos a sufrir infecciones si presentan otras enfermedades asociadas como inmunosenescencia, comorbilidad, malnutrición, enfermedades crónicas o un acceso limitado a cuidados adecuados. Además de estos, otros factores biológicos, culturales y sociales pueden ocasionar que sean más susceptibles a padecer infecciones (**Esme et al., 2019**). Entre las patologías predominantes, las infecciones son una de las tres causas más frecuentes de muerte en personas mayores a 65 años (**Dimopoulos et al., 2019**).

Una de las patologías más representativa en pacientes de UCI fueron las patologías de tipo respiratorio como COVID-19, mismo que ocupa el segundo lugar con el 23,3% luego del 27,1% correspondiente a los casos *sin especificar*. De esta forma se infiere que la pandemia ocasionada por COVID-19 incrementó la demanda de asistencia respiratoria de UCI para pacientes con cuadros graves de infección (**Armstrong et al., 2020**). Adicional a esto, se ha encontrado que las tasas de infección y mortalidad por COVID-19 incrementan con la edad lo cual explica que más del 50% de casos reportados sean de personas de tercera edad (**Mills et al., 2020**).

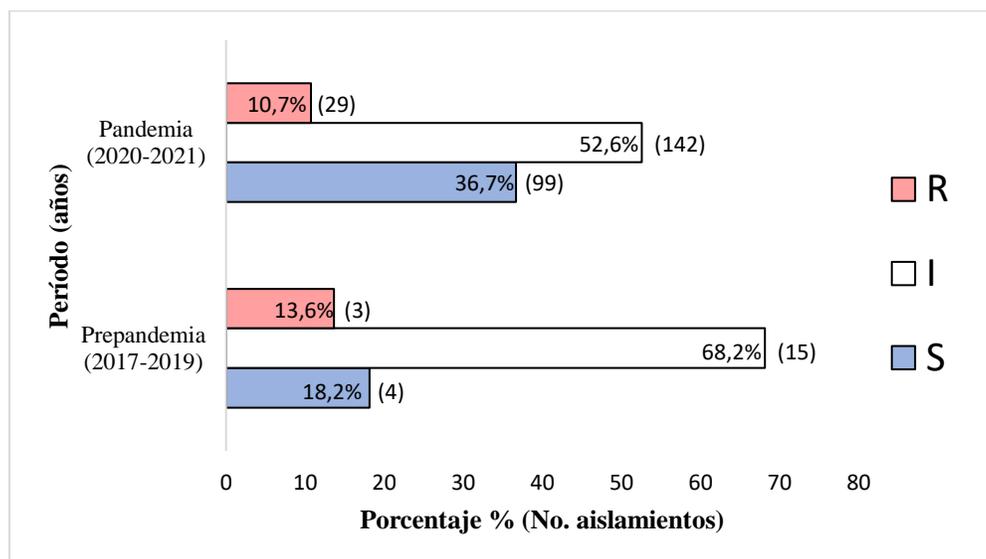
Respecto a la localización, se encontró que la mayor parte de las cepas se reportaron en la provincia de Guayas con el 69,2% a diferencia de Pichincha que representa el 18,5%; Santo Domingo de los Tsáchilas con el 9,2%; Azuay con 2,7% y en menor medida Tungurahua con el 0,3%. La ciudad de Guayaquil pertenece a la provincia de Guayas donde se reportaron un mayor número de casos de COVID-19 seguido de la ciudad de Quito ubicada en la provincia de Pichincha (**Santilán & Palacios, 2020**). La concurrencia en los casos reportados en estas ciudades puede deberse a que Guayaquil y Quito son dos de los principales centros de aglomeración del país donde gran parte de la población del país se concentra (**Boonsaeng et al., 2023**).

3.2. Evaluación de los perfiles de resistencia a tigeciclina mediante el método de microdilución en caldo

En la **Figura 11** se observa el perfil de susceptibilidad a TGC dividido en resistente (R), intermedio (I) y sensible (S) determinados en base a los puntos de corte ($R \geq 4\mu\text{g/ml}$, $I=2\mu\text{g/ml}$, $S \leq 1\mu\text{g/ml}$) descritos en la **Tabla 7** en los períodos pandemia y prepandemia (En el **Anexo 6** se puede visualizar una placa de microdilución luego de colocar suspensiones bacterianas e incubar por 24 horas). De manera general, el porcentaje de resistencia a tigeciclina de toda la colección de microorganismos analizada fue de 10,9% (32/292).

Figura 11.

Perfil de susceptibilidad a TGC en cepas de A. baumannii.



Nota: La gráfica representa el porcentaje de aislamientos resistentes (R, $\text{MIC} \geq 4$), intermedios (I, $\text{MIC} = 2$) y sensibles (S, $\text{MIC} \leq 1$) a TGC. El paréntesis (X) ubicado a lado de cada porcentaje representa el número de cepas que pertenecen a esa categoría. De los 292 aislamientos evaluados, al período prepandemia le corresponden 22 cepas y al período pandemia 270 cepas.

La resistencia a tigeciclina ha incrementado en los últimos años representando así una amenaza emergente para los sistemas de salud (Jo & Ko, 2021). En la presente investigación se observó una disminución de aproximadamente el 3% en el número de cepas resistentes a tigeciclina del período prepandemia al período pandemia. Por otro lado, se encontró un

incremento en el porcentaje de cepas con susceptibilidad intermedia del 52,6 al 68,2%. A pesar de que existió una disminución en el porcentaje de cepas resistentes, hay que considerar que el número de muestras aisladas del período prepandemia es menos representativo (n=22) en comparación al período pandemia (n=270). En este sentido, es sustancial inspeccionar el panorama sobre la resistencia a TGC en otros países alrededor del mundo.

Un estudio realizado a nivel global identificó un incremento del 40% de cepas aisladas de *A. baumannii* MDR durante los años 2004 y 2014. Del total de cepas solo el 31% pertenecía a Norteamérica, encontrándose a países de África, Latinoamérica y Oriente Medio como aquellos donde se concentran la mayor parte de *A. baumannii* MDR (**Giammanco et al., 2017**). A su vez, el Programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY recolectó aislamientos de *A. baumannii* (102/1881) en el período 2005-2011 que mostraron una MIC de $>2 \mu\text{g/ml}$ y procedían de Brasil, México, Chile y Panamá (**Costello et al., 2016**). A pesar de que no existen estudios recientes sobre el panorama de *A. baumannii* resistente a tigeciclina en Latinoamérica, es evidente que hace más de una década ya se encontraron valores de MIC elevados. En Ecuador poco a poco la situación es similar dado que algunos aislamientos (32/292) utilizados en este estudio (2017-2021) presentaron valores de MIC $\geq 4 \mu\text{g/ml}$.

Por otra parte, la situación en continentes como Asia es preocupante porque se han descubierto aislamientos resistentes a mayores concentraciones de tigeciclina en comparación a los examinados en este estudio. En China se reportó una tasa de resistencia del 2,49% en el año 2020 (n=2102 cepas de UCI) cuyos puntos de corte de susceptibilidad y resistencia fueron $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ respectivamente (**Liu et al., 2022**). Asimismo, existen trabajos recientes en Irán que muestran aislamientos de *A. baumannii* (n=6) con valores de MIC para tigeciclina desde 4 hasta $8 \mu\text{g/ml}$, lo cual al considerar los puntos de corte utilizados como referencia en la presente investigación (**Tabla 7**) pueden considerarse como resistentes (**Haeili et al., 2021**).

3.3. Identificación de los genes de resistencia a tigeclina codificados en plásmidos a partir de técnicas moleculares.

En esta sección, se realizó la detección de los genes de resistencia a tigeclina *tet(X)* (14 variantes), así como las variantes emergentes *tet(X3)* y *tet(X4)* mediante PCR. Sin embargo, los resultados de la colección evaluada (n=292) fueron negativos. Adicional a esto, se realizó la detección de genes de resistencia móvil a colistina *mcr-1* así como los genes de resistencia a carbapenemasas de tipo *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, cuyos resultados fueron negativos para la colección evaluada. Los datos proporcionados en la **Tabla 10** muestran la frecuencia de la presencia de genes que confieren resistencia a betalactámicos de clase D como los que codifican para enzimas carbapenemasas OXA (-23, -24, -51, -143, -12, -21, -581, -58) cuyas variantes fueron analizadas por el CN-RAM (Las combinaciones de dobles y triples OXA se muestran en la **Figura 12**). No se realizó la detección de los genes de resistencia a betalactámicos, ya que el estudio se enfocó en la caracterización de los potenciales aislamientos portadores de genes *tet(X)*, tal como lo descrito en la propuesta de perfil de tesis.

Tabla 10.

Frecuencia de genes que presentan resistencia a antibióticos en A. baumannii.

Familia de antibióticos	Gen	Presenta (%)	
		Sí	No
Tetraciclinas	<i>tet(X)</i>	0 (0)	292 (100)
	<i>tet(X3)</i>	0 (0)	292 (100)
	<i>tet(X4)</i>	0 (0)	292 (100)
Polimixinas	<i>mcr-1</i>	0 (0)	292 (100)
Carbapenemasas de clase D (OXA)	OXA-21	2 (0,7)	290 (99,3)
	OXA-23	124 (42,5)	168 (57,5)
	OXA-24	124 (42,5)	168 (57,5)
	OXA-51	276 (94,5)	16 (5,5)
	OXA-58	16 (5,5)	276 (94,5)
	OXA-143	85 (29,1)	207 (70,9)
	OXA-151	1 (0,3)	291 (99,7)
Otras carbapenemasas	<i>bla_{IMP}</i>	0 (0)	292 (100)
	<i>bla_{KPC}</i>	0 (0)	292 (100)

Familia de antibióticos	Gen	Presenta (%)	
		Sí	No
	<i>bla_{VIM}</i>	0 (0)	292 (100)
	<i>bla_{NDM}</i>	0 (0)	292 (100)

Nota: Se presenta el número de cepas positivas y negativas a los genes de resistencia a tetraciclinas (TGC) como a otros antibióticos. Los porcentajes se calcularon en base al total de aislamientos analizados (n=292). La detección de las carbapenemasas de clase D (OXA) fue realizada por el CRN-RAM.

La presencia de genes *tet(X)* localizados en plásmidos les confieren elevados niveles de resistencia a tigeciclina a bacterias de prioridad crítica como *A. baumannii* (Aminov, 2021). A pesar de que comparten el 85,6-94,5% identidad en su secuencia de aminoácidos, *tet(X3)* y *tet(X4)* poseen mayor actividad hidrolizante en antibióticos de último recurso como las tetraciclinas (p. ej. tigeciclina, eravaciclina y omadaciclina) (Fang et al., 2020). La distribución de 155 aislamientos portadores de genes *tet(X)* y sus variantes *tet(X3)* y *tet(X4)* que fueron recolectados en 23 países alrededor del mundo, demuestra que existe una mayor abundancia en China, EE. UU. y Tailandia. Las variantes dominantes son distintas según cada país. En China predominaron los genes *tet(X/X2/X3/X4)* a diferencia de EE. UU. y Tailandia donde el genotipo más común fue *tet(X/X2)* y *tet(X3/X4)* respectivamente. Por este motivo, es indispensable identificar los potenciales reservorios de estos genes (Pan et al., 2020).

Probablemente, la diseminación de *tet(X3)* sucede entre animales como cerdos, palomas, ganado, gansos y patos; mientras que *tet(X4)* se dispersa entre pollos, aves silvestres, cerdos, humanos y ambiente (R. Zhang et al., 2021). El gen *tet(X3)* se ha encontrado en aislamientos de *Acinetobacter* spp. en China, Irlanda, Tailandia y Colombia (No. acceso GenBank MK134375.1, TSH67752.1, UFIO01000023.1 y CBS020000122.1 respectivamente) en muestras ambientales y de porcino o humanos. Asimismo, el gen *tet(X4)* se encontró en China, Reino Unido y Tailandia en *E. coli* (No. acceso GenBank CP040929.1), *S. enterica* (No. acceso GenBank EAA5068520.1) y *K. pneumoniae* (No. acceso GenBank NQBP01000050.1) aislados de muestras de origen humano y animal (aves migratorias y heces de cerdo) (Fang et al., 2020). En contraste con los países mencionados, en Ecuador no existen estudios donde se hayan detectados genes *tet(X)* y sus homólogos *tet(X3)* y *tet(X4)*.

Al observar la tendencia en la diseminación de *tet(X)* y sus homólogos *tet(X3)* y *tet(X4)* en el mundo, se realizó su detección en los aislamientos de *A. baumannii* del presente estudio; sin embargo, ninguno de los aislamientos fue portador de estos genes. Se deduce que los aislamientos resistentes a tigeciclina (32/292) presentaron otros mecanismos de resistencia. La resistencia a tigeciclina en *A. baumannii* se ha asociado en su mayoría a la sobreexpresión de bombas de flujo de miembros de la familia RND como AdeABC, AdeFGH y AdeIJK; y de estas, la bomba de flujo tipo AdeABC destaca como principal mecanismo de resistencia (**Gerson et al., 2018**). El complejo AdeABC se encuentra a nivel cromosómico y se compone de tres proteínas AdeA, AdeB y AdeC que codifican para proteínas de unión de membrana, transportadores multidrogas y proteínas del canal de membrana, respectivamente (**C. F. Xu et al., 2019**). Este tipo de bomba de flujo utiliza un gradiente de protones (H⁺) para forzar la salida del antibiótico e intercambiarlo por el ingreso de H⁺ (**Abdi et al., 2020**).

La expresión del complejo AdeABC está regulada por el sistema de dos componentes AdeRS (*adeS* como sensor quinasa y *adeR* como regulador de respuesta) (**Gerson et al., 2018**). La sobreexpresión de este complejo puede darse por una mutación en el sistema AdeRS o la inserción de una secuencia de inserción IS*Aba1* aguas arriba del operón de AdeABC (**Gupta et al., 2022**). En Latinoamérica las cepas de *A. baumannii* recolectadas por SENTRY (2005-2011) con valores de MIC >2 µg/ml presentaron niveles de expresión de altos de *adeA* (**Costello et al., 2016**). Un grupo de investigación en Irán encontró que aislamientos de *A. baumannii* (n=46) resistentes a tigeciclina (31/46) poseían genes *adeA*, *adeB* y *adeC* y, en el 38,7% de los casos, pueden incrementar hasta 4 veces la MIC de tigeciclina (**Abbas et al., 2020**). Igualmente, en China existe una expresión alta de los genes de los complejos AdeABC y AdeFGH en aislamientos CRAB (casi el 80% eran resistentes a tigeciclina) a diferencia de aquellos que eran susceptibles a carbapenémicos (**T. Zhang et al., 2021**).

