



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CENTRO DE POSGRADO

MAESTRÍA EN LABORATORIO CLÍNICO

MENCIÓN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA COHORTE 2019

Trabajo de titulación previo a la obtención del grado académico de
Magíster en Laboratorio Clínico Mención Microbiología Clínica

“Caracterización de la resistencia a Linezolid y Vancomicina mediada
por plásmidos en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*”

AUTORA: Bq. Cl. Evelyn Katherine Jaramillo Ruales

DIRECTOR: PhD. William Ricardo Calero Cáceres

Ambato – Ecuador

2022

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CENTRO DE POSGRADO

MAESTRÍA EN LABORATORIO CLÍNICO

MENCIÓN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA COHORTE 2019

INFORMACIÓN GENERAL

TEMA: Caracterización de la resistencia a Linezolid y Vancomicina mediada por plásmidos en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*.

AUTORA: Bq. Cl. Evelyn Katherine Jaramillo Ruales

Bioquímica Clínica

ejr.kathy@gmail.com

DIRECTOR: PhD. William Ricardo Calero Cáceres, Quim.

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Línea de investigación Epidemiología y Salud Pública

APROBACIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

A la Unidad Académica de Titulación de Posgrado de la Facultad Ciencias de la Salud. El Tribunal receptor de la Defensa del Trabajo de Titulación presidido por la Lic. Angela Priscila Campos Moposita Mg., e integrado por los señores: BQF. PH.D. Urbina Salazar Anabell Del Rocío y Mg. Rodríguez Badillo Melina De Lourdes designados por la Unidad Académica de Titulación de Posgrado de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Ambato, para receptor el Trabajo de Titulación con el tema: "CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A LINEZOLID Y VANCOMICINA MEDIADA POR PLÁSMIDOS EN ENTEROCOCCUS FAECALIS Y ENTEROCOCCUS FAECIUM", elaborado y presentado por la Bq. Cl. Evelyn Katherine Jaramillo Ruales, para optar por el Grado Académico de Magister en Laboratorio Clínico mención Microbiología Clínica; una vez escuchada la defensa oral del Trabajo de Titulación el Tribunal aprueba y remite el trabajo para uso y custodia en las bibliotecas de la Universidad Técnica de Ambato.



Firmado electrónicamente por:
**ANGELA PRISCILA
CAMPOS MOPOSITA**

Lic. Angela Priscila Campos Moposita Mg.
Presidente y Miembro del Tribunal de Defensa



Firmado electrónicamente por:
**ANABELL DEL
ROCIO URBINA
SALAZAR**

Bqf. Ph.D. Urbina Salazar Anabell Del Rocío
Miembro del Tribunal de Defensa



Firmado electrónicamente por:
**MELINA DE LOURDES
RODRIGUEZ BADILLO**

Mg. Rodríguez Badillo Melina De Lourdes
Miembro del Tribunal de Defensa

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

La responsabilidad de las opiniones, comentarios y críticas emitidas en el Trabajo de Titulación presentado con el tema: “Caracterización de la resistencia a Linezolid y Vancomicina mediada por plásmidos en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*”, le corresponde exclusivamente a: la Bioquímica Clínica Evelyn Katherine Jaramillo Ruales, Autora; bajo la Dirección del Quim. William Ricardo Calero Cáceres, PhD, Director del Trabajo de Titulación; y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica de Ambato.



Firmado electrónicamente por:
**EVELYN KATHERINE
JARAMILLO RUALES**

Bq. Cl. Evelyn Katherine Jaramillo Ruales

C.I. 1003639844

AUTORA



Firmado electrónicamente por:
**WILLIAM RICARDO
CALERO CACERES**

Quim, William Ricardo Calero Cáceres, PhD.

C.I. 1714348859

DIRECTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que el Trabajo de Titulación, sirva como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad Técnica de Ambato.



Firmado electrónicamente por:
**EVELYN KATHERINE
JARAMILLO RUALES**

Bq. Cl. Evelyn Katherine Jaramillo Ruales

C.I. 1003639844

DEDICATORIA

A Dios por bendecir cada paso de mi vida,

*A mi esposo David, que con su amor y
paciencia me impulsa a ser mejor y cumplir mis
sueños,*

*A mis padres María y Oswaldo, por su
dedicación en todo el camino de mi vida,
ustedes son mi fortaleza y mi guía,*

*A mi hermana Alejita, por ser mi inspiración y
cómplice en buenos y malos momentos,*

*A toda mi familia, quienes siempre me están
apoyando.*

*A mis amigos, por todas las experiencias
compartidas en esta hermosa etapa de mi vida.*

AGRADECIMIENTO

A Dios, por bendecir y proteger cada paso de mi vida, permitiendome encontrar personas extraordinarias en el camino, quienes me han ayudado a crecer como persona y profesional.

A la UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO, a la Facultad de Ciencias de la Salud, por darme la oportunidad de cursar mis estudios de posgrado.

Al INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA, de manera especial al equipo de profesionales del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos, Carito, Karlita, Ruthcita, Ricky, Wlady, Byron y Xavi, quienes a pesar de contratiempos en época de pandemia me dieron todo su apoyo en el desarrollo de este proyecto, además de compañeros son mis amigos, con quienes he compartido momentos inolvidables llenos de aprendizaje.

Mi gratitud a Kary Lalangui del área de EPISIG-INSPI, quien fue una guía indispensable en el desarrollo de análisis del sistema informático de georeferenciación.

Un agradecimiento especial a mi director de tesis William Ricardo Calero Cáceres, PhD, a quien admiro mucho por su arduo trabajo y total entrega a la investigación, gracias por guiar cada paso de este proyecto y compartir su amplio conocimiento.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
ÍNDICE GENERAL.....	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
CAPÍTULO I.....	11
1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	11
1.1. INTRODUCCIÓN	11
1.2. JUSTIFICACIÓN	14
1.3. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	15
CAPITULO II	16
2. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	16
CAPITULO III	19
3. MARCO METODOLÓGICO	19
3.1. Ubicación	19
3.2. Equipos y materiales	19
3.3. Tipo de investigación:.....	20
3.4. Hipótesis - pregunta científica – idea a defender	20
3.5. Población y muestra	21
3.6. Criterios de inclusion y exclusión	21
3.7. Operacionalización de las variables (Anexo Nro.1).....	22
3.8. Metodología	22
3.9. Procesamiento de la información y análisis estadístico	27
CAPITULO IV.....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1. Descripción general de la población.....	29
4.2. Implementación de la técnica de microdilución en caldo	31

4.3.	Identificación de genes que confieren resistencia a linezolid y vancomicina.	34
4.4.	Sistema informático de georreferenciación.....	42
4.5.	Algoritmo para la evaluación y reporte adecuado de linezolid y vancomicina en <i>Enterococcus</i> sp.....	45
4.6.	Discusión.....	47
CAPITULO V		51
5.1.	CONCLUSIONES	51
5.2.	RECOMENDACIONES	52
5.3.	BIBLIOGRAFÍA.....	53
5.4.	ANEXOS.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de primers de genes que confieren resistencia a vancomicina	24
Tabla 2. Preparación de la master mix para la identificación de los genes <i>vanA</i> y <i>vanB</i>	24
Tabla 3. Programa de termociclado para la amplificación de las secuencias de los genes <i>vanA</i> y <i>vanB</i>	25
Tabla 4. Secuencias de primers de genes que confieren resistencia a Linezolid	25
Tabla 5. Preparación de la master mix para la identificar los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxxA</i>	26
Tabla 6. Programa de termociclado para la amplificación de las secuencias de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxxA</i>	26
Tabla 7. Caracterización de población de acuerdo a variables epidemiológicas	30
Tabla 8. Enterococcus sp. recuperados en el período del 2017 al 2020.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Gráfico Nro. 1. Interpretación de la susceptibilidad a vancomicina incubados a 24h y 48h...	32
Gráfico Nro. 2. Perfil de susceptibilidad en cepas resistentes a vancomicina.....	33
Gráfico Nro. 3. Perfil de susceptibilidad en cepas resistentes a linezolid	33
Gráfico Nro. 4. Frecuencia de genes que confieren resistencia a la vancomicina.....	34
Gráfico Nro. 5. Frecuencia de aislamientos resistentes a la Vancomicina del 2017 al 2020 .	35
Gráfico Nro. 6. Frecuencia de detección de genes que confieren resistencia a Linezolid.....	35
Gráfico Nro. 7. Frecuencia de aislamientos con resistencia al Linezolid del 2017 al 2020. ...	36
Gráfico Nro. 8. Relación de genes de resistencia con perfil de susceptibilidad de población de vancomicina	38
Gráfico Nro. 9 Correlación de variables epidemiológicas fenotípicas y genotípicas en cepas resistentes a vancomicina período 2017-2020.	39
Gráfico Nro. 10. Relación de genes de resistencia con perfil de susceptibilidad de población de Linezolid.....	40
Gráfico Nro. 11. Correlación de variables epidemiológicas fenotípicas y genotípicas en cepas resistentes a Linezolid período 2017-2020.....	41
Gráfico Nro. 12. Presencia de <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i> resistentes a la vancomicina en Ecuador, período 2017-2020	42
Gráfico Nro. 13. Presencia de genes <i>vanA</i> en <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i> en Ecuador, período 2017-2020	43
Gráfico Nro. 14. Presencia de genes <i>vanB</i> en <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i> en Ecuador, período 2017-2020	43
Gráfico Nro. 15. <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> resistentes a Linezolid	44
Gráfico Nro. 16. <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> resistente al Linezolid por el gen <i>optrA</i>	45
Gráfico Nro. 17. Flujiograma para el reporte del antibiograma en <i>Enterococcus</i> sp.	46

RESUMEN

Introducción: *Enterococcus sp.* es un patógeno oportunista en pacientes con inmunodepresión, causando enfermedades como endocarditis, infecciones del tracto urinario o en heridas quirúrgicas. La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha categorizado a *E. faecium* resistente a vancomicina como de prioridad Alta (Prioridad 2). La resistencia a la vancomicina esta asociada a la adquisición de genes como *vanA*, *vanB* y *vanC*. En estos casos la opción terapéutica es linezolid, sin embargo, ya se ha reportado *Enterococcus* resistentes a linezolid mediante la adquisición de genes como *optrA*, *cfr* y *poxxA*. **Objetivo:** Caracterizar la resistencia a linezolid y vancomicina mediada por plásmidos en *E. faecalis* y *E. faecium* aislados en el INSPI-Quito, período 2017-2020. **Metodología:** Se trabajó con la población de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a vancomicina y linezolid, con el fin de caracterizar su resistencia a nivel fenotípico, genotípico y relacionar los datos epidemiológicos mediante la georeferenciación y creación de dendogramas. **Resultados:** Se analizaron 203 aislamientos descritos en su mayoría en provincias de la Sierra del Ecuador; se identifican 134 *E. faecium* resistentes a vancomicina, debido a la presencia de los genes *vanA* (44%) y *vanB* (22%); se describen 41 cepas resistentes a lineozlid, en su mayoría *E. faecalis*, por la presencia del gen *optrA*(88%), sin identificarse la presencia de los genes *cfr* y *poxxA*. **Conclusiones:** La resistencia a vancomicina se ha reportado en aislados de *E. faecium* y un elevado porcentaje de resistencia a linezolid en *E. faecalis*, en su mayoría por la presencia de genes plasmídicos, además, *E. faecalis* reporta menos niveles de resistencia a los antibióticos testeados en comparación con *E. faecium*.

Palabras Claves: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, Resistencia a la Vancomicina, VRE, Linezolid

ABSTRACT

Introduction: *Enterococcus sp.* is an opportunistic pathogen in patients with immunosuppression, causing diseases such as endocarditis, urinary tract infections or surgical wounds. The World Health Organization (WHO) has categorized vancomycin-resistant *E. faecium* as High priority (Priority 2). Vancomycin resistance is associated with the acquisition of genes such as *vanA*, *vanB* and *vanC*. Therefore, the therapeutic option is linezolid, however *Enterococcus* resistant to linezolid due to the acquisition of genes such as *optrA*, *cfr* and *poxtA* has already been reported. **Objective:** The aim of this study is to describe resistance to linezolid and vancomycin due to the acquisition of plasmids in *E. faecalis* and *E. faecium* isolated at INSPI-Quito, during 2017-2020. **Methodology:** The population of *E. faecium* and *E. faecalis* resistant to vancomycin and linezolid was analyzed in order to characterize the strains phenotypically and genotypically; in addition, correlate epidemiological data, georeference and create dendrograms. **Results:** 203 isolates were analyzed, mostly identified in the provinces of the Sierra part of Ecuador; 134 *E. faecium* resistant to vancomycin were identified, due to the presence of the *vanA* gene (44%) and the *vanB* gene (22%); 41 strains resistant to linezolid are described, mostly *E. faecalis*, due to the presence of the *optrA* gene (88%); *cfr* and *poxtA* genes are not identified. **Conclusions:** Resistance to vancomycin is described in *E. faecium* and a high percentage of resistance to linezolid in *E. faecalis*, mostly due to the presence of plasmid genes, in addition, *E. faecalis* produces lower levels of antibiotic resistance than *E. faecium*.

Keywords: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, Vancomycin Resistance, VRE, Linezolid

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las bacterias multirresistentes constituyen una importante problemática a nivel de salud pública, tanto en ambientes hospitalarios como comunitarios, su presencia limita las alternativas terapéuticas y sus altas tasas de mortalidad, provocan aproximadamente 700.000 muertes cada año a nivel mundial (Antimicrobial Resistance Fighter Coalition, 2020). De acuerdo a las tendencias actuales, se estima que para el año 2050, ocurrirán aproximadamente 10 millones de muertes al año ocasionadas por infecciones bacterianas, siendo esta cifra mayor a las muertes atribuidas por cáncer (O'Neill, 2014).

El género *Enterococcus* spp. forma parte de la de la microbiota gastrointestinal normal tanto de animales como de humanos, su concentración en heces humanas y animales suelen oscilar entre 10^3 y 10^7 células por gramo, por lo que se han aislado en agua contaminada con aguas residuales o desechos fecales (Zaheer et al., 2020). *Enterococcus* spp. suele actuar como patógeno oportunista cuando atraviesa la barrera mucosa, causando infecciones sistémicas en hospedadores con factores de riesgo como pacientes inmunocomprometidos o sometidos a procedimientos quirúrgicos, llegando a producir infecciones como endocarditis, bacteremias, infecciones del tracto urinario, infecciones intraabdominales, meningitis e infecciones del tracto respiratorio. Su virulencia está mediada por su capacidad de adherirse a tejidos mediante proteínas de superficie, glucopéptidos de membrana, gelatinasa y phili, factores que favorecen la formación de biopelículas (Guzman Prieto et al., 2016).

Las especies de mayor relevancia clínica son *E. faecalis* y *E. faecium* (Zaheer et al., 2020), que han ido adquiriendo genes de resistencia, lo que ha provocado un aumento de tasas de mortalidad, aumento del costo del tratamiento y duración de estancia hospitalaria (Prematunge et al., 2016)(García-Solache & Rice, 2019). Se ha reportado una mortalidad hospitalaria del 16,5% en pacientes hospitalizados con infecciones del tracto urinario debido a *Enterococcus* y

se asocia también a inmunodepresión, hemopatía maligna, nefrostomía, sobretodo en casos de *E. faecium* resistentes a la ampicilina y vancomicina (Álvarez-Artero et al., 2021).

El género *Enterococcus* sp. presenta resistencia natural a cefalosporinas, aminoglucósidos, clindamicina, y trimetoprim-sulfametoxazol. Algunos de estos antimicrobianos pueden aparecer sensibles in vitro, sin embargo, no son efectivos clínicamente (CLSI, 2022). Además, la terapéutica puede irse complicando debido a los diferentes mecanismos de resistencia que este género ha ido adquiriendo a lo largo del tiempo. La **Fig.1** describe la evolución de los mecanismos de resistencia en *Enterococcus*, en los que se visualiza la primera descripción de resistencia a cloranfenicol en 1964, así como a aminoglucósidos de alta carga, vancomicina, linezolid y daptomicina (García-Solache & Rice, 2019).

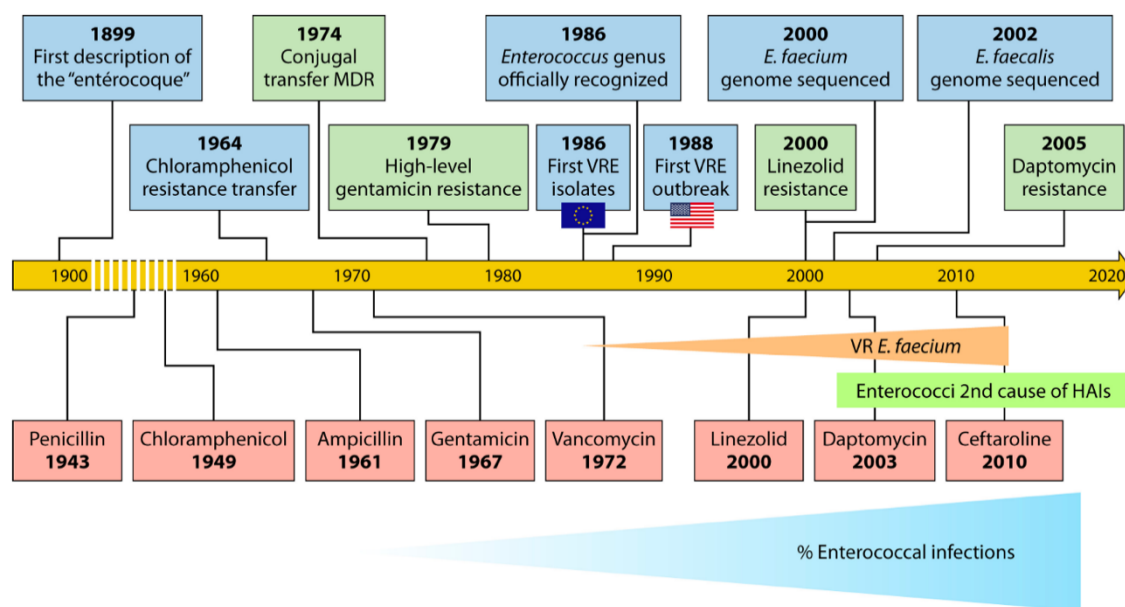


Fig.1. Cronología de eventos relevantes en la historia de los enterococos como patógenos humanos (rectángulos azules); evolución de la resistencia en *Enterococcus*, (recuadros verdes), inicio del uso clínico del antibiótico (rectángulos rojos). Tomado de García-Solache & Rice, 2019.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en su listado de microorganismos patógenos con prioridad para investigación y desarrollo a nivel mundial, ha categorizado a *E. faecium* resistente a vancomicina como de prioridad Alta (Prioridad 2) (WHO, 2017). El CDC,

en el 2017 reportó que el 30 % de aislados de *Enterococcus* fueron resistentes a vancomicina, lo cual se considera la mayor amenaza para el éxito del tratamiento (Centers for Disease Control and Prevention, 2019).

La resistencia a la vancomicina está asociada a la adquisición de genes como *vanA*, *vanB* y *vanC* (B. E. Murray & Arias, 2008). Por otro lado, daptomicina y el linezolid han encontrado un lugar en la terapia para infecciones del torrente sanguíneo; sin embargo, aún no se ha determinado el consenso sobre qué agente es óptimo para tratar las infecciones del sistema nervioso central por *Enterococcus* resistentes a la Vancomicina (ERV). En infecciones invasivas causadas por ERV, se ha descrito un tratamiento óptimo con linezolid, daptomicina y tigeciclina dependiendo del sitio de infección (B. E. Murray & Arias, 2008). Sin embargo, los casos de meningitis de origen sanguíneo a causa de ERV son difíciles de tratar con estos agentes porque la daptomicina ofrece una penetrabilidad limitada en el LCR y el linezolid, para las especies de *Enterococcus*, proporciona actividad bacteriostática (Lee et al., 2020). Además, ya se ha reportado *Enterococcus* resistentes a Linezolid mediante la adquisición de genes como *optrA* y *cfr* (Van Hal et al., 2021).

En el presente estudio se realizó una caracterización mediante el análisis fenotípico y genotípico de la resistencia a la vancomicina y linezolid en *E. faecalis* y *E. faecium*, mediante la implementación de nuevas metodologías para la identificación del perfil de susceptibilidad a estos antibióticos, identificando la epidemiología de la resistencia en *Enterococcus*, lo que permitió ofrecer nuevas herramientas de sustento para próximos estudios y el manejo de estos antibióticos en diferentes casas de salud.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Enterococcus es un microorganismo que suele colonizar el tracto gastrointestinal, este patógeno actúa como oportunista en pacientes con inmunodepresión, causando enfermedades como endocarditis, infecciones del tracto urinario o en heridas quirúrgicas; la falta de recursos económicos destinados a medidas de prevención y bioseguridad, sobre todo en países en vías de desarrollo, puede ser uno de los factores que contribuyan a la rápida diseminación y contaminación cruzada de estos patógenos en pacientes con estancias hospitalarias prolongadas, lo que conlleva al aumento en tasas de mortalidad (Changhua et al., 2016).