Otro de los mecanismos de resistencia a tigeciclina en *A. baumannii* son las modificaciones en la permeabilidad de su membrana por medio de porinas, las cuales son proteínas externas de la membrana que facilitan el ingreso o salida de material. Algunas como la *OmpA* producen la adhesión de *A. baumannii* a las células epiteliales y favorece la formación de biofilms. Se ha estudiado su comportamiento al inhibir la expresión de *OmpA*, donde se genera una disminución de los puntos de MIC en ciertos antibióticos (meropenem, imipenem

y colistina) (Tsai et al., 2020). Un grupo de investigación en Japón descubrió que los puntos de MIC a tigeciclina incrementan a medida que los aislamientos de *A. baumannii* forman biofilms. Por ejemplo, cuando las células se encontraban separadas el valor de MIC es de 0,5 µg/ml, cuando las células estaban dispersas en biopelículas la MIC fue de 4 µg/ml a diferencia de cuando las células se encontraban embebidas en una biopelícula donde la Concentración Mínima de Erradicación de Biofilm (MBEC, por sus siglas en inglés) fue mayor a 256 µg/ml (Sato et al., 2021).

Adicionalmente, en los aislamientos evaluados se destaca la elevada frecuencia de detección de mecanismos de resistencia a antibióticos considerados de interés epidemiológico general. En la colección evaluada, es frecuente la detección de *A. baumannii* productora de carbapenemasas. En el presente estudio las betalactamasas hidrolizantes de la clase D que se encontraron en la mayoría de los aislamientos correspondieron a OXA-23, OXA-24 y OXA-51 (Tabla 10). Se sabe que las OXA-51 forman parte de manera intrínseca en todos los aislamientos de *A. baumannii* y puede sobreexpresarse por la presencia de secuencias de inserción como los promotores *ISAbal* (Brito et al., 2022; Yazdansetad et al., 2019). Estas secuencias de inserción son de los elementos transposables más sencillos que contribuyen en gran medida en la adquisición de genes de resistencia a antimicrobianos (Gandham et al., 2022). Aparte de los mecanismos de resistencia mencionados, *A. baumannii* puede poseer genes OXA y *mcr-1* que degradan carbapenémicos y polimixinas respectivamente.

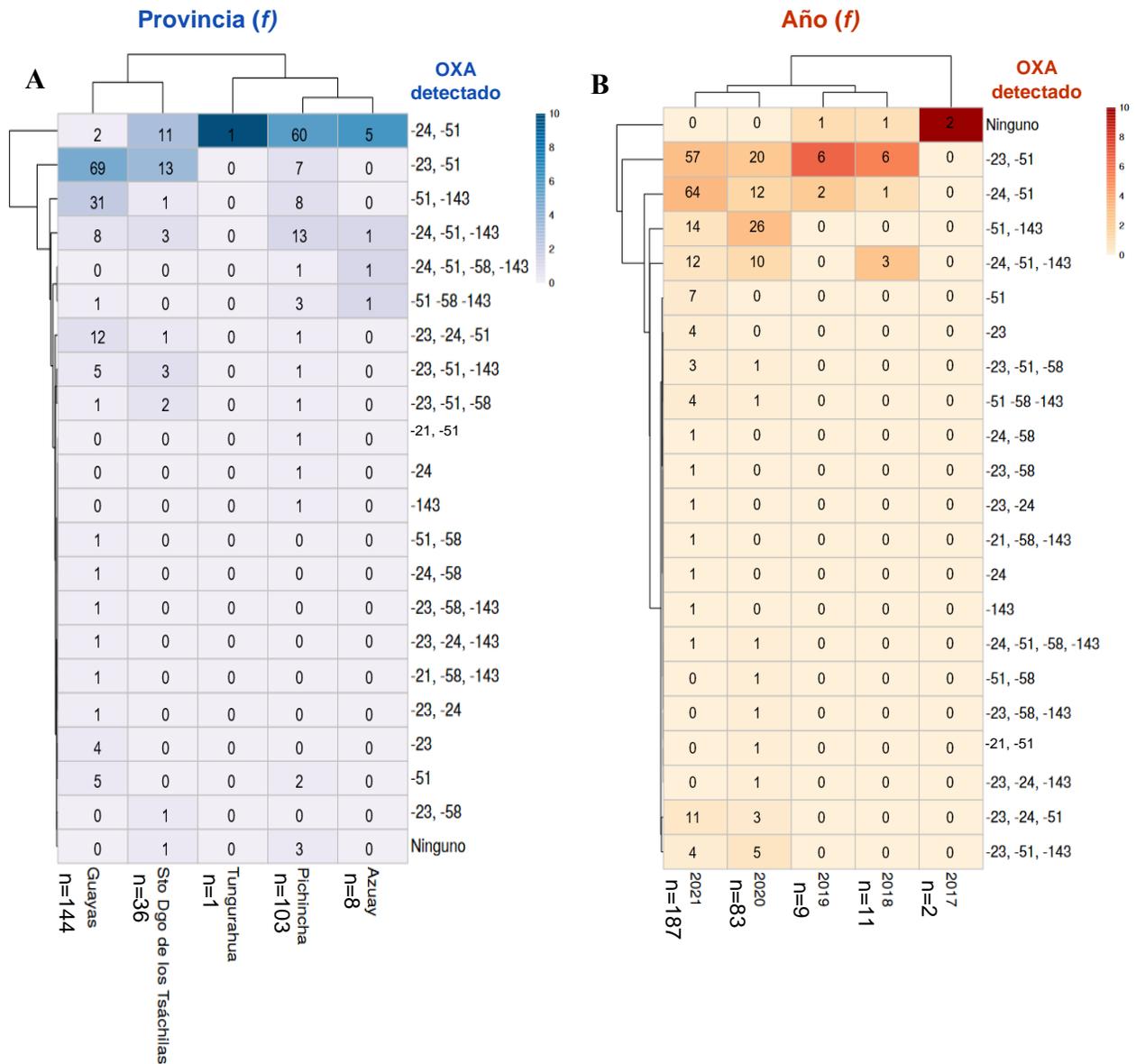
Además de las OXA-51, las OXA-23 se han reportado en más del 30% de aislamientos de *A. baumannii* en India y, en más del 90% de los mismos, se observó que presentaron resistencia a imipenem, doripenem y meropenem (Girija et al., 2019). En Hong Kong se encontró que más del 50% de secuencias de inserción *ISAbal* estaban presentes en regiones aguas arriba de OXA-23 (Leung et al., 2019). A su vez, las OXA-24 se han encontrado en menor frecuencia en Turquía a diferencia de OXA-51 y OXA-23 (Davandeh et al., 2017). Un estudio realizado en Irán identifica la presencia de OXA-51 en la totalidad de los aislamientos analizados mientras que OXA-23 forman parte de casi el 75% de estos (Yazdansetad et al., 2019). Por otra parte, una investigación realizada en aislamientos de *A. baumannii* de los años 2019 al 2022 cuyo país de origen es EE. UU, demostró la presencia de OXA-23 en el

100% de las cepas, mientras que ninguna de estas fue positiva para los genes *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{OXA-48} (Palavecino et al., 2022).

Respecto al gen *mcr-1* que también es codificado en plásmidos, ningún aislamiento de *A. baumannii* fue positivo para este gen. Este es un indicativo de que la resistencia a colistina no está dada por este genotipo. Este gen tiene una prevalencia alta en la producción de animales de corral como cerdos y aves; en comparación a los aislamientos clínicos en humanos donde no es frecuente (Lentz et al., 2021). El gen *mcr-1* se ha identificado en 50 países pertenecientes a 6 continentes demostrando así altas tasas de resistencia a colistina, un antibiótico considerado como última opción de tratamiento en Enterobacterales resistentes a carbapenémicos (Kai & Wang, 2020). De esta forma, se puede mencionar que la tasa de resistencia a colistina ha incrementado en gram negativos de prioridad clínica como *A. baumannii*, aunque estos sean variables en diferentes partes del mundo (Yang et al., 2019).

Figura 12.

Heatmap de la presencia de oxacillinasas (OXA) y sus combinaciones detectadas en aislamientos de A. baumannii con respecto a la provincia y año.



Nota: La figura presenta un mapa de calor (*heatmap*) que agrupó por conglomerados la frecuencia de aislamientos que presentan oxacillinasas y sus diversas combinaciones en una escala de colores que va del 1 (menor agrupación) al 10 (mayor agrupación). Los mapas se diferencian por la provincia origen del aislamiento (**A**) y por el año de aislamiento (**B**). El número de aislamientos para cada categoría se encuentra en cada renglón dentro de las matrices y el total de aislamientos (n) según cada provincia y año está representado debajo de cada leyenda (f).

En los *heatmap* de la **Figura 12** se puede visualizar en la parte superior a las regiones más frecuentes de coexistencia de ciertas oxacillinasas en base a la provincia (**Figura 12A**) y año de aislamiento (**Figura 12B**) en los aislamientos de *A. baumannii* (en el **Anexo 7** se muestran las combinaciones de cada aislamiento). En relación con la provincia de aislamiento, se observa el genotipo OXA-24 y OXA-51 en la provincia de Pichincha (n=60), en menor medida en Sto. Dgo. de los Tsáchilas (n=11) y Guayas con solo 2 aislamientos de este tipo durante los años 2020 (n=20) y 2021 (n=57). Este genotipo no es muy común en Jordania un país de Oriente Medio (Asia del sur) a diferencia de Irán donde aproximadamente el 55,3% de los aislamientos recolectados (n=170) presentaron una coexistencia de OXA-24 y OXA-51 (**Hashemizadeh et al., 2022**).

Asimismo, el genotipo OXA-23 y OXA-51 es recurrente en la provincia de Guayas (n=69) seguido de Sto. Dgo de los Tsáchilas en el período pandemia (2020 con 12 y 2021 con 64 aislamientos). Es frecuente encontrar esta combinación de OXA-23 y OXA-51 en India, un estudio reciente detectó OXA-51 en todos sus aislamientos (n=356) y OXA-23 en el 94% de los mismos (Sharma et al., 2023). En países como Austria (n=147) se ha identificado una variación en la presencia genotipos OXA-23 y OXA-51 en la zona norte, (15,9%), este (83,3%) y sur (15,2%). De manera semejante, se observa diferencia en la coexistencia de OXA-24 y OXA-51 en el norte (4,3%) y el sur (15,2%) en contraste con la región oriental donde no se encontraron aislamientos de ese tipo (**Grisold et al., 2021**).

OXA-143 fue por primera vez detectada en Brasil en el 2004 alcanzando hasta el 70% de aislamientos en la región sur del país (**Rodríguez et al., 2018**). En Ecuador los aislamientos que presentan el fenotipo OXA-51 y OXA-143 se reportan en gran parte en Guayas (n=31) durante el año 2020 (n=26). Los aislamientos de *A. baumannii* de origen brasileño son los principales reservorios del genotipo OXA-143 (**Rodrigues et al., 2021**). En otras partes del mundo como Pakistán (n=113) se encontró OXA-143 en un porcentaje reducido (2,6%) a finales del 2020 (Ejaz et al., 2021). Como se puede evidenciar el genotipo OXA-143 (solo o en combinación con otro gen) es poco frecuente en otras zonas (a excepción de Brasil), no obstante, de manera progresiva ha comenzado a diseminarse por distintas regiones en el mundo.

La coexistencia del genotipo OXA-23, OXA-24 y OXA-51 se encuentra en aislamientos de la provincia del Guayas (n= 12), reportados durante los años 2020 (n=3) y 2021(n=11), tomando en cuenta que el genotipo OXA-23 junto al genotipo OXA-51 son las familias más frecuentes en aislamientos de *A. baumannii*. La presencia de estos aislamientos multiproductores de carbapenemasas se evidencia en Irán donde se obtuvo un 25,8% de muestras con los 3 genotipos de una población total de 112 muestras (**Vahhabi et al., 2021**). Por otro lado, un dato importante obtenido en la presente investigación es la coexistencia de los genotipos OXA-24, OXA-51, OXA-58 y OXA-143, en 2 aislamientos, uno perteneciente a Pichincha y otro al Azuay, en los años 2020 y 2021. Este suceso se repite en la investigación desarrollada en Qom (Irán) en la cual se obtuvo 5 ejemplares con varios genotipos OXA, representando un 5,15% de la población analizada (n=97), remarcando que el OXA 51 es un marcador de la especie y la cantidad de OXA presentes en los aislados están relacionados con el nivel de resistencia a carbapenémicos (**Sarikhani et al., 2017**).

3.4. Contraste de los porcentajes de resistencia a tigeciclina y a otros antibióticos en los períodos prepandemia y pandemia.

A diferencia de la tigeciclina, los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos descritos en la **Tabla 11** fueron determinados por el CN-RAM. En el caso de haber detectado ausencia de información para los aislamientos y sus perfiles de resistencia, se realizaron ensayos de Kirby y Bauer basados en microdilución en caldo y difusión en disco en la presente investigación. Por lo tanto, se presentan como una información adicional que permitió un análisis más completo sobre la resistencia antimicrobiana de *A. baumannii* a lo largo de los años 2017-2019 (prepandemia) al 2020-2021 (pandemia).

Tabla 11.

Antibióticos utilizados para evaluar los perfiles de susceptibilidad en A. baumannii.