Además, este patógeno, ha venido adquiriendo diversos mecanismos de resistencia como a la vancomicina y linezolid, lo que supone un desafío en el éxito del tratamiento. Se ha reportado que pacientes colonizados con *Enterococcus* resistentes a la vancomicina (ERV), han desarrollado sepsis con la misma cepa ERV que estaba colonizando (B. E. Murray & Arias, 2008). La evolución descontrolada de los mecanismos de resistencia antimicrobiana y la acelerada diseminación de estos microorganismos a nivel global, implica destinar más recursos en atención hospitalaria (Dadgostar, 2019). Por ello, es importante la implementación de técnicas que permitan evaluar de manera oportuna el aumento de estas resistencias y recopilar datos sobre su diseminación y evolución en el país, con el fin de controlar a tiempo su propagación.

El Centro de Referencia de Resistencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI-LIP, es la institución que realiza la vigilancia activa de estos patógenos mediante a la Red de Salud Pública y Privada del país, por ello, es necesario la implementación de técnicas *gold estándar*, como la microdilución en caldo, técnica que representa un elevado costo-beneficio para la identificación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cepas que presentan un perfil de resistencia a la vancomicina o a linezolid. Identificar estos patógenos con sus diferentes perfiles de resistencia alrededor del país, mediante la generación de datos epidemiológicos, permitirá orientar a los tomadores de decisión para establecer nuevas normativas, guías de manejo de los antimicrobianos, establecer una terapéutica dirigida y racional, lograr controlar la diseminación de estos microorganismos

multirresistentes e identificar gérmenes críticos que deben abordarse en el entorno *Una sola salud*.

Por lo antes expuesto, resulta muy oportuno caracterizar a nivel fenotípico y genotípico la resistencia a linezolid y vancomicina en *E. faecalis* y *E. faecium* causantes de infecciones asociadas a la atención en unidades de salud de la Red de Salud Pública en Ecuador, con el fin de establecer la diseminación y evolución de la resistencia desde el 2017 al 2020, identificando las posibilidades terapéuticas disponibles al momento. Además, a partir de la implementación del método de microdilución en caldo para la detección de la CMI de linezolid y vancomicina, se pretende establecer protocolos alineados a la normativa nacional emitida por el CRN-RAM, para el reporte adecuado de *Enterococcus* spp. multirresistentes, herramienta que servirá de guía para el reporte e interpretación del análisis de susceptibilidad en los laboratorios de microbiología.

1.3. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

1.3.1. Objetivo General

Caracterizar la resistencia a linezolid y vancomicina mediada por plásmidos en *E. faecalis* y *E. faecium* aislados en el INSPI-Quito, período 2017-2020.

1.3.2. Objetivos específicos

- a) Implementar la técnica de microdilución en caldo de vancomicina y linezolid para la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en cepas de *E. faecalis* y *E. faecium*.
- b) Estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de genes que confieren resistencia a linezolid y vancomicina.
- c) Implementar un sistema informático de georeferenciación para relacionar datos epidemiológicos de aislamientos de *Enterococcus* spp multirresistentes.
- d) Proponer un algoritmo para la evaluación y reporte adecuado de linezolid y vancomicina en *Enterococcus* spp.

CAPITULO II

2. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

En 1899, el género *Enterococcus* fue descrito por primera vez por Thiercelin, como cocos gram positivos que se encuentran dispersos en la tinción de Gram, se clasificaron inicialmente dentro de la familia de *Streptococcus spp.*, sin embargo, después de que las hibridaciones ADN-ADN y ADN-rADN mostraran que estaban relacionadas lejanamente con los *Streptococcus spp.*, se separaron en su propio género denominados *Enterococcus sp.* (B. Murray, 1990; B. E. Murray & Arias, 2008; Thiercelin, 1899).

Las especies de *Enterococcus* por lo general colonizan el tracto intestinal de humanos y animales sanos, pero tienen el potencial de causar infecciones invasivas si se altera el delicado equilibrio de la microbiota (Ayobami et al., 2020b). En un estudio realizado por Zhang y sus colaboradores del 2012 al 2015, describen que entre las especies de *Enterococcus sp.*, las aisladas con mayor frecuencia en entornos nosocomiales son *E. faecalis* y *E. faecium* (Zhang et al., 2017).

El género *Enterococcus sp.* presenta resistencia intrínseca a varias clases de antimicrobianos y cualquier resistencia adicional adquirida limita gravemente las opciones terapéuticas. El Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), para el 2020 reporta los datos de 30 países que notificaron un aumento significativo de la resistencia a vancomicina desde el 2015 al 2019, siendo del 10,5% al 18,3%, respectivamente (European Centre for Disease Prevention and Control, 2020). Asimismo, otro estudio reporta un aumento significativo desde el 2012 con un 8% de resistencia (Ayobami et al., 2020b). Además, en *E. faecalis* la resistencia a vancomicina se mantuvo baja en la mayoría de los países notificantes, sin embargo, no se reporta los datos de susceptibilidad a linezolid en este género (European Centre for Disease Prevention and Control, 2020).

Un meta-análisis realizado con datos del 2000 al 2018, recopila la frecuencia de la resistencia a los antibióticos en aislados de *Enterococcus* spp. provenientes de muestras de sangre de pacientes hospitalizados en diferentes regiones del mundo, identificando un nivel más bajo de resistencia a la vancomicina en países del Pacífico Occidental, Europa y América, que en países del Sudeste Asiático y el Mediterráneo Oriental. Por otro lado, la especie de *Enterococcus faecium* presenta niveles más bajos de resistencia a Linezolid en América y más altos niveles en el sudeste asiático (Jabbari Shiadeh et al., 2019).

Por el contrario, en el reporte de resistencia a los antimicrobianos del CDC se describe una disminución significativa en la aparición de casos de *Enterococcus* resistentes a vancomicina del 2012 al 2017 tanto en pacientes hospitalizados como comunitarios. Sin embargo, se describe un mayor número de casos a nivel comunitario, tanto de infecciones en pacientes con exposición reciente a la atención médica e infecciones en personas sin exposición previa a la atención médica (Centers for Disease Control and Prevention, 2019).

En América Latina, los datos sobre la resistencia en *Enterococcus* es escasa, sin embargo, en un estudio se realiza el análisis genómico de *E. faecium* resistentes a la vancomicina provenientes de 5 países (Colombia, Ecuador, Venezuela, Perú y México), en el cual se identifica que la mayoría de *Enterococcus* resistentes a vancomicina están mediados por el gen *vanA* y estos microorganismos presentan también altas tasas de resistencia a ampicilina, gentamicina y estreptomina de alta carga (O'Driscoll & Crank, 2015). Sin embargo, a pesar que todos los aislados fueron sensibles a linezolid, se reporta la presencia del gen *optrA* en Colombia y el gen *cfrB* en México (Rios et al., 2020). Además, en Colombia se han reportado *E. faecalis* con la presencia del gen *optrA* en muestras de carne de ave de corral (Cavaco et al., 2017).

En Ecuador, el CRN-RAM en el 2019 reporta datos a nivel nacional de *Enterococcus* de origen hospitalario resistentes a la vancomicina, tanto en *E. faecalis* y *E. faecium* con un porcentaje de 1,8 y 23,4% respectivamente; por otro lado, se describe un porcentaje de resistencia a linezolid de 1,6% en *E. faecalis* y 1,8% *E. faecium*, sin embargo, no hay reportes a nivel comunitario (Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública CRN-RAM, 2019).

El primer reporte de *E. faecalis* resistente a linezolid mediada por el gen *optrA* se describió en el año 2019 en dos hospitales de la ciudad de Quito (Ministerio De Salud Pública del Ecuador, 2019), por lo que es importante investigar si en aislados de años anteriores ya presentaban este gen de resistencia en los clones circulantes.

Se ha estudiado la concordancia entre diferentes metodologías para la identificación de la CMI de vancomicina (Klare et al., 2019; Kuo et al., 2020). En 2018, se emite una alerta para la detección de la CMI de vancomicina en *Enterococcus vanB* positivos, ya que en varios estudios se identificó que el inóculo e incubación estándar, no eran los ideales para la detección de resistencia de bajo nivel a glucopéptidos. Por lo que, en estos casos es importante la confirmación de la CMI, así como las pruebas moleculares para confirmar o excluir la presencia de los genes *van* (Klare et al., 2019).

En el presente estudio, se logra caracterizar la resistencia a vancomicina y linezolid, mediante pruebas *gold estándar* como el método de microdilución en caldo y sus genes involucrados mediante pruebas moleculares; identificando la frecuencia de los mismos del 2017 al 2020, su distribución en el país y como está relacionado el perfil de susceptibilidad a otros antibióticos usados como terapéutica en estos microorganismos.

CAPITULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Ubicación

Los análisis se realizaron en el Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-Coordinación Zonal 9 (INSPI-CZ9), quienes son los encargados de la vigilancia de microorganismos multirresistentes emergentes en el país, a través de la Red Pública Integral de Salud del Ecuador, además de incorporar normativas a nivel nacional para la implementación de métodos estandarizados.

3.2. Equipos y materiales

a) *Caracterización fenotípica de Enterococcus sp multirresistentes*

Insumos

- Cajas mono Petri y bi Petri
- Asas estériles
- Pinzas
- Placas portaobjetos
- Guantes de nitrilo
- Gradillas
- Mascarillas
- Placas de 96 pocillos fondo cónico

Reactivos

- Caldo Cerebro Corazón
- Agar Base Sangre
- Agar CLED
- Discos de antibióticos
- Antibiótico en polvo de Vancomicina
- Antibiótico en polvo de Linezolid
- Caldo Mueller Hinton Ajustado

Equipos

- Pipeta multicanal de 20-200uL
- Pipeta de volumen variable 200-1000uL
- Pipeta de volumen variable 20-200uL

- Pipeta de volumen variable 0.1 - 10uL
- Pesa analítica
- Lector manual de placas de microdilución

b) Caracterización molecular de *Enterococcus sp multirresistentes*

Insumos

- Guantes de nitrilo
- Tubos de PCR de 0.2ml cónicos con tapa plana adherida al tubo libre de ARNasa ANDasa
- Microtubo de 1.5 ml cónicos con tapa plana adherida al tubo libre de ARNasa ADNasa

Reactivos

- Kit de extracción de ADN
- Primers (descrito en apartado 5.6 *Recolección de información*)
- Agarosa para electroforesis

Equipos

- Termobloque
- Centrífuga de microtubos de 1.5mL
- Termociclador
- Fotodocumentador
- Computadora

3.3. Tipo de investigación:

La investigación es cuantitativa, ya que se realiza los experimentos para caracterizar la resistencia a linezolid y vancomicina a nivel fenotípico y genotípico. Por otro lado, es una investigación cualitativa, ya que se correlaciona los datos fenotípicos y genotípicos de las diferentes cepas circulantes con variables epidemiológicas como: edad, sexo, tipo de muestra, ubicación, fecha de aislamiento, tipo de aislamiento (hospitalario o comunitario).

3.4. Hipótesis - pregunta científica – idea a defender

En esta investigación se plantea la siguiente interrogante: ¿Cuál es el nivel de resistencia a linezolid y vancomicina en *E. faecalis* y *E. faecium* del 2017 al 2020 identificados mediante técnicas fenotípicas y genotípicas?

3.5. Población y muestra

Tipo de muestreo:

Se realizó un muestreo por conveniencia, ya que se escogieron los siguientes grupos de *Enterococcus* sp. multirresistentes:

- *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a vancomicina
- *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a linezolid

Tamaño muestral:

En el período del 2017 al 2020 se receptaron en el INSPI un total de 632 cepas de *Enterococcus* spp. de los cuales se escogieron los siguientes grupos:

- *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a vancomicina = 166
- *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a linezolid = 48

3.6. Criterios de inclusión y exclusión

a) Criterios de inclusión

- Especies de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*
- Aislamientos que se encuentren ingresados en la base de datos del 2017 al 2020
- Enterococcus* resistentes a la vancomicina o al linezolid.
- Aislamientos que presenten más de tres variables epidemiológicas en la base de datos como unidad de salud, área, sexo, edad, tipo de muestra, especie.

b) Criterios de exclusión

- Enterococcus* que no se encuentren viables para su recuperación del cepario
- Aislamientos que no se encuentren bien rotulados en el cepario
- Viales que estén derramados o que no tengan el volumen suficiente para realizar la reactivación de la cepa
- Cepas aisladas en diferente período de tiempo.

3.7. Operacionalización de las variables (Anexo Nro.1)

3.8. Metodología

a) Autorizaciones

Para realizar la investigación se solicitó la aprobación de la unidad académica de titulación de posgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Ambato (**Anexo Nro.2**), por otro lado, se solicitó la autorización al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI-LIP) para el uso de datos y cepas bacterianas, para lo cual se firmó la ficha técnica y acuerdo de entendimiento (**Anexo Nro.3 y 4**).

b) Identificación de la población y reactivación de cepas

Se analizaron las bases de datos para identificar las cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* receptados en el INSPI del 2017 al 2020 definidas en la población de muestreo, posteriormente se reactivaron las cepas almacenadas a -70 °C sembrando en el caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés) a 37 °C por 24 horas, se realizó el aislamiento de todos los viales que presentaban turbidez en el medio de cultivo CLED incubando a 37 °C por 24 horas (Domig et al., 2003), se aisló una sola colonia para la siembra en agar nutritivo y se almacenaron en BHI+20% de Glicerol y TE 1x para sus posteriores análisis fenotípicos y genotípicos.

c) Métodos Objetivo 1. Implementar la técnica de microdilución en caldo de vancomicina y linezolid para la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en cepas de *E. faecalis* y *E. faecium*.

Se implementó la técnica de microdilución en caldo para vancomicina y linezolid bajo los criterios del CLSI M07, 11th ed. (2018).

Microdilución en caldo de vancomicina

Se preparó la solución madre según los cálculos del **Anexo Nro.5**, solución de trabajo y diluciones requeridas en caldo Mueller Hinton -Cation ajustado (MHB) (**Anexo Nro.6**), las

cuales fueron dispensadas en una microplaca de 96 pocillos de fondo cónico (**Anexo Nro.7**); se realizó la siembra de los microorganismos reactivados del cepario en Nutritivo para preparar la suspensión bacteriana 0,5 Mc Farland en solución salina al 0,9%, se realizó una dilución 1:100, se inoculó la suspensión bacteriana en cada dilución y las placas fueron incubadas a 37 °C (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018).

Microdilución en caldo de Linezolid

Se preparó la solución madre según los cálculos del **Anexo Nro.8**, solución de trabajo y diluciones requeridas en caldo Mueller Hinton-Catión ajustado, las cuales fueron dispensadas en una microplaca de 96 pocillos de fondo cónico **Anexo Nro.9 y 10**; Se realizó la siembra de los microorganismos reactivados del cepario en Nutritivo para preparar la suspensión bacteriana 0,5 Mc Farland en solución salina al 0,9%, se realizó una dilución 1:100, posteriormente se inoculó la suspensión bacteriana en cada dilución y las placas fueron incubadas a 37 °C y la lectura se realizó según lo indicado en el CLSI M07 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018)

Para la estandarización se utilizaron cepas de control de calidad con CMI de vancomicina y linezolid conocidas, la lectura de las microplacas se realizó mediante un espejo invertido, interpretando los resultados con los puntos de corte de la guía M100, 30th ed. del CLSI (2020), tanto a las 24 horas y 48 horas por dos analistas para realizar la intercomparación (Dejoies et al., 2020); para la validación de los resultados se utilizó la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 identificando que el rango de la concentración mínima inhibitoria se encuentre dentro de lo establecido en el CLSI M100 (Tabla 5A-1) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020).

- d) Métodos Objetivo 2.** Estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de genes que confieren resistencia a linezolid y vancomicina.

Se realizó la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de los genes que confieren resistencia a vancomicina y linezolid, para ello, se prepararon suspensiones bacterianas en TE 1X de las cepas con crecimiento de 24 horas, la extracción

se llevó a cabo mediante el método de ebullición, realizado en el Termobloque Labnet, por un tiempo de 10 minutos, a una temperatura de 95°C. Las suspensiones fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 5 minutos, se separó el sobrenadante y se almacenó a -20°C.

Para la identificación de los genes *vanA* y *vanB* que confieren resistencia a vancomicina se utilizaron los primers descritos en la **Tabla 1**. La preparación de la master mix se especifica en la **Tabla 2**. Las condiciones de la PCR se describen en la **Tabla 3**.

Tabla 1. Secuencias de primers de genes que confieren resistencia a vancomicina

Gen		Secuencia de primers	Tamaño	Referencia
<i>vanA</i>	F	5'-GGGAAAACGACAATTGC-3'	732pb	(Akpaka et al., 2016)
	R	5'-GTACAATGCGCCGTTA-3'		
<i>vanB</i>	F	5'-ATGGGAAGCCGATAGTC-3'	635pb	(Akpaka et al., 2016)
	R	5'-GATTCGTTCTCGACC-3'		

Elaborado por: Katherine Jaramillo

Tabla 2. Preparación de la master mix para la identificación de los genes *vanA* y *vanB*

Reactivo	Volumen	Concentración
Agua Molecular	10.5 uL	-
Primer Formward	0.5 uL	0.2 uM
Primer Reverse	0.5 uL	0.2 uM
Taq Master Mix	12.5 uL	2.5 U/uL
DNA	1 uL	-
Volumen Final	25uL	

Elaborado por: Katherine Jaramillo

Tabla 3. Programa de termociclado para la amplificación de las secuencias de los genes *vanA* y *vanB*.

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94°C	5 min	1
Denaturación	94°C	1 min	
Hibridación	58°C	1min	30
Extensión	72°C	1min	
Extensión final	72°C	7min	1

Fente: (Akpaka et al., 2016) *Elaborado por:* Katherine Jaramillo

De la misma forma se identificaron los genes *cfr*, *optrA* y *poxA* que confieren resistencia a Linezolid (**Tabla 4**). La preparación de la master mix se especifica en la **Tabla 5**. Las condiciones de la PCR se describen en la **Tabla 6**.

Tabla 4. Secuencias de primers de genes que confieren resistencia a Linezolid

Gen		Secuencia de primers	Tamaño	Referencia
<i>cfr</i>	F	5'-TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA-3'	746pb	(Kehrenberg & Schwarz, 2006)
	R	5'-ACCATATAATTGACCACAAGCAGC-3'		
<i>optrA</i>	F	5'- TACTTGATGAACCTACTAACCA-3'	422pb	(Brenciani et al., 2016)
	R	5'-CCTTGAACACTGATTCTCGG-3'		
<i>poxA</i>	F	5'-AAAGCTACCCATAAAATATC-3',	533pb	(Bender et al., 2019)
	R	5'-TCATCAAGCTGTTCGAGTTC-3'		

Elaborado por: Katherine Jaramillo

Tabla 5. Preparación de la master mix para la identificación de los genes *cfr*, *optrA* y *poxxA*.

Reactivo	Volumen	Concentración
Agua Molecular	7.5 uL	-
<i>optrA</i> Primer Forward	0.5 uL	0.2 uM
<i>optrA</i> Primer Reverse	0.5 uL	0.2 uM
<i>cfr</i> Primer Forward	0.5 uL	0.2 uM
<i>cfr</i> Primer Reverse	0.5 uL	0.2 uM
<i>poxxA</i> Primer Forward	0.5 uL	0.2 uM
<i>poxxA</i> Primer Reverse	0.5 uL	0.2 uM
Taq Master Mix (5U/uL)	12.5 uL	2.5 U/uL
DNA	1 uL	-
Volumen Final	25uL	-

Elaborado por: Katherine Jaramillo

Tabla 6. Programa de termociclado para la amplificación de las secuencias de los genes *cfr*, *optrA* y *poxxA*.

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	96°C	2 min	1
Denaturación	96°C	30 s	
Hibridación	50°C	30 s	30
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	5 min	1

Fuente:(Bender et al., 2019) *Elaborado por:* Katherine Jaramillo

Los productos de la PCR fueron analizados mediante una corrida electroforética en gel de agarosa 2%, teñidos con GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain, a 90 voltios durante 45 minutos y posteriormente visualizados con la ayuda de un Fotodocumentador.

- e) **Métodos Objetivo 3.** Implementar un sistema informático de georreferenciación para relacionar datos epidemiológicos de aislamientos de *Enterococcus* spp multirresistentes.