Método	Familia	Antibiótico (Abrev.)
	Penicilinas	Ampicilina 10µg/Sulbactam 10µg (SAM20)

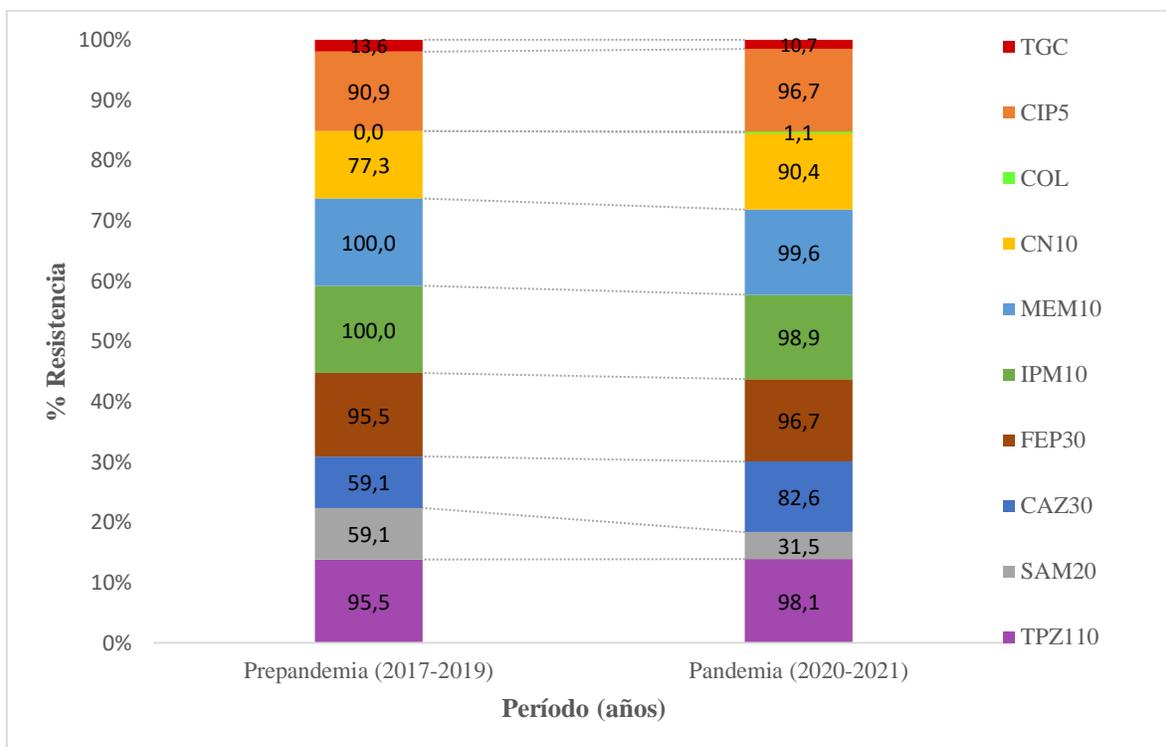
Método	Familia	Antibiótico (Abrev.)
Difusión en disco		Piperacilina 100µg/Tazobactam 10µg (TPZ110)
	Cefalosporinas	Ceftazidima 30µg (CAZ30)
		Cefepima 30µg (FEP30)
	Carbapenémicos	Imipenem 10µg (IMP10)
		Meropenem 10µg (MEM10)
	Aminoglucósidos	Gentamicina 10µg (CN10)
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina 5µg (CIP5)	
Microdilución en caldo	Polimixinas	Colistina (COL)
	Tetraciclinas	Tigeciclina (TGC)

Nota: La susceptibilidad a los antibióticos de las familias de las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas expuestos en esta table, se determina mediante la técnica de difusión en disco, por lo tanto, la cantidad (µg) del antibiótico en cada disco se colocan a lado de cada antibiótico, así como en su abreviatura. Por otro lado, el método establecido por excelencia para determinar la resistencia a colistina es la microdilución en caldo para la cual se probaron 4 concentraciones (4-0.5 µg/ml) y los puntos de corte recomendados por el CLSI son $R \geq 4\mu\text{g/ml}$ e $I \leq 2\mu\text{g/ml}$.

Además de la tasa de resistencia a tigeciclina donde se observa una reducción de aproximadamente el 3%, en la **Figura 13** se muestran los porcentajes de resistencia a otros antibióticos (descritos en la **Tabla 11**) de la colección evaluada de aislamientos de *A. baumannii* entre los períodos prepandemia y pandemia.

Figura 13.

Porcentajes de resistencia de A. baumannii a otros antibióticos en los período prepandemia y pandemia.



Nota: En esta figura se presenta una comparación de los porcentajes de aislamientos resistentes a TGC y otras familias de antibióticos (las abreviaturas se describen en la **Tabla 11**) entre los periodos prepandemia y pandemia. El número de cepas aisladas en el período prepandemia es de 22 a diferencia del período pandemia que cuenta con 270 cepas. Las tasas de resistencia a antibióticos de la misma familia se colocaron de manera independiente porque pueden diferir como en el caso de las penicilinas (TPZ110 y SAM20) y cefalosporinas (CAZ30 y FEP3).

El porcentaje de resistencia a antibióticos de la familia de las penicilinas aumentó en TPZ110 y disminuyó en SAM20. Una investigación realizada en Perú en cepas de *A. baumannii* aisladas desde el 2014 al 2016 considerados como años antes de la pandemia ocasionada por COVID-19 muestra que aislados de *A. baumannii* son resistentes en su totalidad a TPZ110 mientras que la resistencia a SAM20 fue de 63,8% (Levy et al., 2018). Es notable que la resistencia a estos antibióticos mantuvo la misma tendencia en el presente estudio. Por el contrario, la resistencia a las cefalosporinas incrementó significativamente como en CAZ30 y en menor medida en FEP30 considerando que el porcentaje de resistencia al mismo fue

aproximadamente del 100%. A su vez, en Uruguay un grupo de investigación demostró que todos los aislamientos de *A. baumannii* recolectados desde el año 2010 al 2011(n=29) ya presentaban resistencia a FEP30 y CAZ30 en su totalidad (**Bado et al., 2018**).

Respeto a los carbapenémicos en ambos casos los porcentajes se mantuvieron casi al 100% para MEM10 e IMP10. Del mismo modo, los dos estudios mencionados anteriormente señalan que todas las cepas de *A. baumannii* analizadas en Perú y Uruguay muestran en su totalidad una resistencia de casi el 100% (**Bado et al., 2018; Levy et al., 2018**). CN10 que forma parte de los aminoglucósidos demostró ser menos susceptible en el período pandemia debido a que la resistencia incrementó del 77,3 al 90,4%. El Programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY en su estudio realizado con aislamientos de *A. baumannii* desde el año 1997 al 2016 identificó que la resistencia a CN10 ha aumentado en la región de Asia-Pacífico mientras que las tasas de susceptibilidad se mantuvieron alrededor del 30% en países de Europa y Latinoamérica, al contrario de Norteamérica donde la susceptibilidad a CN10 era cercana al 50% (**Gales et al., 2019**).

Un caso preocupante es la colistina porque no se observan cepas resistentes en el período prepandemia y las muestras reportadas como resistentes se presentan en el período pandemia correspondiendo al 1,1%. El mismo Programa de Vigilancia Antimicrobiana determinó que la susceptibilidad a colistina en Asia-Pacífico, Latinoamérica, Europa y Norteamérica estaba entre el 93 al 97% hasta el año 2016 (**Gales et al., 2019**). A pesar de que varios países de América como Ecuador y Canadá han implementado políticas que prohíben el uso de polimixinas como promotores de crecimiento, se ha informado del uso indebido de los mismos lo cual puede ocasionar la diseminación de genes de resistencia a colistina (Rodríguez-Santiago et al., 2021). De acuerdo al análisis del gen de resistencia móvil a colistina en estos aislamientos positivos, este fenotipo no está asociado a la presencia del gen *mcr-1*, tal como lo reportado en otros países (**Kabic et al., 2023**).

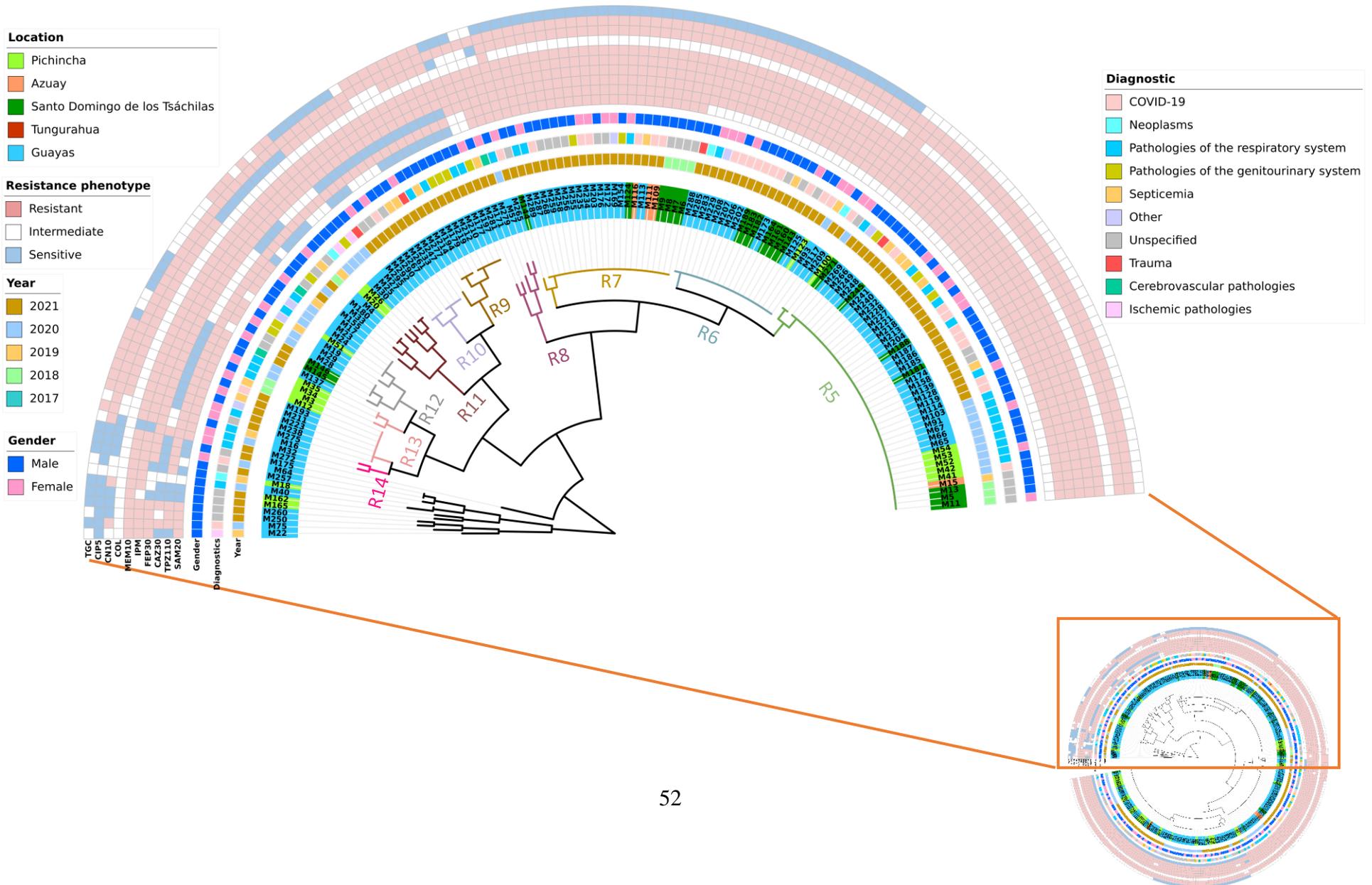
A diferencia de las cefalosporinas y aminoglucósidos, las fluoroquinolonas como ciprofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina son considerados como agentes de alta prioridad para combatir las infecciones ocasionadas por patógenos gram positivos y gram negativos como *A. baumannii* (**Aminov et al., 2021**). Dentro de las 3 fluoroquinolonas

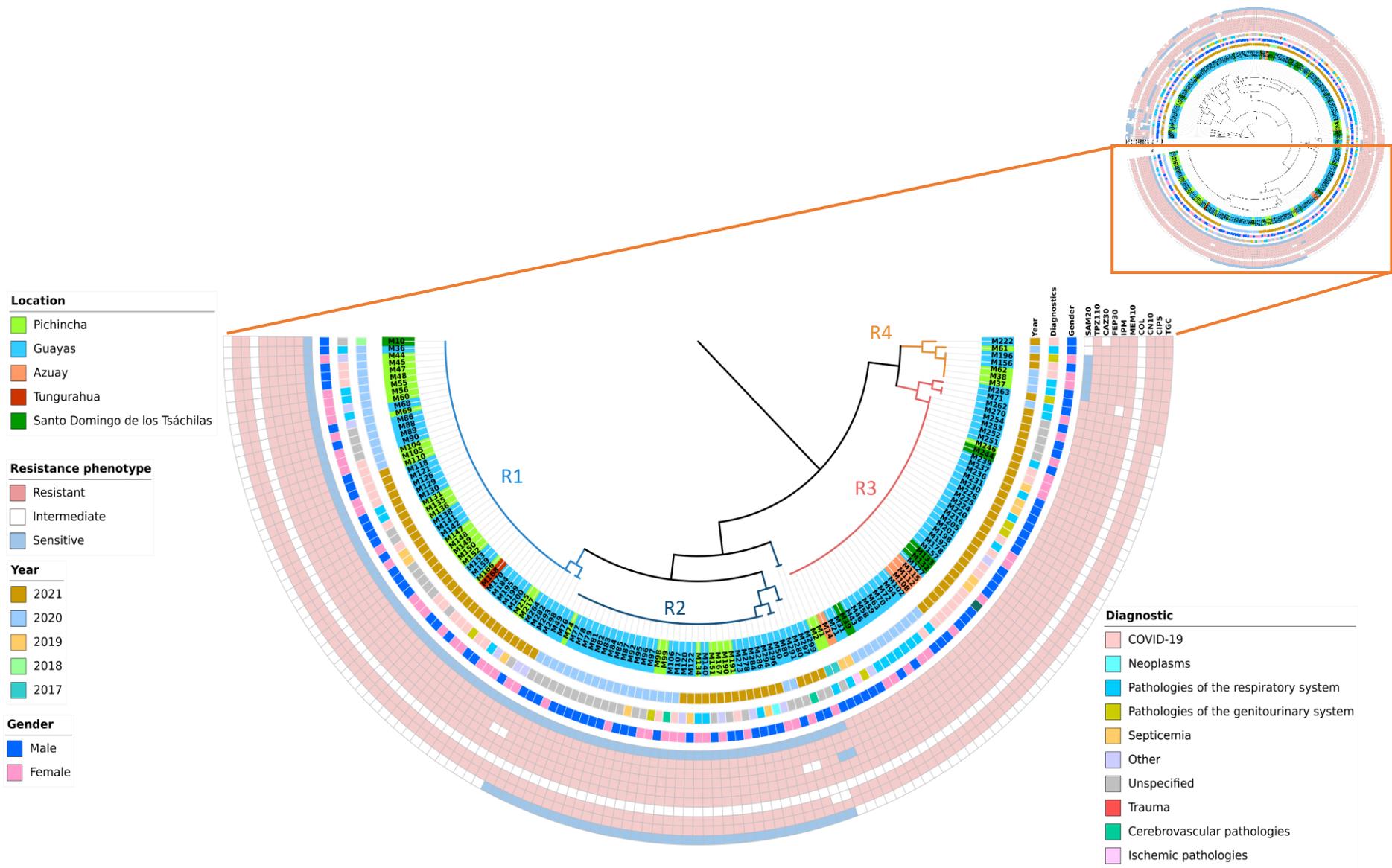
mencionadas, la ciprofloxacina está considerada dentro del Listado modelo de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud (**World Health Organization, 2021b**).

La resistencia a ciprofloxacina en *A. baumannii* se ha registrado en más del 80% de aislamientos MDR a amikacina, ampicilina/sulbactam, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, cefepime y levofloxacina de la región de Asia-Pacífico recolectados desde el 2012 al 2019. A nivel regional en países como Chile se detectó resistencia a ciprofloxacina y carbapenémicos en todos los aislamientos estudiados (n=164) desde el año 2010 al 2013 (**Brito et al., 2022**). En este estudio, se observó que la resistencia a ciprofloxacina mostró un incremento en aproximadamente el 5%. Como se pudo observar, los aislamientos de *A. baumannii* ya presentaban altos niveles de resistencia incluso en años previos a la pandemia ocasionada por COVID-19.

Figura 14.

Dendrograma del perfil fenotípico y otras variables epidemiológicas de las cepas de A. baumannii del período 2017-2021 analizadas.





Nota: (A) Primera sección del dendrograma. (B) Segunda sección del dendrograma. Por medio de un análisis de conglomerados, los aislamientos analizados (n=292) se agruparon en función de su perfil fenotípico de susceptibilidad a TGC y los antibióticos descritos en la **Tabla 11**. Se distinguen 14 subdivisiones o ramas (R) y se muestran las variables epidemiológicas como género, localización, año y diagnóstico para cada aislamiento (M).

Por medio de un dendograma que se muestra en la **Figura 14** se relacionaron los perfiles de resistencia fenotípica versus las variables epidemiológicas (ubicación, año de aislamiento, género, diagnóstico). Como se puede observar, la gráfica se dividió en dos secciones (**Figura 14A y Figura 14B**) y las ramas o subdivisiones se identificaron con R por cada población que refleja un patrón similar de características entre los perfiles fenotípicos, tomando en consideración principal la TGC como subdivisión. Se describieron 14 subdivisiones con patrones similares (cada una resaltada por colores) y una inespecífica (divisiones de color negro) por la variabilidad en sus datos.

A. baumannii representa una amenaza latente para los sistemas de salud pública ecuatorianos, considerando los elevados niveles de resistencia antimicrobiana detectados en los aislamientos circulantes en las UCI analizadas. Como se puede evidenciar en el dendograma, los antibióticos que presentan sensibilidad y sensibilidad intermedia son escasos para la población analizada, disminuyendo drásticamente las opciones terapéuticas disponibles. COL, SAM20 y CAZ30 son los únicos antibióticos disponibles para tratamiento, a excepción de la subdivisión R3 que presenta dos muestras sin susceptibilidad a ningún antibiótico (M71 y M262) de la provincia del Guayas, recolectadas en los años 2020 y 2021 respectivamente y con un diagnóstico similar clasificado como patologías del sistema respiratorio. Un estudio desarrollado durante el 2020 en Brasil exhibe un panorama similar con opciones escasas de tratamiento con SAM 20 con un porcentaje bajo de muestras resistentes (59%) (**de Freitas et al., 2020**).

Las subdivisiones con un índice mayor de muestras resistentes a TGC son el R4, R9, R11, R13 y R14. Las provincias de las cuales se originan la mayoría de las muestras resistentes provienen de ciudades con alta densidad poblacional como Guayas y Pichincha que reflejan un 12,3 % y 12,96% de muestras resistentes a TGC como se puede observar en el **Anexo 8**. Adicional a esto, cabe hacer énfasis en el porcentaje de resistencia a COL en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas (3,7%). Las patologías más comunes en las cuales se ha evidenciado la resistencia a TGC son neoplasias, patologías isquémicas, patologías del sistema genitourinario y patologías del sistema respiratorio. En países de Europa (Alemania) y Asia Pacífico (Vietnam) se obtuvo tasas similares de resistencia en aislamientos de *A.*

baumannii desde 2005 hasta 2018 proveniente de muestras de humanos (UCI), animales y leche en polvo; 12% resultó resistente a TGC y 3% resistente a COL (**Wareth et al., 2020**).

En la segunda sección (**Figura 14B**) la subdivisión R1 (n=50) es la más grande en tamaño y presenta susceptibilidad intermedia a antibióticos como TGC y COL. Por otro lado, los aislamientos son sensibles a SAM20, mismos que en su mayoría fueron recolectados durante el año 2021 y la patología con mayor frecuencia fue COVID-19. La rama R2 (n= 39) presenta homología con los datos de R1, sin embargo, difieren las muestras sensibles a TGC recolectadas durante los años 2020 y 2021. En la subdivisión R3 (n= 47) está el grupo más peligroso debido a que poseen resistencia a todos los antibióticos excepto TGC y COL donde se registra una sensibilidad intermedia (a excepción de M71 y M262 ya antes mencionadas) lo cual dificulta las opciones de tratamiento. En su mayoría estos aislamientos fueron recolectados en el año 2021. Por otra parte, el grupo R4 (n= 7) se caracteriza por la totalidad de resistencia a TGC y como única opción viable de tratamiento a SAM20 y COL.

La primera sección (**Figura 14A**) inicia con la subdivisión R5 (n= 42) caracterizada por la similitud en los perfiles fenotípicos sensibles intermedios a TGC, COL y SAM20, a excepción de las muestras M100 y M209 que son muestras resistentes a colistina, recolectadas de individuos del género femenino y de las provincias del Guayas y Pichincha. Estos datos son similares a los de los grupos R1 y R2. A su vez, el grupo R6 (n= 20) presenta muestras sensibles a TGC, recolectadas en el año 2021 y con mayor frecuencia de patología a COVID-19. Un análisis sistemático de estudios en pacientes con COVID-19 ambulatorios y hospitalizados realizado en el período 2019-2021, identificó una prevalencia de *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (95%), COL (37,7%) y MDR (96,5%) (**Langford et al., 2023**).

Por otro lado, R7 (n= 24) exhibe una resistencia total a SAM20 y agrupa a un aislamiento resistente a COL (M144). Las divisiones variables que difieren en más de un antibiótico se encuentran en el grupo R8 (n= 5), R10 (n= 7), R11 (n= 9) y R12 (n= 10). El grupo R9 (n= 9) posee muestras resistentes a TGC y sensibles a CAZ30 y SAM20. El grupo R13 (n= 10) tiene características similares al grupo anterior, sin embargo, es resistente a SAM20. Los aislamientos del grupo R14 (n= 2) mostraron perfiles de susceptibilidad semejantes.

Finalmente, se encuentra la subdivisión variable con muestras no agrupadas debido a la variabilidad de sus perfiles de resistencia. Es importante mencionar que en este grupo prevalece la resistencia a MEM10, se distingue la característica intermedio-sensible a COL y se identifica una muestra individual resistente a TGC.

Figura 15.

Clasificación de las subdivisiones según categorías de antimicrobianos para fenotipos resistentes.

Subdivisiones	Categorías de Antimicrobianos							Fenotipo Resistente
	A	B	C	D	E	F	G	
R1								XDR
R2								XDR
R3								XDR
R4								XDR
R5								XDR
R6								XDR
R7								XDR
R8								MDR
R9								XDR
R10								XDR
R11								XDR
R12								XDR
R13								XDR
R14								XDR
Separados								MDR

Nota: **A:** Penicilinas; **B:** Carbapenémicos; **C:** Cefalosporinas; **D:** Aminoglucósidos; **E:** Fluoroquinolonas; **F:** Polimixinas; **G:** Tetraciclinas. **Criterios de interpretación:** los aislados de la subdivisión presentan susceptibilidad a todos los antimicrobianos que componen esa categoría. los aislados de la subdivisión presentan resistencia a algunos de los antimicrobiano de la categoría. los aislados de la subdivisión presentan resistencia a todos los miembros de la categoría.

Las subdivisiones que representan cepas con similitud en los perfiles fenotípicos determinados en la presente investigación corresponden a cepas XDR como se puede observar en la **Figura 15**. Esta característica se le atribuye por tener 1 agente resistente en todas las categorías y 1 o 2 categorías susceptibles. Las cepas MDR y XDR son comunes en países de Asia, Europa y América (**Loyola-Cruz et al., 2022; Mirzaei et al., 2020; Santoro et al., 2020**). Aunque cabe mencionar que el número de aislamientos se clasifican en las categorías de MDR y XDR en base al número de familias de los antibióticos que se analicen en cada estudio.

Tabla 12.

Análisis estadístico de variables epidemiológicas con muestras resistentes durante el período 2017-2021

Antibióticos	Género		Períodos		Provincia					Diagnóstico									
	Masculino	Femenino	Pandemia	Prepandemia	Azuay	Guayas	Pichincha	Sto. Dgo. de los Tsáchilas	Tungurahua	Traumatismos	Patologías isquémicas	Neoplasias	Patologías cerebrovasculares	Otros	Patologías del sistema genitourinario	Septicemia	Patologías del sistema respiratorio	COVID-19	Sin especificar
CAZ30	150/191	85/100	13/22	223/270	8/8	158/202	44/54	25/27	1/1	2/4	1/4	3/5	3/5	15/18	13/20	20/26	50/63	64/68	65/79
CIP5	181/191	99/100	20/22	261/270	8/8	194/202	51/54	27/27	1/1	4/4	3/4	4/5	5/5	18/18	20/20	26/26	62/63	66/68	73/79
SAM20	65/191	32/100	13/22	85/270	7/8	72/202	8/54	11/27	0/1	0/4	2/4	0/5	3/5	5/18	8/20	8/26	29/63	22/68	21/79
CN10	168/191	92/100	17/22	244/270	8/8	175/202	50/54	27/27	1/1	4/4	1/4	3/5	3/5	18/18	17/20	23/26	56/63	66/68	70/79
MEM10	191/191	99/100	22/22	269/270	8/8	201/202	54/54	27/27	1/1	4/4	4/4	5/5	5/5	18/18	20/20	26/26	62/63	68/68	79/79
IPM10	189/191	99/100	22/22	267/270	8/8	200/202	53/54	27/27	1/1	4/4	4/4	5/5	5/5	18/18	19/20	26/26	62/63	68/68	78/79
TPZ110	186/191	99/100	21/22	265/270	8/8	198/202	52/54	27/27	1/1	4/4	3/4	5/5	5/5	18/18	19/20	25/26	62/63	68/68	77/79
FEP30	184/191	97/100	21/22	261/270	8/8	195/202	51/54	27/27	1/1	4/4	4/4	4/5	5/5	17/18	20/20	26/26	62/63	68/68	72/79
TGC	22/191	10/100	3/22	29/270	0/8	25/202	7/54	0/27	0/1	0/4	1/4	1/5	0/5	1/18	7/20	4/26	12/63	4/68	2/79
COL	1/191	2/100	0/22	3/270	0/8	1/202	1/54	1/27	0/1	0/4	0/4	0/5	0/5	0/18	0/20	0/26	0/63	1/68	2/79
p value	>0.9999		0.642		0.981					0.9997									

Por medio de un análisis estadístico chi cuadrado se comparó las variables epidemiológicas como se puede apreciar en la **Tabla 12** con los datos de muestras resistentes a lo largo del período 2017-2021 a partir de una población total de 292 aislamientos. No se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa con relación a la provincia de origen, a pesar de que las más pobladas como Guayas y Pichincha son las de mayor incidencia en resistencia a tigeciclina y con pocas alternativas para tratamiento. Además, no existió variación de los datos presentes en el género ($p = >0.999$), período de análisis ($p = 0.642$) y diagnóstico ($p = 0.999$), cabe resaltar que la enfermedad de COVID-19 es la de mayor frecuencia en muestras resistentes.

La resistencia a antibióticos de último recurso como tigeciclina, implica un gran reto a futuro para los sistemas de salud. Por lo tanto, el propósito de esta investigación fue el monitorear la situación de la resistencia a este tipo de antibióticos en una colección de *A. baumannii* determinada. La población total fue de 292 aislamientos pertenecientes al periodo 2017-2021 de muestras de tipo respiratorio de pacientes de UCI. Estos se clasificaron en base a las variables epidemiológicas (ubicación, año, género y diagnóstico). Se evaluó el perfil fenotípico de susceptibilidad a TGC por microdilución en caldo. Los resultados muestran que existió una disminución en la tasa de resistencia de alrededor del 3%, sin embargo, hay que considerar que el número de aislamientos resistentes a TGC en el período pandemia (29/270) fue mayor en comparación al período prepandemia (3/22).

Además, los resultados obtenidos sobre el perfil genotípico indica que no existe la presencia de genes *tet(X)* y sus homólogos *tet(X3)* y *tet(X4)*, por el contrario, se identificó la coexistencia de dobles y triples carbapenemasas tipo OXA siendo las variantes predominantes la OXA 23 y OXA51. El perfil fenotípico de susceptibilidad a TGC y otros antibióticos señala que las provincias con mayor densidad poblacional como Guayas y Pichincha son los que albergan mayor cantidad de aislamientos resistentes a TGC. Por otro lado, se reportó un aumento en las tasas de resistencia a CIP5, CAZ30, CN10, FEP30 y TPZ110. Los resultados indican un panorama favorable, sin embargo, es importante realizar proyectos de vigilancia para identificar posibles reservorios e implementar medidas de control para evitar la diseminación de mecanismos de resistencia móviles como *tet(X)* y sus variantes.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1.CONCLUSIONES

- Se evaluó el perfil de resistencia a tigeciclina mediante la técnica de microdilución en caldo donde se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) en los aislamientos de *A. baumannii* de la colección del CN-RAM de los períodos 2017-2021 pertenecientes a muestras de tipo respiratorio (br, ei, es, tq, tr) de pacientes de UCI. La resistencia a tigeciclina total en la colección de microorganismos analizada (32/292) fue de 10,9%. Las tasas de resistencia a TGC en el periodo prepandemia y pandemia fueron de 10,9% (2/22) y 13,6% (29/270) respectivamente. Estos se encuentran principalmente en las subdivisiones o ramas R4, R9, R11, R13 y R14 cuyas provincias de origen son Guayas y Pichincha; y se catalogaron como extensivo-drogoresistentes (XDR). Sin embargo, debido a la continua tendencia en la evolución de los mecanismos de resistencia a antimicrobianos móviles codificados en plásmidos como los genes *tet(X)* y sus variantes, es necesario realizar futuras investigaciones.
- No se identificó la presencia de genes *tet(X)* codificados en plásmidos que confieren resistencia a tigeciclina en los aislamientos de *A. baumannii* de la colección de microorganismos analizada, a pesar de que se encontraron aislamientos resistentes y susceptibles intermedios a TGC. Se infiere que la resistencia a este antibiótico podría estar dada por la sobreexpresión de bombas de flujo del tipo AdeABC y la modificación de la permeabilidad de membrana mediante las porinas de difusión general. No obstante, se identificó una mayor presencia dobles y triples oxacillinasas (OXA) o carbapenemasas hidrolizantes de clase D en gran parte de los aislamientos pertenecientes a las provincias de Guayas, Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas en los años 2020 y 2021.
- Se contrastaron los porcentajes de resistencia a tigeciclina y otros antibióticos donde se observa que existe una disminución en la tasa de resistencia a tigeciclina de aproximadamente el 3% en el período prepandemia (2017-2019) al período pandemia

(2020-2021). Se identificó un incremento en la tasa de resistencia a antibióticos como COL, CN10 y CAZ30 a diferencia de SAM20 donde existió una disminución en la tasa de resistencia. Es probable que no se haya presenciado una gran variación en las tasas de resistencia a tigeciclina como a otros antibióticos (CIP5, MEM10, IMP10, FEP30 y TPZ110) debido a que el número de aislamientos es el período prepandemia (n=22) fue menor al período pandemia (n=270).