Se implementó un Sistema de Información Geográfica (SIG) para georreferenciar fenotípicamente y genotípicamente los aislamientos de *Enterococcus* sp., en primer lugar se estructuró una base de datos en Microsoft Excel clasificando a los *Enterococcus* sp. por el nivel de resistencia tanto a linezolid como a vancomicina en las diferentes provincias; por otro lado, se elaboró la base de los análisis moleculares para su posterior georeferenciación de los diferentes genes de resistencia a linezolid y vancomicina, con el fin de identificar la diseminación de los mismos en el país y su relación con los diferentes datos a nivel epidemiológico. Se crearon los documentos, para posteriormente ir añadiendo capas a partir del mapa de Ecuador, se añadieron capas como, unidades de salud, microorganismos identificados, genes de resistencia y frecuencia de los mismos.

- f) **Métodos Objetivo 4.** Proponer un algoritmo para la evaluación y reporte adecuado de linezolid y vancomicina en *Enterococcus* sp.

Se realizó la propuesta de un algoritmo para la evaluación y reporte adecuado de linezolid y vancomicina en *Enterococcus* sp remitidos al Centro de Referencia de Resistencia a los Antimicrobianos, el cual tiene la finalidad de plantear una mejora en procesos operativos manejados en el laboratorio, para ello se analizó toda la información recolectada del estudio y se realizó un flujograma de reporte.

3.9. Procesamiento de la información y análisis estadístico

Los resultados de la concentración mínima inhibitoria se analizaron mediante el software Whonet 5.6, por otro lado, las variables epidemiológicas de las cepas y la caracterización genotípica de los *Enterococcus* sp. se tabuló en una base de datos en Microsoft Excel y se realizó el análisis en el software IBM SPSS, empleando estadística descriptiva y creación de tablas para la relación con las variables nominales. Además, se utilizó el programa MultiExperiment Viewer versión 2.2, para realizar un mapa de calor para evaluar la relación

entre los perfiles de susceptibilidad y la presencia de los diferentes genes de resistencia a vancomicina y linezolid. Por otro lado, se utilizó la herramienta en línea iTOL (Interactive Tree Of Life), para realizar árboles filogenéticos y visualizar de forma más detallada la relación entre variables epidemiológicas, datos fenotípicos y genotípicos de los microorganismos estudiados (Letunic & Bork, 2019).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que aquí se exponen corresponden al tema investigado sobre la caracterización de la resistencia a linezolid y vancomicina mediada por plásmidos en *E. faecalis* y *E. faecium*, se describe, las características de la población de estudio, implementación de técnica de microdilución en caldo, pruebas de biología molecular, la distribución de los aislamientos en el país y flujos para realizar el antibiograma de estos microorganismos.

4.1. Descripción general de la población

Se analizó un total de 203 microorganismos identificados como *E. faecalis* y *E. faecium* en el CRN-RAM del año 2017 al 2020, los cuales cumplieron los criterios de inclusión y exclusión mencionados en el estudio. Todos los microorganismos incluidos en la investigación fueron caracterizados mediante pruebas fenotípicas y genotípicas, almacenados y conservados a temperatura de -80 °C.

De acuerdo a las variables clínico-epidemiológicas ingresadas en la base de datos del sistema Whonet 5.6, se identificó un predominio de aislamientos en el género masculino con un porcentaje de 55.7% y en el género femenino 44.3%, con un rango de edad de 0 a 93 años, de las cuales en su mayoría fueron aisladas en población adulta 94.1%, en comparación de la población pediátrica y neonatos que se obtuvo únicamente un porcentaje del 4.9% y el 1% respectivamente, como se indica en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Caracterización de población de acuerdo a variables epidemiológicas

n = 203	f	%
GÉNERO		
Mujeres	90	44.3
Hombres	113	55.7
EDAD		
Neonatos	2	1.0
Pediátrico	10	4.9
Adultos	191	94.1
DIAGNÓSTICO		
Infección del Tracto Urinario	55	27.1
Otros	51	25.1
Sin especificar	37	18.2
COVID-19	35	17.2
Tumores	16	7.9
Sepsis	9	4.4
TIPO DE SERVICIO		
Hospitalizado	123	60.6
UCI	47	23.2
Ambulatorio	17	8.4
Emergencia	16	7.9
TIPO DE MUESTRAS		
Orina	77	37.9
Sangre	52	25.6
Herida y Secreciones	35	17.2
Piel y tejidos Blandos	24	11.8
Rectal	8	3.9
Tracto respiratorio	7	3.4

Fuente: Base de datos INSPI RAM. *Elaborado por:* Katherine Jaramillo

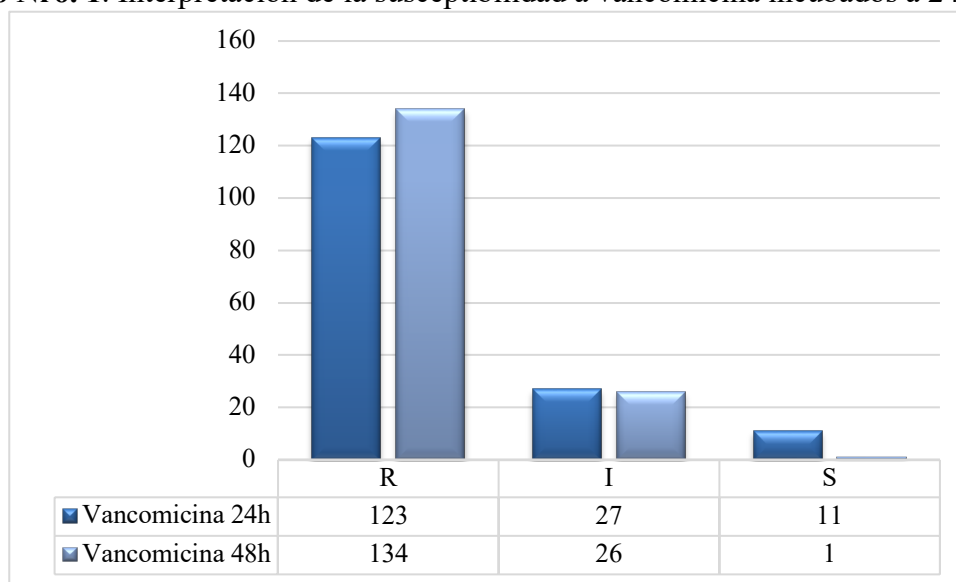
Por otro lado, se identifica que no hay un diagnóstico de enfermedades que se relacione con la infección por *Enterococcus*, sin embargo, el 27.1% pertenece a pacientes diagnosticados con infección del tracto urinario y el 17.2% presentan COVID-19, los cuales fueron aislados únicamente del año 2020. Además, se observa un mayor número de aislamientos en pacientes hospitalizados 60.6% y se describe que el tipo de muestra en la que más se aísla estos microorganismos es orina 37.9%, seguido de muestras de sangre (25.6%).

4.2. Implementación de la técnica de microdilución en caldo

Para la implementación de la técnica de microdilución se realizaron ensayos de reproducibilidad en diferentes días, operadores y bajo las mismas condiciones de ensayo, utilizando cepas estándares de colección, obteniendo una concordancia del 100% en: *E. faecalis* ATCC 29212 (sensible a vancomicina y linezolid), *E. faecalis* ATCC 51299 (productor del gen *vanB*, sensible a linezolid), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Sensible a vancomicina y linezolid), *S. aureus* ATCC 29213 (Sensible a vancomicina) y una concordancia mayor al 80% para *E. gallinarum* OPS 267 (productor del gen *vanC*), *E. faecium* OPS243 (Resistente a vancomicina y linezolid). Se elaboró un flujograma para realizar el reporte de microdilución en caldo de vancomicina y linezolid de *Enterococcus* sp disponible en el **Anexo Nro.11**.

En cuanto a la técnica de microdilución en caldo de vancomicina, se realizó la comparación de lectura de 24 h y 48 h de incubación, identificando que a las 48 horas se logra detectar un número mayor de microorganismos resistentes, tal como se observa en el **Gráfico Nro.1**.

Gráfico Nro. 1. Interpretación de la susceptibilidad a vancomicina incubados a 24 h y 48 h



Elaborado por: Katherine Jaramillo

Mediante la técnica “gold standard” microdilución en caldo, se identificaron 134 cepas de *E. faecium* resistentes a la vancomicina y 41 cepas resistentes al linezolid, de las cuales 2 cepas fueron *E. faecium* y 40 *E. faecalis*. Los resultados se visualizan en la **Tabla 8**.

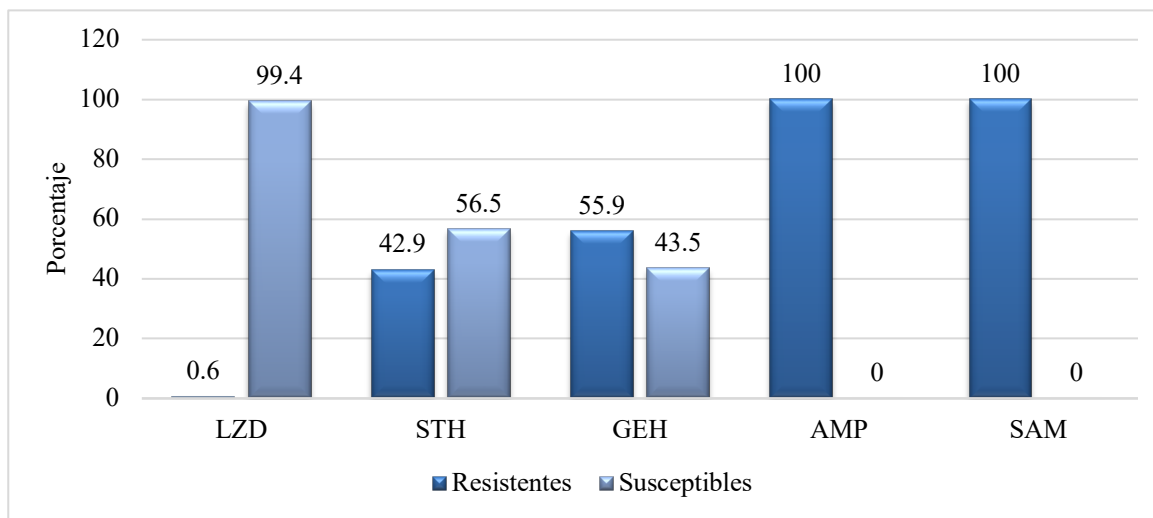
Tabla 8. *Enterococcus* sp. recuperados en el período del 2017 al 2020

Antibióticos	Cepas viables evaluadas	Microdilución en caldo			<i>Enterococcus</i> resistentes	
		R	I	S	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
Vancomicina	161	134 (83.2%)	26 (16.1%)	1 (0.6 %)	134 (100 %)	0 (0%)
Linezolid	42	41 (97.6%)	1 (2.4 %)	0 (-)	2 (4.8%)	40 (95.2%)

Elaborado por: Katherine Jaramillo

El perfil de susceptibilidad que presenta la población de *Enterococcus* sp. resistentes a vancomicina, se observa en el **Gráfico Nro. 2**, el 100% de las cepas presentaron resistencia a la ampicilina y a la combinación Ampicilina/Sulbactam, ya que todas se identificaron como *E. faecium* y únicamente una cepa (0,6%) presentó resistencia a linezolid, en cuanto a la resistencia a estreptomicina de alta carga y gentamicina de alta carga fue el 42,9% y 55,9%, respectivamente.