- Se caracterizó el mecanismo de resistencia a tigeciclina mediado por plásmidos portadores de genes *tet(X)* en la colección de microorganismos del CN-RAM analizada. Afortunadamente, ninguno de los aislamientos analizados presentó genes *tet(X)* ni sus homólogos *tet(X3)* y *tet(X4)*. Además, las tasas de resistencia a tigeciclina no presentaron una gran variación a pesar de la pandemia ocasionada por COVID-19, lo cual representa un favorable panorama para los sistemas de salud ecuatorianos. Sin embargo, la diseminación de este mecanismo de resistencia móvil alrededor del mundo vulnera la efectividad de antibióticos de última línea como la tigeciclina. Esto destaca la importancia de realizar futuras investigaciones en colecciones de *A. baumannii* de años recientes para detectar y combatir esta resistencia emergente.

4.2.RECOMENDACIONES

- Realizar estudios posteriores con otros criterios de selección de población que permitan detectar la presencia de genes de resistencia a tigeciclina como los *tet(X)* en las colecciones de microorganismos del CN-RAM de años recientes.
- Al no contar con puntos de corte para tigeciclina oficiales determinados por entidades como CLSI o EUCAST, se utilizaron los propuestos por el *Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes con resistencia extendida o panresistentes* para Enterobacteriales. Se espera que estas entidades puedan definir puntos de corte que sirvan como guía en investigaciones futuras.
- Estandarizar el método de microdilución en caldo antes de realizar los ensayos para conocer la estabilidad del antibiótico en placa.
- En el caso de no contar con un control positivo para detectar genes *tet(X)*, se recomienda diseñar un fragmento de ADN sintético que contenga todas las variantes de *tet(X)* de interés.
- No existe un algoritmo o criterios determinados para el análisis de conglomerados o *heatmap* a utilizar. La elección del método es particular para cada conjunto de datos debe ser aquel que mejor refleje los resultados.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Abadi, A. T. B., Rizvanov, A. A., Haertlé, T., & Blatt, N. L. (2019). World Health Organization report: Current crisis of antibiotic resistance. *BioNanoScience*, 9(4), 778–788. <https://doi.org/10.1007/S12668-019-00658-4/TABLES/1>
- Abbas, J. E., Salimizand, H., Hassanzadeh, S., & Ramazanzadeh, R. (2020). AdeG efflux pump as the main tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Gene Reports*, 20. <https://doi.org/10.1016/J.GENREP.2020.100689>
- Abdi, S. N., Ghotaslou, R., Ganbarov, K., Mobed, A., Tanomand, A., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., & Kafil, H. S. (2020). *Acinetobacter baumannii* efflux pumps and antibiotic resistance. *Infection and Drug Resistance*, 13, 423–434. <https://doi.org/10.2147/IDR.S228089>
- Albán Maraño, V. A. (2017). *Identificación de la bomba de eflujo tipo AdeABC como mecanismo de resistencia a la tigeciclina en aislados clínicos de Acinetobacter baumannii. Analizados en el INSPI-QUITO durante el período 2015-2016*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Alkofide, H., Alhammad, A. M., Alruwaili, A., Aldemerdash, A., Almangour, T. A., Alsuwayegh, A., Almoqbel, D., Albaty, A., Alsaud, A., & Enani, M. (2020). Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Enterobacteriaceae*: Prevalence, treatments, and outcomes – A retrospective cohort study. *Infection and Drug Resistance*, Volume 13, 4653–4662. <https://doi.org/10.2147/IDR.S283488>
- Almasaudi, S. B. (2018). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(3), 586–596. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2016.02.009>
- American Type Culture Collection. (2022). *Bacteriology Culture Guide* .
- Aminov, R. (2021). Acquisition and spread of antimicrobial resistance: A *tet(X)* case study. *International Journal of Molecular Sciences*, 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22083905>

- Aminov, R., Andrew, B., Basu, S., Chatterjee, S., Roy, S., Bhattacharjee, A., Chattopadhyay, P., Saha, B., & Dutta, S. (2021). Overexpression of efflux pumps, mutations in the pumps' regulators, chromosomal mutations, and AAC(6)-Ib-cr are associated with fluoroquinolone resistance in diverse sequence types of neonatal septicaemic *Acinetobacter baumannii*: A 7-year single center study. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.602724>
- Anyanwu, M. U., Nwobi, O. C., Okpala, C. O. R., & Ezeonu, I. M. (2022). Mobile Tigecycline Resistance: An Emerging Health Catastrophe Requiring Urgent One Health Global Intervention. *Frontiers in Microbiology*, *13*(August). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.808744>
- Armstrong, R., Kane, A., & Cook, T. (2020). Outcomes from intensive care in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Anaesthesia*, *75*(10), 1340–1349. <https://doi.org/10.1111/ANAE.15201>
- Asif, M., Alvi, I. A., & Ur Rehman, S. (2018). Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infection and Drug Resistance*, *11*, 1249–1260. <https://doi.org/10.2147/IDR.S166750>
- Ayoub Moubareck, C., & Hammoudi Halat, D. (2020). Insights into *Acinetobacter baumannii*: A review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics*, *9*(3), 119. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030119>
- Bado, I., Papa, R., Delgado, J. F., Gaudio, M., Gutiérrez, C., Cordeiro, N. F., García, V., Araújo Pirez, L., Seija, V., Medina, J. C., Rieppi, G., Gonzalez, B., & Vignoli, R. (2018). Molecular Characterization of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in the Intensive Care Unit of Uruguay's University Hospital Identifies the First *rmtC* Gene in the Species. *Microbial Drug Resistance*, *24*(7), 1012–1019. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0300>
- Bello-López, E., Rocha-Gracia, R. del C., Castro-Jaimes, S., Cevallos, M. Á., Vargas-Cruz, M., Verdugo-Yocupicio, R., Sáenz, Y., Torres, C., Gutiérrez-Cázar, Z., Arenas-

- Hernández, M. M. de la P., & Lozano-Zarain, P. (2020). Antibiotic resistance mechanisms in *Acinetobacter* spp. strains isolated from patients in a paediatric hospital in Mexico. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 23, 120–129. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2020.08.014>
- Benett, J., Dolin, R., & Blaser, M. (2020). *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases* (Ninth). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2012-1-00075-6>
- Benkova, M., Soukup, O., & Marek, J. (2020). Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *Journal of Applied Microbiology*, 129(4), 806–822. <https://doi.org/10.1111/jam.14704>
- Bhamidimarri, S. P., Zahn, M., Prajapati, J. D., Schleberger, C., Söderholm, S., Hoover, J., West, J., Kleinekathöfer, U., Bumann, D., Winterhalter, M., & van den Berg, B. (2019). A multidisciplinary approach toward identification of antibiotic scaffolds for *Acinetobacter baumannii*. *Structure*, 27(2), 268-280.e6. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.10.021>
- Biswas, I., & Rather, P. (2019). *Acinetobacter baumannii* (I. Biswas & P. N. Rather, Eds.; Vol. 1946). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9118-1>
- Boonsaeng, T., Carpio, C. E., Guerrero, P., Sarasty, O., Borja, I., Hudson, D., Macharia, A., & Shibia, M. (2023). Perceived risks of infection, hospitalization, and death from COVID-19 at the equator: Ecuador and Kenya. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, 17, e34. <https://doi.org/10.1017/dmp.2021.268>
- Brito, B. P., Koong, J., Wozniak, A., Opazo-Capurro, A., To, J., Garcia, P., & Hamidian, M. (2022). Genomic analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains recovered from Chilean hospitals reveals lineages specific to South America and multiple routes for acquisition of antibiotic resistance genes. *Microbiology Spectrum*, 10(5). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02463-22>
- Center for Disease Control and Prevention. (2022). *COVID-19: U.S. Impact on antimicrobial resistance, special report 2022*. <https://doi.org/10.15620/CDC:117915>

- Centers for Disease Control, U. (2019). *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019*. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
- Chapartegui-González, I., Lázaro-Díez, M., Redondo-Salvo, S., Navas, J., & Ramos-Vivas, J. (2021). Antimicrobial resistance determinants in genomes and plasmids from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antibiotics*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10070753/S1>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *M07 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically* (Número January).
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2022). *M07 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* (Número January).
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. (2011). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS ONE*, *6*(3), e17549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017549>
- Costello, S. E., Gales, A. C., Morfin-Otero, R., Jones, R. N., & Castanheira, M. (2016). Mechanisms of resistance, clonal expansion, and increasing prevalence of *Acinetobacter baumannii* strains displaying elevated tigecycline MIC values in Latin America. *Microbial Drug Resistance*, *22*(4), 253–258. <https://doi.org/10.1089/MDR.2015.0168>
- Cui, C.-Y., He, Q., Jia, Q.-L., Li, C., Chen, C., Wu, X.-T., Zhang, X.-J., Lin, Z.-Y., Zheng, Z.-J., Liao, X.-P., Kreiswirth, B. N., Liu, Y.-H., Chen, L., & Sun, J. (2021). Evolutionary trajectory of the Tet(X) family: critical residue changes towards high-level tigecycline resistance. *mSystems*, *6*(3). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00050-21>
- Cui, Z.-H., Zheng, Z.-J., Tang, T., Zhong, Z.-X., Cui, C.-Y., Lian, X.-L., Fang, L.-X., He, Q., Wang, X.-R., Chen, C., He, B., Wang, M.-G., Liu, Y.-H., Liao, X.-P., & Sun, J. (2020). Rapid detection of high-level tigecycline resistance in Tet(X)-producing *Escherichia coli* and *Acinetobacter spp.* based on MALDI-TOF MS. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 510. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.583341>

- Davandeh, I., Eraç, B., & Aydemir, S. Ş. (2017). Investigation of class-D beta-lactamases causing carbapenem resistance in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates*. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 47(5), 1661–1666. <https://doi.org/10.3906/sag-1607-91>
- de Freitas, S. B., Amaral, S. C., Ferreira, M. R. A., Roloff, B. C., Moreira, C., Conceição, F. R., & Hartwig, D. D. (2020). Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with nosocomial infection in the Pelotas, RS, Brazil. *Current Microbiology*, 77(10), 2724–2734. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02060-w>
- De Vos, P., Garrity, G., Krieg, N., Rainey, F., Schleifer, K., & Whitman, W. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer.
- Dierikx, C., van Duijkeren, E., Schoormans, A., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Kant, A., Huijsdens, X. W., van der Zwaluw, K., Wagenaar, J. A., & Mevius, D. J. (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(6), 1368–1374. <https://doi.org/10.1093/jac/dks049>
- Dimopoulos, G., Kollef, M., Abolhassani, H., Akova, M., Esme, M., Topeli, A., & Yavuz, B. B. (2019). Infections in the Elderly Critically-Ill Patients. *Frontiers in Medicine / www.frontiersin.org*, 1, 118. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00118>
- Ejaz, H., Ahmad, M., Younas, S., Junaid, K., Abosalif, K. O. A., Abdalla, A. E., Alameen, A. A. M., Elamir, M. Y. M., Bukhari, S. N. A., Ahmad, N., & Qamar, M. U. (2021). Molecular epidemiology of extensively-drug resistant *Acinetobacter baumannii* sequence type 2 co-harboring *bla*NDM and *bla*OXA from clinical origin. *Infection and Drug Resistance, Volume 14*, 1931–1939. <https://doi.org/10.2147/IDR.S310478>
- Esme, M., Topeli, A., Yavuz, B., & Akova, M. (2019). Infections in the elderly critically-III patients. *Frontiers in Medicine*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00118>
- 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>

- Farajzadeh, A., Mirzaee, M., Nanekarani, S., & Yari, R. (2021). Application of multiplex PCR for the identification of oxacillinase genes and determination of antibiotic resistance pattern in environmental isolates of *Acinetobacter baumannii* in ICU. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 8(3), 89–93. <https://doi.org/10.34172/ajcmi.2021.16>
- Food and Drug Administration. (2011, enero 25). *Drug Approval Package*. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2005/21-821_Tygacil.cfm
- Foong, W. E., Wilhelm, J., Tam, H.-K., & Pos, K. M. (2020). Tigecycline efflux in *Acinetobacter baumannii* is mediated by *tetA* in synergy with RND-type efflux transporters. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(5), 1135–1139. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa015>
- Gajic, I., Kabic, J., Kekic, D., Jovicevic, M., Milenkovic, M., Mitic Culafic, D., Trudic, A., Ranin, L., & Opavski, N. (2022). Antimicrobial susceptibility testing: A comprehensive review of currently used methods. *Antibiotics*, 11(4), 427. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040427>
- Gales, A. C., Seifert, H., Gur, D., Castanheira, M., Jones, R. N., & Sader, H. S. (2019). Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2016). *Open Forum Infectious Diseases*, 6(Supplement_1), S34–S46. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy293>
- Gandham, N., Gupta, N., Vyawahare, C., Mirza, S. B., & Misra, R. N. (2022). Molecular characterization identifies upstream presence of IS*Aba1* to OXA carbapenemase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Laboratory Physicians*, 14(01), 006–010. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1732809>
- Gerson, S., Nowak, J., Zander, E., Ertel, J., Wen, Y., Krut, O., Seifert, H., & Higgins, P. G. (2018). Diversity of mutations in regulatory genes of resistance-nodulation-cell division efflux pumps in association with tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii*.

- Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(6), 1501–1508.
<https://doi.org/10.1093/jac/dky083>
- Ghai, I., & Ghai, S. (2018). Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infection and Drug Resistance*, 11, 523–530.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S156995>
- Giammanco, A., Calà, C., Fasciana, T., & Dowzicky, M. J. (2017). Global assessment of the activity of tigecycline against multidrug-resistant gram-negative pathogens between 2004 and 2014 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *mSphere*, 2(1). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00310-16>
- Girija, S. A., Priyadharsini, J. V., & Paramasivam, A. (2019). Prevalence of carbapenem-hydrolyzing OXA-type β -lactamases among *Acinetobacter baumannii* in patients with severe urinary tract infection. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 67(1), 1–7. <https://doi.org/10.1556/030.66.2019.030>
- Grisold, A., Luxner, J., Bedenić, B., Diab-Elschahawi, M., Berktold, M., Wechsler-Fördös, A., & Zarfel, G. (2021). Diversity of oxacillinases and sequence types in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Austria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4), 2171.
<https://doi.org/10.3390/ijerph18042171>
- Gupta, N., Angadi, K., & Jadhav, S. (2022). Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with special reference to carbapenemases: A systematic review. *Infection and Drug Resistance*, 15, 7631–7650.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S386641>
- Haeili, M., Abdollahi, A., Ahmadi, A., & Khoshbayan, A. (2021). Molecular characterization of tigecycline non-susceptibility among Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* isolates of clinical origin. *Chemotherapy*, 66(3), 99–106.
<https://doi.org/10.1159/000515100>

- Hamidian, M., & Nigro, S. (2019). Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Genomics*, 5(10). <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000306>
- Hashemizadeh, Z., Hatam, G., Fathi, J., Aminazadeh, F., Hosseini-Nave, H., Hadadi, M., Shakib, N. H., Kholdi, S., & Bazargani, A. (2022). The spread of insertion sequences element and transposons in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting in Southwestern Iran. *Infection & Chemotherapy*, 54(2), 275. <https://doi.org/10.3947/ic.2022.0022>
- He, T., Wang, R., Liu, D., Walsh, T. R., 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>
- Hsieh, Y. C., Wu, J. W., Chen, Y. Y., Quyen, T. L. T., Liao, W. C., Li, S. W., Chen, Y. C., & Pan, Y. J. (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>
- Jamal, S., al Atrouni, A., Rafei, R., Dabboussi, F., Hamze, M., & Osman, M. (2018). Molecular mechanisms of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*, with a special focus on its epidemiology in Lebanon. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 15, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.05.022>
- Jiménez Pearson, M. A., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Duarte Valderrama, C., Salgado Marcano, N., Ramón-Pardo, 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>

- Jindal, K., & Goswami, Dr. M. (2020). Sensitivity testing of antibiotics: A brief view. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 23(15). <https://doi.org/10.36295/ASRO.2020.231536>
- Jo, J., & Ko, K. S. (2021). Tigecycline heteroresistance and resistance mechanism in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology Spectrum*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01010-21>
- Kabic, J., Novovic, K., Kekic, D., Trudic, A., Opavski, N., Dimkic, I., Jovicic, B., & Gajic, I. (2023). Comparative genomics and molecular epidemiology of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 574–585. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2022.12.045>
- Kai, J., & Wang, S. (2020). Recent progress on elucidating the molecular mechanism of plasmid-mediated colistin resistance and drug design. *International Microbiology*, 23(3), 355–366. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00112-1>
- Karakonstantis, S. (2020). A systematic review of implications, mechanisms, and stability of *in vivo* emergent resistance to colistin and tigecycline in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Chemotherapy*, 33(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2020.1794393>
- Khan, Z. A., Siddiqui, M. F., & Park, S. (2019). Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. *Diagnostics*, 9(2), 49. <https://doi.org/10.3390/diagnostics9020049>
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2), 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D., & Tragiannidis, A. (2021a). *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens*, 10(3), 1–31. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>

- Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D., & Tragiannidis, A. (2021b). *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens*, *10*(3), 373. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10030373>
- Langford, B. J., So, M., Simeonova, M., Leung, V., Lo, J., Kan, T., Raybardhan, S., Sapin, M. E., Mponponsoo, K., Farrell, A., Leung, E., Soucy, J.-P. R., Cassini, A., MacFadden, D., Daneman, N., & Bertagnolio, S. (2023). Antimicrobial resistance in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Microbe*. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00355-X](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00355-X)
- Lehman, D. (2016). Triple Sugar Iron Agar Protocols. *American Society of Microbiology*.
- Lentz, S., Dalmolin, T., Barth, A., & Martins, A. (2021). *mcr-1* gene in Latin America: How is it disseminated among humans, animals, and the environment? *Frontiers in Public Health*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.648940>
- Leung, E. C., Leung, P. H., & Lai, R. W. (2019). Emergence of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* ST195 Harboring *bla*_{OXA-23} Isolated from Bacteremia in Hong Kong. *Microbial Drug Resistance*, *25*(8), 1199–1203. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0433>
- Levy, S., Roca, I., Plasencia, S., Vicente, W., Velásquez, J., Muñoz, L., Moreno, J., Pons, M. J., del Valle, J., & Vila, J. (2018). Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Peru. *Emerging Microbes and Infections*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/S41426-018-0127-9>
- Li, Z., Cao, Y., Yi, L., Liu, J.-H., & Yang, Q. (2019). Emergent polymyxin resistance: End of an era? *Open Forum Infectious Diseases*, *6*(10). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz368>
- Liu, C., Chen, K., Wu, Y., Huang, L., Fang, Y., Lu, J., Zeng, Y., Xie, M., Chan, E. W. C., Chen, S., & Zhang, R. (2022). Epidemiological and genetic characteristics of clinical carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains collected countrywide from hospital intensive care units (ICUs) in China. *Emerging Microbes & Infections*, *11*(1), 1730–1741. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2093134>

- Loyola-Cruz, M. Á., Durán-Manuel, E. M., Cruz-Cruz, C., Márquez-Valdelamar, L. M., Bravata-Alcántara, J. C., Cortés-Ortiz, I. A., Cureño-Díaz, M. A., Ibáñez-Cervantes, G., Fernández-Sánchez, V., Castro-Escarpulli, G., & Bello-López, J. M. (2022). ESKAPE bacteria characterization reveals the presence of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in COVID-19/VAP patients. *American Journal of Infection Control*, 0(0). <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2022.08.012>
- Lucaßen, K., Müller, C., Wille, J., Xanthopoulou, K., Hackel, M., Seifert, H., & Higgins, P. G. (2021). Prevalence of RND efflux pump regulator variants associated with tigecycline resistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from a worldwide survey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(7), 1724–1730. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab079>
- Martín-Aspas, A., Guerrero-Sánchez, F. M., García-Colchero, F., Rodríguez-Roca, S., & Girón-González, J. A. (2018). Differential characteristics of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: risk factors, clinical picture, and mortality. *Infection and Drug Resistance*, 11, 861. <https://doi.org/10.2147/IDR.S163944>
- McDevitt, S. (2009). Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. *American Society of Microbiology*.
- Mills, J. P., Kaye, K. S., & Mody, L. (2020). COVID-19 in older adults: clinical, psychosocial, and public health considerations. *JCI Insight*, 5(10). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.139292>
- Ministerio de Salud Pública. (2018). *Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador 2014-2018*.
- Mirzaei, B., Bazgir, Z. N., Goli, H. R., Iranpour, F., Mohammadi, F., & Babaei, R. (2020). Prevalence of multi-drug resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated in clinical samples from Northeast of Iran. *BMC Research Notes*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S13104-020-05224-W>

- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Hamadani, B. H. K., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nasiri, M. J., Zamani, S., Fardsanei, F., Arshadi, M., Bigverdi, R., Hajikhani, B., Goudarzi, H., Tabarsi, P., Dabiri, H., & Feizabadi, M. M. (2020). Prevalence and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: A comprehensive systematic review of cross-sectional studies from Iran. *Microbial Drug Resistance*, 26(3), 270–283. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0435>
- Núñez Quezada, T. D. la L., Hernan Rodríguez, C., Klinger Rincon, H., Nastro, M., Balderrama Yarhui, N., Dabos, L., Acosta Mosquera, Y., Plaza Moreira, N., & Famiglietti, Á. (2020). Epidemiología molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* en la ciudad de Guayaquil. *Medicina*, 22(1), 5–8. <https://doi.org/10.23878/medicina.v22i1.836>
- Özçelik, H. B., Yildirim, T., Marakli, S., & Idil, Ö. (2020). Investigation of oxacillinases type beta-lactamases in carbapenems resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Reviews in Medical Microbiology*, 31(4), 209–214. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000226>
- Palavecino, E., Greene, S. R., & Kilic, A. (2022). Characterisation of carbapenemase genes and antibiotic resistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* between 2019 and 2022. *Infectious Diseases*, 54(12), 951–953. <https://doi.org/10.1080/23744235.2022.2113137>
- Pan, Y., Awan, F., Zhenbao, M., Zhang, X., Zeng, J., Zeng, Z., & Xiong, W. (2020). Preliminary view of the global distribution and spread of the *tet(X)* family of tetracycline resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(10), 2797–2803. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA284>

- Piperaki, E.-T., Tzouvelekis, L. S., Miriagou, V., & Daikos, G. L. (2019). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: in pursuit of an effective treatment. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(8), 951–957. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.014>
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
- PubChem. (2022). Tigecycline. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tigecycline>
- Pucci, M. J., Callebaut, C., Cathcart, A., & Bush, K. (2017). Recent epidemiological changes in infectious diseases. En *Comprehensive Medicinal Chemistry III* (pp. 511–552). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12405-9>
- Rodrigues, D. L. N., Morais-Rodrigues, F., Hurtado, R., dos Santos, R. G., Costa, D. C., Barh, D., Ghosh, P., Alzahrani, K. J., Soares, S. C., Ramos, R., Góes-Neto, A., Azevedo, V., & Aburjaile, F. F. (2021). Pan-resistome insights into the multidrug resistance of *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics*, 10(5), 596. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050596>
- Rodríguez, C. H., Nastro, M., & Famiglietti, A. (2018). Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(3), 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.10.006>
- Rodríguez-Santiago, J., Cornejo-Juárez, P., Silva-Sánchez, J., & Garza-Ramos, U. (2021). Polymyxin resistance in Enterobacterales: overview and epidemiology in the Americas. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 58(5), 106426. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106426>
- Salgado-Camargo, A. D., Castro-Jaimes, S., Gutierrez-Rios, R. M., Lozano, L. F., Altamirano-Pacheco, L., Silva-Sanchez, J., Pérez-Oseguera, Á., Volkow, P., Castillo-Ramírez, S., & Cevallos, M. A. (2020). Structure and Evolution of *Acinetobacter baumannii* Plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01283>

- Santilán, A., & Palacios, E. (2020). Caracterización epidemiológica de COVID-19 en Ecuador. *Interamerican Journal of Medicine and Health*. <https://doi.org/10.31005/iajmh.v3i0.99>
- Santoro, A., Franceschini, E., Meschiari, M., Menozzi, M., Zona, S., Venturelli, C., Digaetano, M., Rogati, C., Guaraldi, G., Paul, M., Gyssens, I. C., & Mussini, C. (2020). Open forum infectious diseases epidemiology and risk factors associated with mortality in consecutive patients with bacterial bloodstream Infection: Impact of MDR and XDR bacteria. *Open Forum Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa461>
- Sarikhani, Z., Nazari, R., & Nateghi Rostami, M. (2017). First report of OXA-143-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* in Qom, Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(11), 1282–1286. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2017.9490>
- Sarshar, M., Behzadi, P., Scribano, D., Palamara, A. T., & Ambrosi, C. (2021). *Acinetobacter baumannii*: An ancient commensal with weapons of a pathogen. *Pathogens*. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040387>
- Sato, Y., Ubagai, T., Tansho-Nagakawa, S., Yoshino, Y., & Ono, Y. (2021). Effects of colistin and tigecycline on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* biofilms: advantages and disadvantages of their combination. *Scientific Reports*, 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90732-3>
- Sharma, S., Banerjee, T., Yadav, G., & Kumar, A. (2023). Susceptibility profile of blaOXA-23 and metallo- β -lactamases co-harboring isolates of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) against standard drugs and combinations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1966. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1068840>
- Shields, P., & Cathcart, L. (2016). Motility Test Medium Protocol. *American Society of Microbiology*.
- Syal, K., Mo, M., Yu, H., Iriya, R., Jing, W., Guodong, S., Wang, S., Grys, T. E., Haydel, S. E., & Tao, N. (2017). Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics*, 7(7), 1795–1805. <https://doi.org/10.7150/thno.19217>

- Tenover, F. C. (2017). Antimicrobial susceptibility testing methods for bacterial pathogens. En *Antimicrobial Drug Resistance* (pp. 1347–1357). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47266-9_32
- Tsai, Y.-K., Liou, C.-H., Lin, J.-C., Fung, C.-P., Chang, F.-Y., & Siu, L. K. (2020). Effects of different resistance mechanisms on antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: a strategic system for screening and activity testing of new antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(4), 105918. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105918>
- Vahhabi, A., Hasani, A., Ahangarzadeh Rezaee, M., Baradaran, B., Hasani, A., Samadi Kafil, H., & Soltani, E. (2021). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from northwest Iran: high prevalence of OXA genes in sync. *Iranian Journal of Microbiology*, 13(3), 282–293. <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i3.6388>
- Verma, P., Tiwari, M., & Tiwari, V. (2021). Efflux pumps in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Current status and challenges in the discovery of efflux pumps inhibitors. *Microbial Pathogenesis*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104766>
- Viceministerio de Gobernanza y Vigilancia de la Salud. (2019). *Plan Nacional para la prevención y control de la resistencia antimicrobiana*. Ministerio de Salud Pública del Ecuador. <https://doi.org/http://salud.gob.ec/>
- Villacís, J. E., Bovera, M., Romero, D., Cornejo, F., Albán, V., Trueba, G., Dorn, H. F., & Reyes, J. A. (2019). NDM-1 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* sequence type 32 in Ecuador. *New Microbes and New Infections*, 29, 100526. <https://doi.org/10.1016/J.NMNI.2019.100526>
- Vrancianu, C. O., Gheorghe, I., Czobor, I. B., & Chifiriuc, M. C. (2020). Antibiotic resistance profiles, molecular mechanisms and innovative treatment strategies of *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*, 8(6), 935. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060935>

- Vrancianu, O., Alistar, C. F., Alistar, A., Gheorghe, I., Vrancianu, C. O., Pelcaru, C. F., Marutescu, L., Popa, M., Czobor, I., Gradisteanu, G., Dobre, E. G., & Chifiriuc, M. C. (2020). Escaping from ESKAPE. Clinical significance and antibiotic resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii*: A review. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, *11*(1), 8190–8203. <https://doi.org/10.33263/BRIAC111.81908203>
- Wareth, G., Linde, J., Hammer, P., Nguyen, N. H., Nguyen, T. N. M., Spletstoesser, W. D., Makarewicz, O., Neubauer, H., Sprague, L. D., & Pletz, M. W. (2020). Phenotypic and WGS-derived antimicrobial resistance profiles of clinical and non-clinical *Acinetobacter baumannii* isolates from Germany and Vietnam. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *56*(4). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106127>
- Wencewicz, T. A. (2019). Crossroads of antibiotic resistance and biosynthesis. *Journal of Molecular Biology*, *431*(18), 3370–3399. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.033>
- World Health Organization. (2017a). *Central Asian and Eastern European Surveillance of antimicrobial resistance*. <http://www.euro.who.int/pubrequest>
- World Health Organization. (2017b, febrero 27). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- World Health Organization. (2021a). *Antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- World Health Organization. (2021b). *WHO model list of essential medicines*. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2021.02>
- Xu, C. F., Bilya, S. R., & Xu, W. (2019). AdeABC efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbes and New Infections*, *30*. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100549>
- Xu, Y., Liu, L., Zhang, H., & Feng, Y. (2020). Mechanistic insights into crosstalk of *tet(X)* and *mcr-1*, two resistance enzymes co-produced by a single plasmid. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.06.981738>

- Yazdansetad, S., Najari, E., Ghaemi, E. A., Javid, N., Hashemi, A., & Ardebili, A. (2019). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates carrying *bla*OXA genes with upstream IS*Aba1*: First report of a novel OXA subclass from Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *18*, 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.12.011>
- Zhang, R., Sun, J., Sun, R., Wang, M., Cui, C., Fang, L., Liao, M., Lu, X., Liu, Y., Liao, X.-P., & Liu, Y.-H. (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>
- Zhang, T., Xu, X., Xu, C.-F., Bilya, S. R., & Xu, W. (2021). Mechanical ventilation-associated pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in Northeast China region: analysis of genotype and drug resistance of bacteria and patients' clinical features over 7 years. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *10*(1), 135. <https://doi.org/10.1186/s13756-021-01005-7>