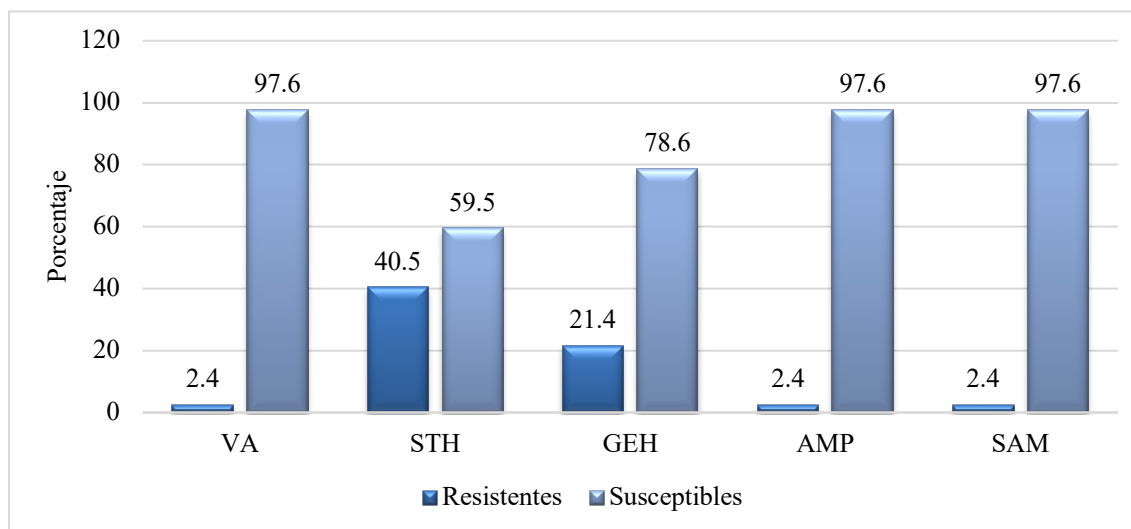
Gráfico Nro. 2. Perfil de susceptibilidad en cepas resistentes a vancomicina



LZD: Linezolid 10ug, **STH:** Estreptomicina 300ug, **GEH:** Gentamicina 120ug, **AMP:** Ampicilina 10ug, **SAM:** Ampicilina/Sulbactam 10/10ug

Por otro lado, el perfil de susceptibilidad de la población de *Enterococcus* sp. resistentes a linezolid se describe en el **Gráfico Nro. 3**, el 97.6% presentan susceptibilidad a vancomicina, 59.5% a estreptomicina de alta carga, 78,6% a gentamicina de alta carga y 97.6% fueron susceptibles a la ampicilina y ampicilina/sulbactam, ya que la mayoría de población son *E. faecalis*.

Gráfico Nro. 3. Perfil de susceptibilidad en cepas resistentes a Linezolid

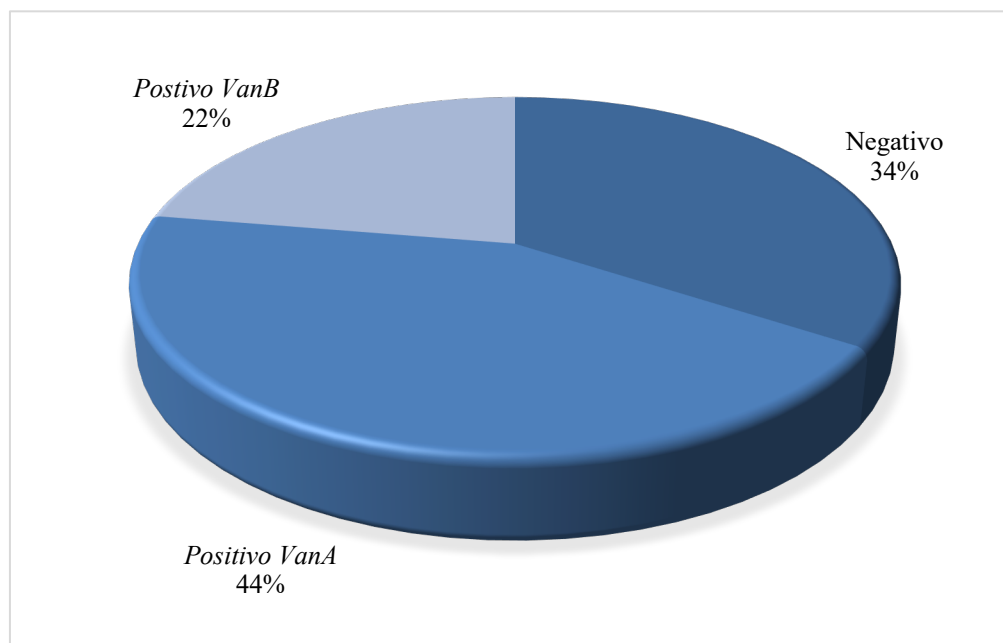


VA: Vancomicina 30ug, **STH:** Estreptomicina 300ug, **GEH:** Gentamicina 120ug, **AMP:** Ampicilina 10ug, **SAM:** Ampicilina/Sulbactam 10/10ug.

4.3. Identificación de genes que confieren resistencia a linezolid y vancomicina.

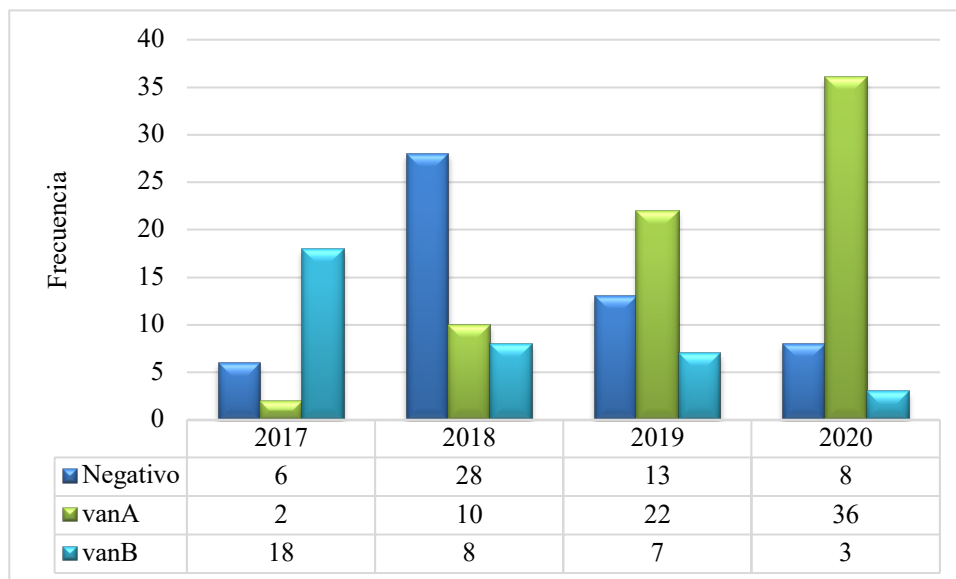
Se identificó que la mayoría de *Enterococcus sp.* resistentes a la vancomicina se debe a la presencia del gen *vanA* (44%) y el 22% presentan el gen *vanB*, además, existe un alto número de microorganismos que dieron negativo tanto para *vanA* y *vanB* (34%), por lo que la resistencia a vancomicina puede tratarse por mutaciones cromosomales **Gráfico Nro.4**. Además, como se evidencia en el **Gráfico Nro.5**, la presencia de los genes *vanA* ha ido aumentando desde el 2017 al 2020, por otro lado, se visualiza que los genes *vanB*, han disminuído así como la resistencia a la vancomicina mediada por mutaciones cromosomales.

Gráfico Nro. 4. Frecuencia de detección de genes que confieren resistencia a la vancomicina



Elaborado por: Katherine Jaramillo

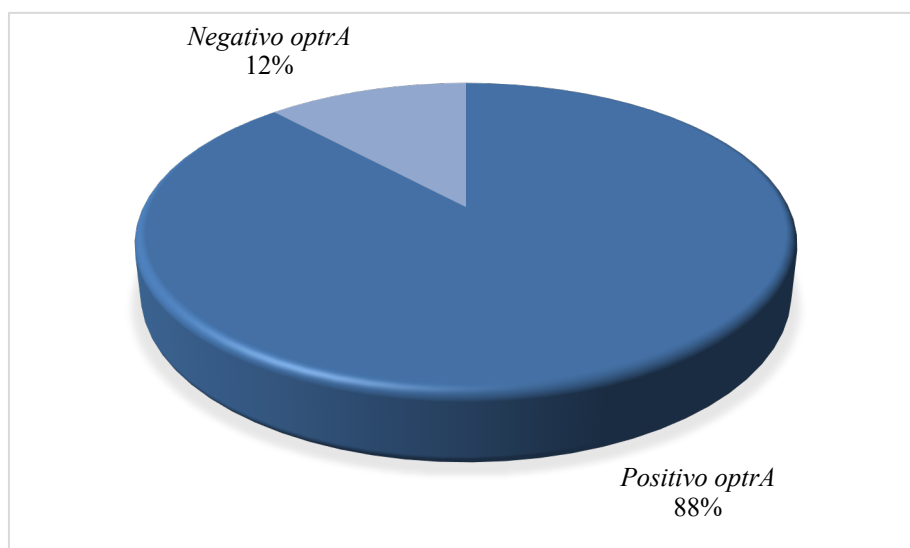
Gráfico Nro. 5. Frecuencia de aislamientos resistentes a la Vancomicina del 2017 al 2020