Anexos

Anexo 1. *Listado de muestras por año clasificadas según la plataforma WHONET 5.6.*

Número de muestra	Año	Fecha de recepción	Código de Identificación
1	2017	3/14/2017	M1
2	2017	5/23/2017	M2
3	2018	3/13/2018	M3
4	2018	7/10/2018	M4
5	2018	7/19/2018	M5
6	2018	7/19/2018	M6
7	2018	7/19/2018	M7
8	2018	7/19/2018	M8
9	2018	7/19/2018	M9
10	2018	8/9/2018	M10
11	2018	8/9/2018	M11
12	2018	9/14/2018	M12
13	2018	11/12/2018	M13
14	2019	4/10/2019	M14
15	2019	4/17/2019	M15
16	2019	6/26/2019	M16
17	2019	6/26/2019	M17
18	2019	7/9/2019	M18
19	2019	7/31/2019	M19
20	2019	10/1/2019	M20
21	2019	11/27/2019	M21
22	2019	11/27/2019	M22
23	2020	1/7/2020	M23
24	2020	1/16/2020	M24
25	2020	1/16/2020	M25
26	2020	1/27/2020	M26
27	2020	1/28/2020	M27
28	2020	1/28/2020	M28
29	2020	1/28/2020	M29
30	2020	1/28/2020	M30
31	2020	2/17/2020	M31
32	2020	2/17/2020	M32
33	2020	2/17/2020	M33
34	2020	6/2/2020	M34

Número de muestra	Año	Fecha de recepción	Código de Identificación
35	2020	6/2/2020	M35
36	2020	6/8/2020	M36
37	2020	7/2/2020	M37
38	2020	7/2/2020	M38
39	2020	7/8/2020	M39
40	2020	7/13/2020	M40
41	2020	7/14/2020	M41
42	2020	8/11/2020	M42
43	2020	8/13/2020	M43
44	2020	8/17/2020	M44
45	2020	8/17/2020	M45
46	2020	8/19/2020	M46
47	2020	8/25/2020	M47
48	2020	8/25/2020	M48
49	2020	9/2/2020	M49
50	2020	9/2/2020	M50
51	2020	9/4/2020	M51
52	2020	9/8/2020	M52
53	2020	9/8/2020	M53
54	2020	9/8/2020	M54
55	2020	9/8/2020	M55
56	2020	9/14/2020	M56
57	2020	9/16/2020	M57
58	2020	9/22/2020	M58
59	2020	9/28/2020	M59
60	2020	10/12/2020	M60
61	2020	10/13/2020	M61
62	2020	10/13/2020	M62
63	2020	10/14/2020	M63
64	2020	10/14/2020	M64
65	2020	10/22/2020	M65
66	2020	10/22/2020	M66
67	2020	10/22/2020	M67
68	2020	10/22/2020	M68
69	2020	10/27/2020	M69
70	2020	10/28/2020	M70
71	2020	10/28/2020	M71

Número de muestra	Año	Fecha de recepción	Código de Identificación
72	2020	10/28/2020	M72
73 ^a	2020	10/28/2020	M73
74	2020	11/5/2020	M74
75	2020	11/10/2020	M75
76	2020	11/24/2020	M76
77	2020	11/24/2020	M77
78	2020	11/24/2020	M78
79	2020	11/24/2020	M79
80	2020	11/24/2020	M80
81	2020	11/24/2020	M81
82	2020	11/24/2020	M82
83	2020	11/24/2020	M83
84	2020	11/24/2020	M84
85	2020	11/24/2020	M85
86	2020	11/24/2020	M86
87	2020	11/24/2020	M87
88	2020	11/24/2020	M88
89	2020	11/24/2020	M89
90	2020	11/24/2020	M90
91	2020	11/24/2020	M91
92	2020	11/24/2020	M92
93	2020	11/24/2020	M93
94	2020	11/24/2020	M94
95	2020	11/24/2020	M95
96	2020	11/24/2020	M96
97	2020	11/24/2020	M97
98	2020	11/24/2020	M98
99	2020	11/24/2020	M99
100	2020	12/1/2020	M100
101 ^b	2020	12/3/2020	M101
102	2020	12/9/2020	M102
103	2020	12/17/2020	M103
104	2020	12/23/2020	M104
105	2020	12/29/2020	M105
106	2020	12/30/2020	M106
107	2020	12/30/2020	M107
108	2021	1/8/2021	M108

Número de muestra	Año	Fecha de recepción	Código de Identificación
109	2021	1/8/2021	M109
110	2021	1/19/2021	M110
111	2021	1/21/2021	M111
112	2021	1/21/2021	M112
113	2021	1/28/2021	M113
114	2021	1/28/2021	M114
115	2021	2/5/2021	M115
116	2021	2/5/2021	M116
117	2021	2/8/2021	M117
118	2021	2/8/2021	M118
119	2021	2/8/2021	M119
120	2021	2/8/2021	M120
121	2021	2/8/2021	M121
122	2021	2/8/2021	M122
123	2021	2/11/2021	M123
124	2021	2/19/2021	M124
125	2021	2/23/2021	M125
126	2021	2/23/2021	M126
127	2021	2/23/2021	M127
128	2021	2/23/2021	M128
129	2021	2/23/2021	M129
130	2021	2/23/2021	M130
131	2021	2/24/2021	M131
132	2021	2/24/2021	M132
133	2021	3/8/2021	M133
134	2021	3/9/2021	M134
135	2021	3/9/2021	M135
136	2021	3/9/2021	M136
137	2021	3/10/2021	M137
138	2021	3/10/2021	M138
139	2021	3/10/2021	M139
140	2021	3/10/2021	M140
141	2021	3/10/2021	M141
142	2021	3/10/2021	M142
143	2021	3/12/2021	M143
144	2021	3/12/2021	M144
145	2021	3/12/2021	M145

Número de muestra	Año	Fecha de recepción	Código de Identificación
146	2021	3/12/2021	M146
147	2021	3/16/2021	M147
148	2021	3/23/2021	M148
149	2021	3/23/2021	M149
150	2021	3/30/2021	M150
151	2021	3/30/2021	M151
152	2021	3/30/2021	M152
153	2021	3/31/2021	M153
154	2021	3/31/2021	M154
155	2021	3/31/2021	M155
156	2021	3/31/2021	M156
157	2021	3/31/2021	M157
158	2021	3/31/2021	M158
159	2021	4/1/2021	M159
160	2021	4/7/2021	M160
161	2021	4/7/2021	M161
162	2021	4/8/2021	M162
163 ^a	2021	4/12/2021	M163
164	2021	4/12/2021	M164
165	2021	4/12/2021	M165
166	2021	4/13/2021	M166
167	2021	4/13/2021	M167
168	2021	4/16/2021	M168
169	2021	4/19/2021	M169
170	2021	4/19/2021	M170
171	2021	4/19/2021	M171
172	2021	4/19/2021	M172
173	2021	4/19/2021	M173
174	2021	4/19/2021	M174
175	2021	4/19/2021	M175
176	2021	4/19/2021	M176
177	2021	4/19/2021	M177
178	2021	4/19/2021	M178
179	2021	4/19/2021	M179
180	2021	4/19/2021	M180
181	2021	4/21/2021	M181
182	2021	4/21/2021	M182

Número de muestra	Año	Fecha de recepción	Código de Identificación
183	2021	4/21/2021	M183
184	2021	4/27/2021	M184
185	2021	4/27/2021	M185
186	2021	4/27/2021	M186
187	2021	4/27/2021	M187
188	2021	5/3/2021	M188
189	2021	5/5/2021	M189
190	2021	5/5/2021	M190
191	2021	5/5/2021	M191
192	2021	5/6/2021	M192
193	2021	5/17/2021	M193
194	2021	5/17/2021	M194
195	2021	5/17/2021	M195
196	2021	5/17/2021	M196
197	2021	5/17/2021	M197
198	2021	5/26/2021	M198
199	2021	5/26/2021	M199
200	2021	5/26/2021	M200
201	2021	5/26/2021	M201
202	2021	5/26/2021	M202
203	2021	5/26/2021	M203
204	2021	5/26/2021	M204
205	2021	5/26/2021	M205
206	2021	5/26/2021	M206
207	2021	5/26/2021	M207
208	2021	5/26/2021	M208
209	2021	5/26/2021	M209
210	2021	5/26/2021	M210
211	2021	5/26/2021	M211
212	2021	6/2/2021	M212
213	2021	6/2/2021	M213
214	2021	6/2/2021	M214
215	2021	6/2/2021	M215
216	2021	6/2/2021	M216
217	2021	6/2/2021	M217
218	2021	6/4/2021	M218
219	2021	6/14/2021	M219

Número de muestra	Año	Fecha de recepción	Código de Identificación
220	2021	6/17/2021	M220
221	2021	6/17/2021	M221
222	2021	6/17/2021	M222
223	2021	6/23/2021	M223
224	2021	7/6/2021	M224
225	2021	7/6/2021	M225
226	2021	7/16/2021	M226
227	2021	7/17/2021	M227
228	2021	7/17/2021	M228
229	2021	7/17/2021	M229
230	2021	7/17/2021	M230
231	2021	7/17/2021	M231
232	2021	7/17/2021	M232
233	2021	7/26/2021	M233
234	2021	7/26/2021	M234
235	2021	7/26/2021	M235
236	2021	7/26/2021	M236
237	2021	7/26/2021	M237
238	2021	8/6/2021	M238
239	2021	8/6/2021	M239
240	2021	8/6/2021	M240
241	2021	8/6/2021	M241
242 ^c	2021	8/6/2021	M242
243 ^c	2021	8/6/2021	M243
244	2021	8/11/2021	M244
245	2021	8/11/2021	M245
246	2021	8/12/2021	M246
247	2021	8/16/2021	M247
248	2021	8/16/2021	M248
249	2021	8/16/2021	M249
250	2021	8/26/2021	M250
251	2021	8/26/2021	M251
252	2021	8/26/2021	M252
253	2021	8/26/2021	M253
254	2021	8/26/2021	M254
255	2021	8/26/2021	M255
256	2021	8/26/2021	M256

Número de muestra	Año	Fecha de recepción	Código de Identificación
257	2021	8/26/2021	M257
258	2021	8/26/2021	M258
259	2021	8/26/2021	M259
260	2021	8/26/2021	M260
261	2021	8/26/2021	M261
262	2021	9/1/2021	M262
263	2021	9/1/2021	M263
264	2021	9/1/2021	M264
265	2021	9/10/2021	M265
266	2021	9/10/2021	M266
267	2021	9/10/2021	M267
268	2021	9/10/2021	M268
269	2021	9/10/2021	M269
270	2021	9/10/2021	M270
271	2021	9/22/2021	M271
272	2021	9/23/2021	M272
273	2021	9/23/2021	M273
274 ^a	2021	9/24/2021	M274
275	2021	10/4/2021	M275
276 ^c	2021	10/4/2021	M276
277	2021	10/4/2021	M277
278	2021	10/6/2021	M278
279	2021	10/15/2021	M279
280	2021	10/15/2021	M280
281	2021	10/15/2021	M281
282	2021	10/25/2021	M282
283	2021	10/25/2021	M283
284	2021	10/25/2021	M284
285	2021	10/25/2021	M285
286	2021	10/25/2021	M286
287	2021	10/25/2021	M287
288	2021	10/25/2021	M288
289	2021	10/25/2021	M289
290	2021	11/12/2021	M290
291	2021	11/12/2021	M291
292	2021	12/7/2021	M292
293	2021	12/7/2021	M293

Número de muestra	Año	Fecha de recepción	Código de Identificación
294	2021	12/7/2021	M294
295	2021	12/7/2021	M295
296	2021	12/7/2021	M296
297	2021	12/10/2021	M297
298	2021	12/30/2021	M298
299	2021	12/30/2021	M299

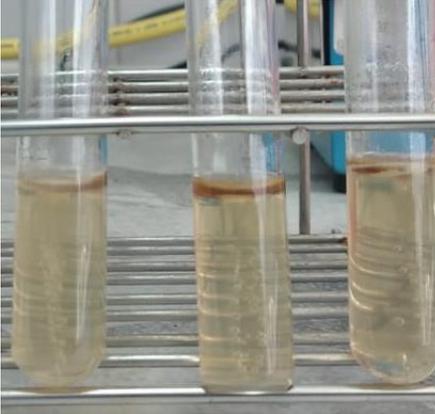
Nota: ^a Cepas no viables.

^b Cepa no encontrada en el banco de cepas.

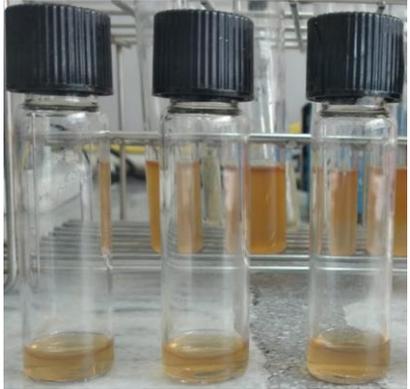
^c Cepas contaminadas.

Anexo 2.

Pruebas bioquímicas para la identificación fenotípica de *A. baumannii*.

Prueba	Fundamento	Interpretación	Resultado Esperado
H ₂ S	Permite detectar si las bacterias producen ácido sulfhídrico (H ₂ S) debido a que se observa una coloración negra producto de la reacción del H ₂ S con el hierro formándose un compuesto de color negro.	H ₂ S (+): Presencia de color negro. H ₂ S (-): El medio mantiene el color inicial.	 <p>H₂S (-)</p> <p>Indol (-)</p> <p>Motilidad (-)</p>
Indol	Algunas bacterias pueden hidrolizar el triptófano de la tripteína presente en el medio de cultivo hasta convertirlo en indol. Este reacciona con el reactivo de Kovacs y forma un compuesto de coloración violeta.	Indol (+): El reactivo de Kovacs cambia a color violeta. Indol (-): El reactivo de Kovacs mantiene su color rojo.	
Motilidad	El medio semisólido facilita la detección de la motilidad por la turbidez del medio (Shields & Cathcart, 2016).	Motilidad (+): Turbidez.	

Prueba	Fundamento	Interpretación	Resultado Esperado
TSI	<p>Algunas bacterias fermentan azúcares como la glucosa, lactosa y sacarosa produciendo ácidos detectables (viraje de color del rojo de fenol a amarillo). El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno que reacciona con sales de hierro (derivadas del amonio y sulfato de hierro del medio) precipitando sulfuro de hierro (color negro). La lectura se realiza en dos partes: pico y base dependiendo si la coloración del medio es ácida (A) o básica (K). Además, se puede observar la formación de gas (Lehman, 2016).</p>	<p>Motilidad (-): Aspecto inicial del medio.</p> <p>K/A: Fermenta únicamente glucosa.</p> <p>A/A: Fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.</p> <p>K/K: No fermenta ninguna de las tres azúcares.</p>	 <p>K/K</p> <p>H₂S (-)</p> <p>Gas (-)</p>

Prueba	Fundamento	Interpretación	Resultado Esperado
RM-VP	<p>La prueba RM-VP identifica la vía de fermentación de la glucosa utilizado por la cepa en estudio. Luego de inocular el medio RM-VP e incubarlo por 24 horas, este se divide en dos tubos.</p> <p>RM (rojo de metilo): El color rojo cereza del RM indica que el microorganismo utiliza la vía de fermentación ácido-mixta.</p>	<p>RM (+): Rojo cereza. RM (-): Rojo original.</p>	
	<p>VP (Voges/Proskauer): Si luego de la adición de KOH (reactivo VP1) y α-naftol (reactivo VP2) se observa un cambio de color a rojo durante 15 minutos, el microorganismo en cuestión sigue la vía de fermentación butilén glicólica (McDevitt, 2009).</p>	<p>VP (+): Rojo cereza VP (-): Color original del medio.</p>	

Elaborado por: López Rosa & Vayas Patricio

Anexo 3.

Preparación de solución madre de tigeciclina (SM).

Datos del antibiótico	
Casa Comercial: Sigma-Aldrich	Almacenamiento: 2-8 °C
Peso Molecular (PM): 585.65 g/mol	Contenido de Agua: 5.79% (2.0 mol)
Fracción Activa: 31%	Pureza HPLC: 98.1%
Solvente: DMSO 7mg/mL	

Cálculo Porcentaje de Agua

Fórmula química: $C_{29}H_{39}N_5O_8 * 2H_2O$

$$PMT: PM \text{ tigeciclina} + PM \text{ agua}$$

$$PMT: 585.65 \frac{g}{mol} + 36 \frac{g}{mol}$$

$$PMT: 621.65 \frac{g}{mol}$$

Cálculo de Potencia

$$Potencia: Pureza * Fracción Activa (1 - \%H_2O)$$

$$Potencia: 981 * 0.31 (1 - 0.0579)$$

$$Potencia: 286.502 \frac{\mu g}{mg}$$

Preparación de la Solución Madre

Peso de tigeciclina: 7 mg

Volumen: 2 ml (1 ml DMSO, 1 ml agua)

$$Concentración (\mu g/ml): \frac{Peso \text{ tigeciclina} (mg) * Potencia (\mu g/mg)}{Volumen (ml)}$$

$$Concentración (\mu g/ml): \frac{7 \text{ mg} * 286.502 \mu g/mg}{2 \text{ ml}}$$

$$Concentración (\mu g/ml): 1002.75 \mu g/mg$$

Preparar 7 mg tigeciclina polvo + 1000 μ l DMSO + 1000 μ l agua

Anexo 4.

Preparación de diluciones dobles seriadas a partir de una solución de trabajo (ST) para la preparación de 4 placas.

Preparación de Solución de Trabajo

Concentración ST: 8 $\mu\text{g/ml}$

Volumen final ST: 12535 ml

Solvente: Caldo Muller-Hinton (MHB)

No. Muestras: 132

A partir de la SM: 100 $\mu\text{l SM}$ + 12435 $\mu\text{l MHB}$ = **12535 $\mu\text{l ST}$**

No. muestras	132	Vol/muestra	6600
Concentración dilución	Concentración final pocillo	Volumen ST	Volumen MHB
8	4	6600	-
4	2	3300	3300
2	1	1650	4950
1	0,5	825	5775
Vol. Total		12375	14025
Vol. aproximado		12535	15000

Volumen Total de MHB: 15000 μl +12435 μl = 27435 μl

Volumen Total de solución por cada concentración

Vol/muestra : 32 muestras * 50 $\mu\text{l pocillo}$

Vol/muestra : 6600 μl

Preparación de la dilución 4 $\mu\text{g/ml}$ a partir de la ST.

Cálculo del Volumen de ST

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{4 \frac{\mu g}{ml} * 6600 \mu l}{8 \frac{\mu g}{ml}}$$

$$V_1 = 3300 \mu l$$

Cálculo de MHB

$$V_{MHB} = Vol/muestra - V_1$$

$$V_{MHB} = 6600 \mu l - 3300 \mu l$$

$$V_{MHB} = 3300 \mu l$$

Se deben tomar 3300 μl de ST y 3300 μl MHB para preparar el volumen total necesario a una concentración de 4 $\mu g/ml$.

Anexo 5.

Muestras compuestas para reacción de PCR según MIC de TGC.

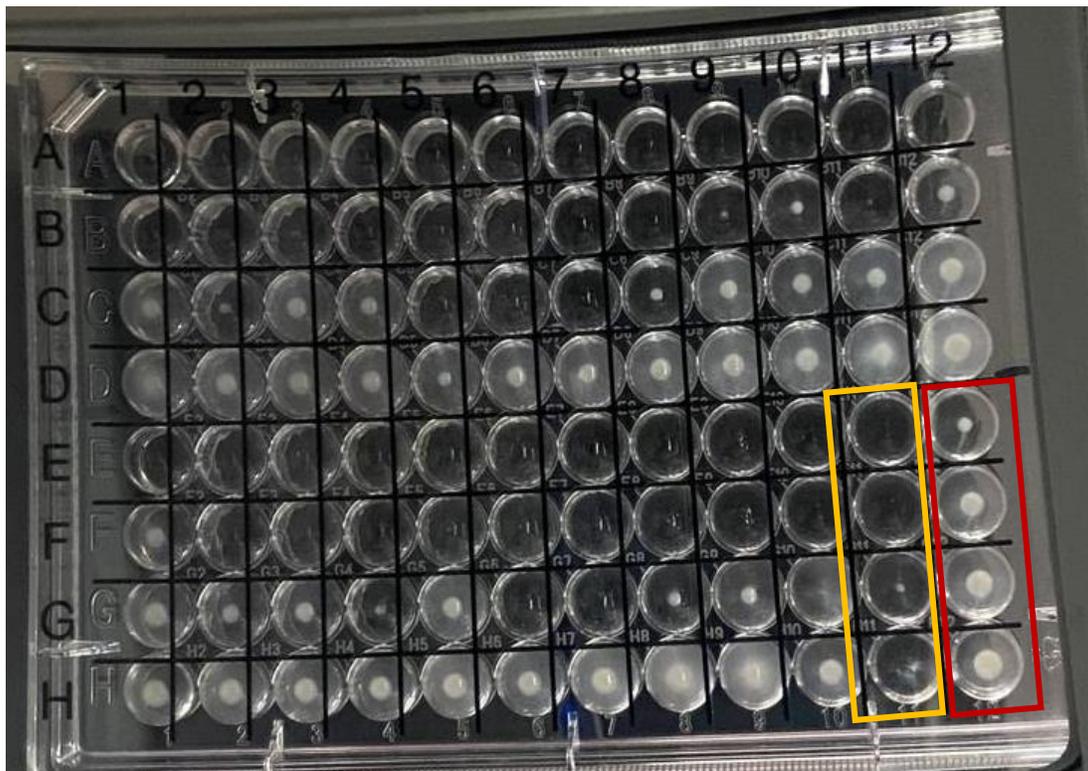
No. Muestra compuesta	Código de identificación de cepa (M)							Susceptibilidad a TGC
1	6	7	8	9	28	29	34	Sensibles
2	50	64	74	75	76	77	78	Sensibles
3	79	80	81	82	83	84	85	Sensibles
4	87	92	93	95	96	97	98	Sensibles
5	99	106	107	109	111	113	116	Sensibles
6	117	120	122	123	124	125	134	Sensibles
7	140	143	144	145	146	151	154	Sensibles
8	160	161	162	164	165	167	169	Sensibles
9	171	172	173	175	176	182	183	Sensibles
10	189	190	191	202	203	206	207	Sensibles
11	208	229	233	234	235	247	255	Sensibles
12	256	257	258	259	260	261	267	Sensibles
13	268	273	278	279	280	281	283	Sensibles
14	284	285	286	287	288	289		Sensibles
15	290	291	292	294	295	296		Sensibles
16	1	2	5					Intermedios
17	10	11	13					Intermedios
18	14	15	16					Intermedios
19	17	18	19					Intermedios
20	20	21	22					Intermedios
21	23	24	30					Intermedios
22	31	35	36					Intermedios
23	39	40	41					Intermedios
24	42	43	44					Intermedios
25	45	46	47					Intermedios
26	48	49	51					Intermedios
27	52	53	54					Intermedios
28	55	56	57					Intermedios
29	58	59	60					Intermedios
30	63	65	66					Intermedios
31	67	68	69					Intermedios
32	70	72	86					Intermedios
33	88	89	90					Intermedios
34	91	94	100					Intermedios
35	102	103	104					Intermedios
36	105	108	110					Intermedios

No. Muestra compuesta	Código de identificación de cepa (M)				Susceptibilidad a TGC
37	112	114	115		Intermedios
38	118	119	121		Intermedios
39	126	127	128		Intermedios
40	129	130	131		Intermedios
41	132	133	135		Intermedios
42	136	137	138		Intermedios
43	139	141	142		Intermedios
44	147	148	149		Intermedios
45	150	152	153		Intermedios
46	155	157	158		Intermedios
47	159	166	168		Intermedios
48	170	174	178		Intermedios
49	181	184	185		Intermedios
50	186	187	188		Intermedios
51	192	195	198		Intermedios
52	199	200	201		Intermedios
53	204	205	209		Intermedios
54	213	215	216		Intermedios
55	217	218	220		Intermedios
56	221	224	225		Intermedios
57	226	227	228		Intermedios
58	230	231	232		Intermedios
59	236	237	239		Intermedios
60	240	241	244		Intermedios
61	245	246	248		Intermedios
62	249	250	251		Intermedios
63	252	253	254		Intermedios
64	264	265	266		Intermedios
65	269	270	271		Intermedios
66	272	277	282		Intermedios
67	293	297	298	299	Intermedios
68	3				Resistente
69	4				Resistente
70	12				Resistente
71	25				Resistente
72	26				Resistente
73	27				Resistente
74	32				Resistente
75	33				Resistente

No. Muestra compuesta	Código de identificación de cepa (M)	Susceptibilidad a TGC
76	37	Resistente
77	38	Resistente
78	61	Resistente
79	62	Resistente
80	71	Resistente
81	156	Resistente
82	177	Resistente
83	179	Resistente
84	180	Resistente
85	193	Resistente
86	194	Resistente
87	196	Resistente
88	197	Resistente
89	210	Resistente
90	211	Resistente
91	212	Resistente
92	214	Resistente
93	219	Resistente
94	222	Resistente
95	223	Resistente
96	238	Resistente
97	262	Resistente
98	263	Resistente
99	275	Resistente

Anexo 6.

Resultado de la placa de microdilución con tigeciclina a 24 horas de incubación



Nota: La presente imagen representa el resultado de la microdilución en caldo de muestras de *A. baumannii* en las cuales se subdividen en 2 secciones, la primera comprendida desde (A-D) y la segunda desde (E-H), la concentración del antibiótico sigue en forma descendente (4-2-1-0,5 µg/ml), el tiempo de incubación es de 24 horas, la región de color amarillo representa el control negativo siendo esta una cepa ATCC *E. coli* 25922, la región roja indica el control positivo el cual se identificó la cepa *K. pneumoniae* perteneciente al CRN-RAM INSPI.

Anexo 7.

Genes de resistencia OXA en las cepas de A. baumannii analizadas en este estudio.

Genes de Resistencia OXA	Cantidad	No. cepa <i>A. baumannii</i>
-23	4	247, 265, 266, 270
-24	1	162
-51	7	166, 167, 201, 220, 263, 272, 273
-143	1	165
-21, -51	1	26
-21, -58, -143	1	122
-23, -24	1	214
-23, -58	1	133
-23, -24, -143	1	43
-23, -24, -51	13	57, 58, 102, 175, 188, 205, 227, 229, 230, 231, 236, 237, 246, 249
-23, -51	89	3, 4, 6, 8, 9, 12, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 38, 46, 51, 59, 64, 65, 66, 67, 137, 153, 158, 160, 161, 164, 169, 170, 172, 173, 174, 176, 177, 179, 180, 181, 182, 183, 185, 186, 189, 193, 194, 196, 197, 204, 209, 210, 211, 212, 219, 222, 223, 233, 234, 238, 244, 245, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 267, 271, 275, 277, 282, 292
-23, -51, -143	9	70, 71, 72, 91, 95, 144, 145, 146, 147

Genes de Resistencia OXA	No. cepa	Código de cepa <i>A. baumannii</i>
-23, -51, -58	4	98, 124, 127, 132
-23, -58, -143	1	63
-24, -51	79	5, 14, 15, 36, 37, 39, 40, 41, 47, 48, 50, 55, 56, 103, 104, 111, 112, 113, 114, 115, 117, 120, 121, 139, 156, 159, 168, 171, 178, 184, 187, 190, 191, 192, 195, 198, 199, 200, 202, 203, 206, 207, 208, 213, 215, 216, 217, 218, 221, 224, 225, 226, 228, 232, 235, 240, 241, 248, 264, 268, 269, 278, 279, 280, 281, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 291, 293, 294, 296, 297, 298, 299
-24, -58	1	239
-24, -51, -143	25	10, 11, 13, 42, 45, 49, 52, 53, 54, 60, 61, 106, 107, 108, 110, 134, 135, 136, 141, 142, 150, 152, 154, 157, 290
-24, -51, -58, -143	2	105, 109
-51, -58		75
-51, -143	40	44, 62, 68, 69, 74, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 100, 118, 119, 125, 126, 128, 129, 138, 140, 143, 148, 149, 151, 155, 295
-51, -58, -143	5	99, 116, 123, 130, 131
Ninguno	4	1, 2, 7, 18

Anexo 8.

Porcentaje de aislamientos resistentes considerando su lugar de origen.

Antibiótico/Provincia	Azuay n = 8	Guayas n = 202	Pichincha n = 54	Santo Domingo n = 27	Tungurahua n = 1
CAZ30	100.00	78.22	81.48	92.59	100.00
CIP5	100.00	96.04	94.44	100.00	100.00
SAM20	87.50	35.64	14.81	40.74	0.00
CN10	100.00	86.63	92.59	100.00	100.00
MEM10	100.00	99.50	100.00	100.00	100.00
IPM10	100.00	99.01	98.15	100.00	100.00
TPZ110	100.00	98.02	96.30	100.00	100.00
FEP30	100.00	96.53	94.44	100.00	100.00
TGC	0.00	12.38*	12.96*	0.00	0.00
COL	0.00	0.50	1.85	3.70	0.00

Nota: Los valores en la presente tabla se encuentran expresados en porcentaje (%), *Provincias en las cuales se encuentra la resistencia a tigeciclina en aislamientos dentro del período estimado.