Elaborado por: Katherine Jaramillo

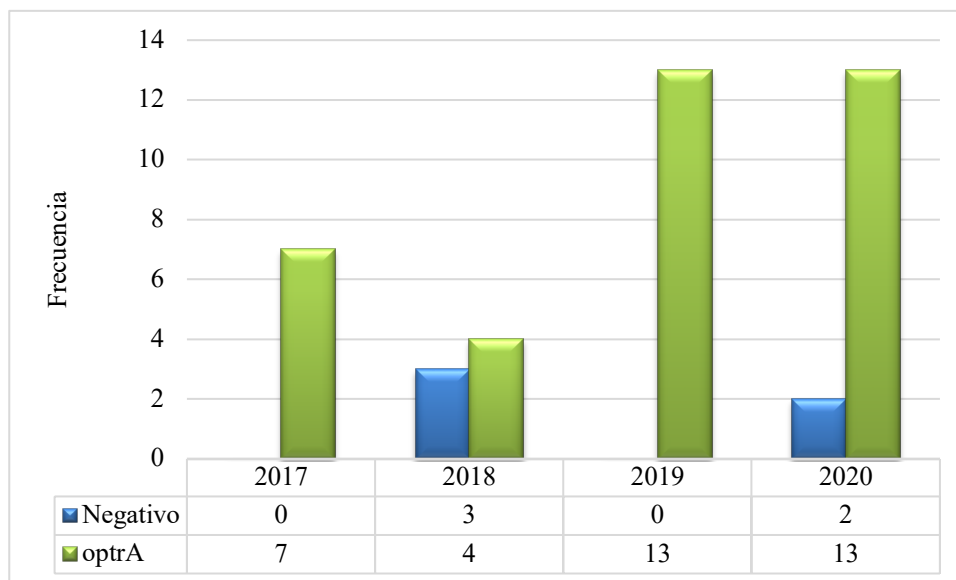
Por otro lado, el 88% de *Enterococcus sp.* fueron resistentes al linezolid debido a la presencia del gen *optrA* (**Gráfico Nro.6**), de los cuales solo un aislamiento se identificó como *E. faecium*. Además, como se evidencia en el **Gráfico Nro.7**, se ha detectado un aumento en la frecuencia del gen *optrA* en 2019 y 2020.

Gráfico Nro. 6. Frecuencia de detección de genes que confieren resistencia a Linezolid



Elaborado por: Katherine Jaramillo

Gráfico Nro. 7. Frecuencia de aislamientos con resistencia al Linezolid del 2017 al 2020.



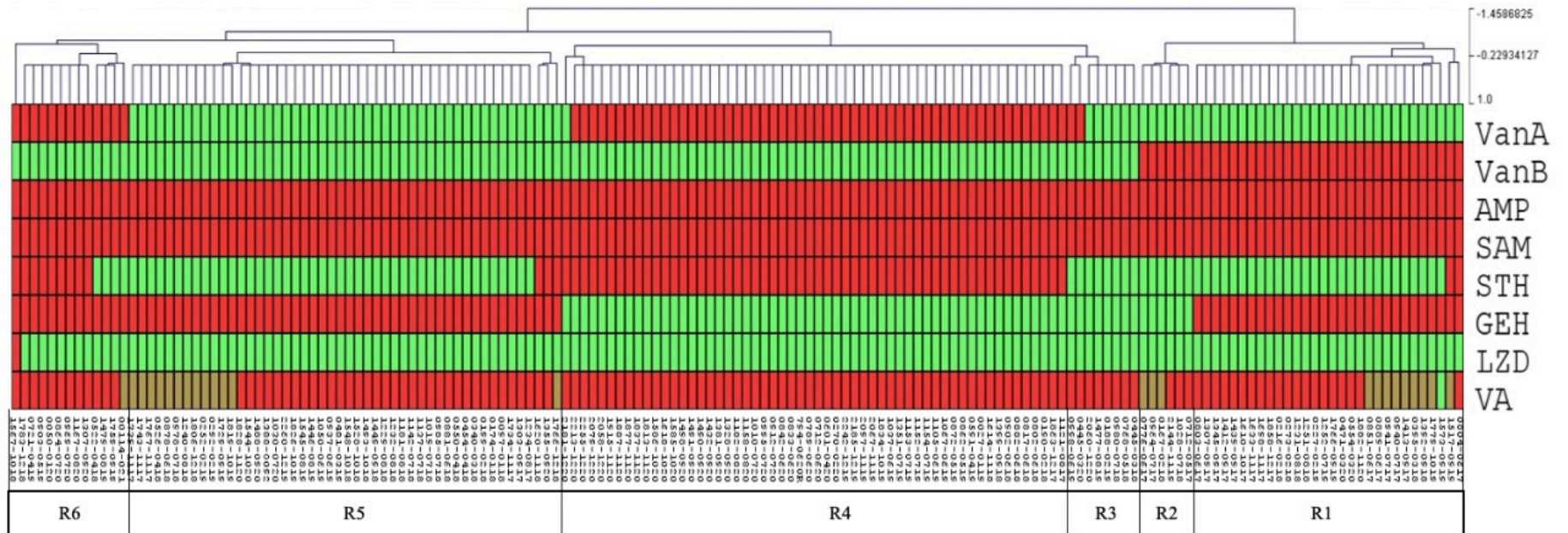
Elaborado por: Katherine Jaramillo

Se realizó un dendograma **Gráfico Nro. 8**, para relacionar la presencia de los genes de resistencia con el perfil de susceptibilidad y otro dendograma para visualizar la relación entre variables epidemiológicas **Gráfico Nro. 9**, identificando 6 ramas en la población de microorganismos que presentan resistencia a la vancomicina, el primero **R1** (n=30) agrupa a microorganismos con la presencia del gen *vanB*, los cuales son resistentes a ampicilina, ampicilina/sulbactam y gentamicina de alta carga, además todos susceptibles a linezolid, llama la atención la presencia de un aislamiento portador del gen *vanB* con sensibilidad a la vancomicina y 8 intermedios a vancomicina, además la mitad de la población de este grupo se aislan en el año 2017 en pacientes hospitalizados; el segundo grupo **R2** (n=6), agrupa a los microorganismos susceptibles a aminoglucósidos de alta carga y linezolid, con la presencia del gen *vanB*; en el tercer grupo **R3** (n=8) se agrupan los microorganismos resistentes a la ampicilina, ampicilina/sulbactam y vancomicina por mutaciones cromosómicas y dos por el gen *vanA*, descritos en el 2018, 2019 y 2020 en pacientes con infecciones del tracto urinario; en el cuarto grupo **R4** (n=56), se identifican aislamientos *vanA* positivos, resistentes a ampicilina, ampicilina/sulbactam, estreptomina de alta carga y vancomicina, de los cuales se describen en

2017, 2018 y 2019 pacientes hospitalizados y 31 aislamientos en el 2020 de pacientes diagnosticados con COVID-19, en su mayoría en unidad de cuidados intensivos de la ciudad de Quito; el quinto grupo **R5** (n=48), describe todos los aislamientos no susceptibles a la vancomicina por mutaciones cromosómicas, además resistencia a ampicilina, ampicilina/sulbactam y gentamicina de alta carga, descritos en todos los años en su mayoría pacientes hospitalizados; por último, el sexto grupo **R6** (n=13) identifica aislamientos con la presencia del gen *vanA*, dejando como opción terapéutica a linezolid, a excepción de un aislamiento de la ciudad de Quito en el 2018, el cual es resistente a todos los antimicrobianos probados en este estudio, se describen 4 aislamientos de pacientes diagnosticados con COVID-19, en el 2020 de la ciudad de Quito y Sto. Domingo.

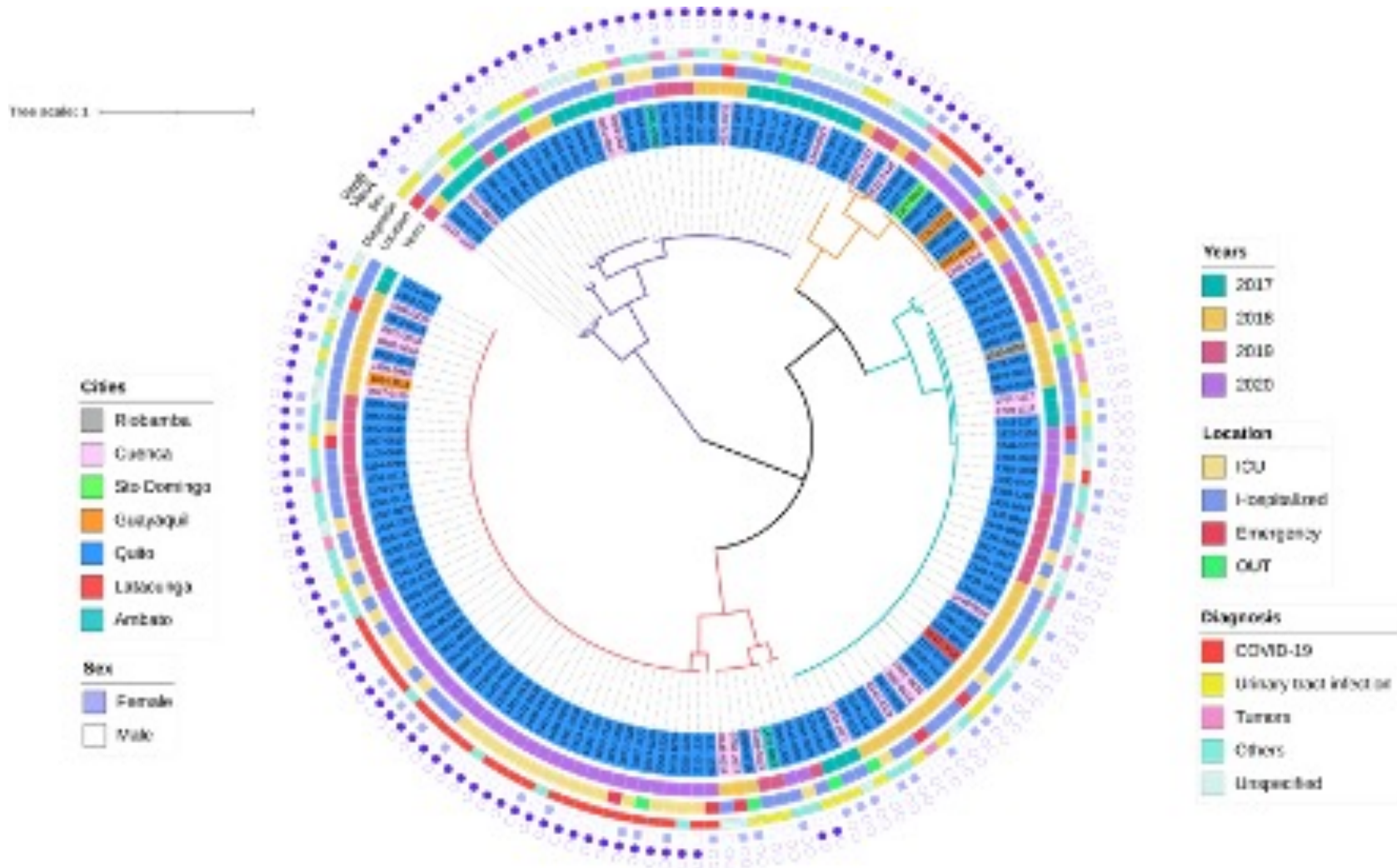
Por otro lado, se realizó el dendograma de linezolid para relacionar el perfil de susceptibilidad con los genes de resistencia **Gráfico Nro.10** y para visualizar de forma más detallada la relación de variables epidemiológicas en los diferentes grupos se analizó el dendograma en la herramienta iTOL **Gráfico Nro.11**, identificando 5 grupos, el primer grupo **R1** (n=1), separa un aislamiento resistente a todos los antimicrobianos probados en este estudio, positivo para el gen *vanA* y negativo para *optrA*; el segundo grupo **R2** (n=4), agrupa a los resistentes a gentamicina de alta carga, aislados de pacientes con infección del tracto urinario y uno con COVID-19; el tercer grupo **R3** (n=21), describe a todos los que presentan resistencia a linezolid por el gen *optrA* y susceptibilidad a los demás antibióticos, descritos en su mayoría en pacientes ambulatorios con infección del tracto urinario; el cuarto grupo **R4** (n=12), agrupa a los aislamientos resistentes a estreptomina de alta carga y linezolid, por la presencia del gen *optrA* a excepción de 2 microorganismos, además se identifica 3 aislamientos de pacientes en el área de unidad de cuidados intensivos con COVID-19 en la ciudad de Cuenca; por último, el quinto grupo **R5** (n=4), describe aislamientos resistentes a aminoglucosidos de alta carga y linezolid de Guayaquil y Cuenca en pacientes ambulatorios y uno en UCI.

Gráfico Nro. 8. Relación de genes de resistencia con perfil de susceptibilidad de población de vancomicina



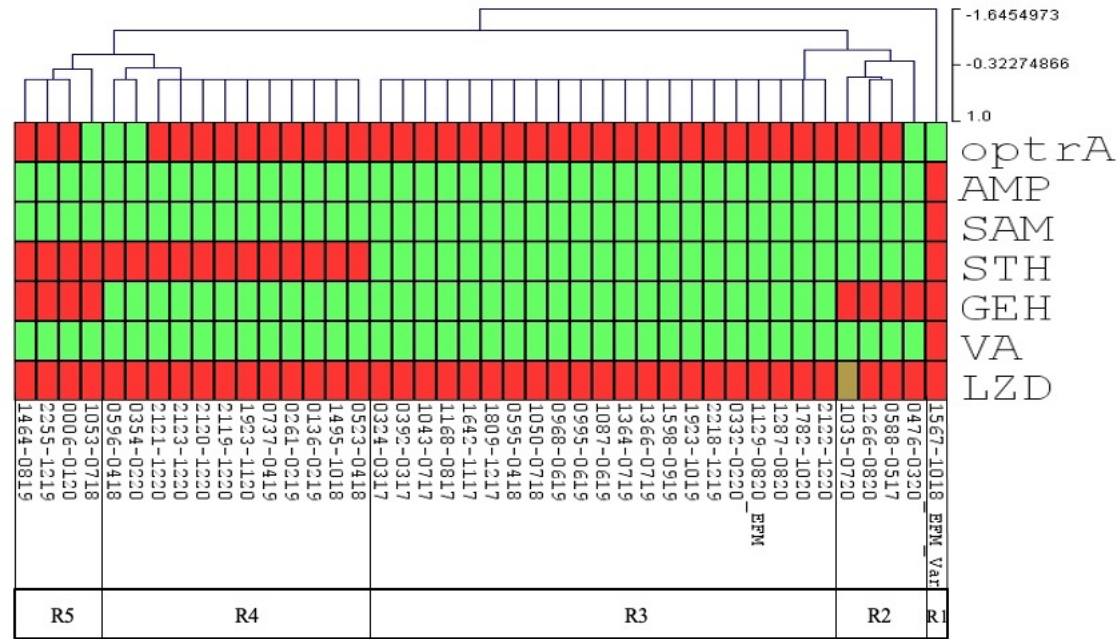
Simbología: ■ Sensible; ■ Intermedio; ■ Resistente; *vanA* y *vanB*: genes que confieren resistencia a vancomicina; AMP: Ampicilina 10µg SAM: Ampicilina/Sulbactam 10/10µg; STH: Estreptomicina 300µg; GEH: Gentamicina 120µg; LZD: Linezolid 10µg; VA: Vancomicina 30µg.

Gráfico Nro. 9 Correlación de variables epidemiológicas fenotípicas y genotípicas en cepas resistentes a vancomicina período 2017-2020.



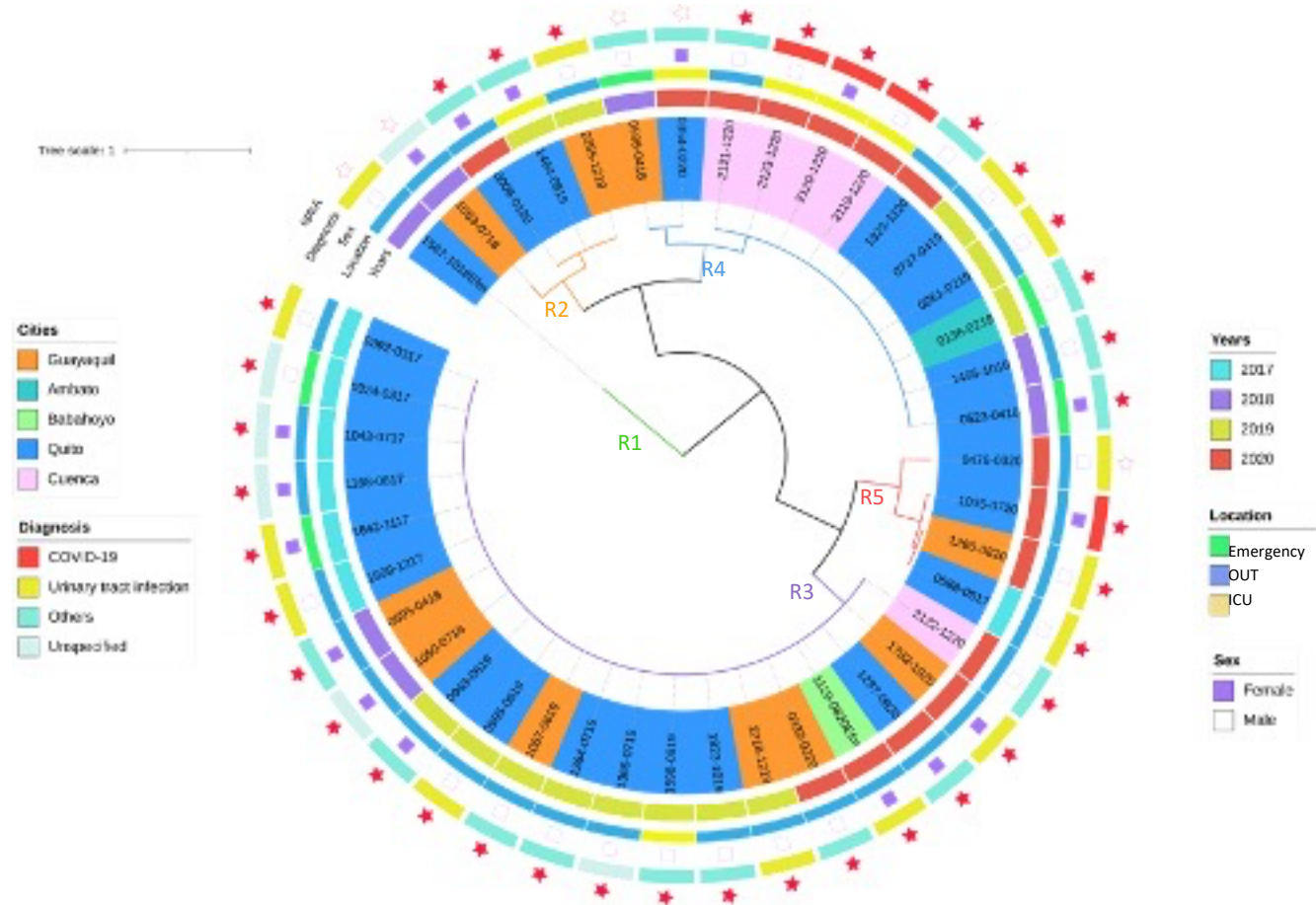
Elaborado por: Katherine Jaramillo

Gráfico Nro. 10. Relación de genes de resistencia con perfil de susceptibilidad de población de Linezolid



Simbología: ■ Sensible; ■ Intermedio; ■ Resistente; *opt rA*: gen que confieren resistencia a Linezolid; AMP: Ampicilina 10 µg; SAM: Ampicilina/Sulbactam 10/10µg; STH: Estreptomicina 300µg; GEH: Gentamicina 120µg; VA: Vancomicina 30µg; LZD: Linezolid 10µg.

Gráfico Nro. 11. Correlación de variables epidemiológicas fenotípicas y genotípicas en cepas resistentes a Linezolid período 2017-2020.



Elaborado por: Katherine Jaramillo

4.4. Sistema informático de georreferenciación

Se utilizó el software QGIS, un sistema de información geográfica gratuito, que permite la visualización, edición y análisis de datos geospaciales, identificando que el mayor número de microorganismos resistentes a la vancomicina se aislaron en la ciudad de Quito, seguido de Cuenca. En el **Gráfico Nro. 12**, se visualiza la distribución de los microorganismos resistentes a la vancomicina en todo el país, identificando que en 7 provincias de la sierra del Ecuador y 2 de la costa, se han aislado estos microorganismos y solo en las ciudades de Quito, Cuenca, Sto Domingo y Guayaquil, se describen aislamientos con la presencia del gen *vanA* (**Gráfico Nro. 13**), por otro lado el gen *vanB*, se describe en Quito, Ambato, Cuenca y Loja. (**Gráfico Nro. 14**).

Gráfico Nro. 12. Presencia de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a la vancomicina en Ecuador, período 2017-2020

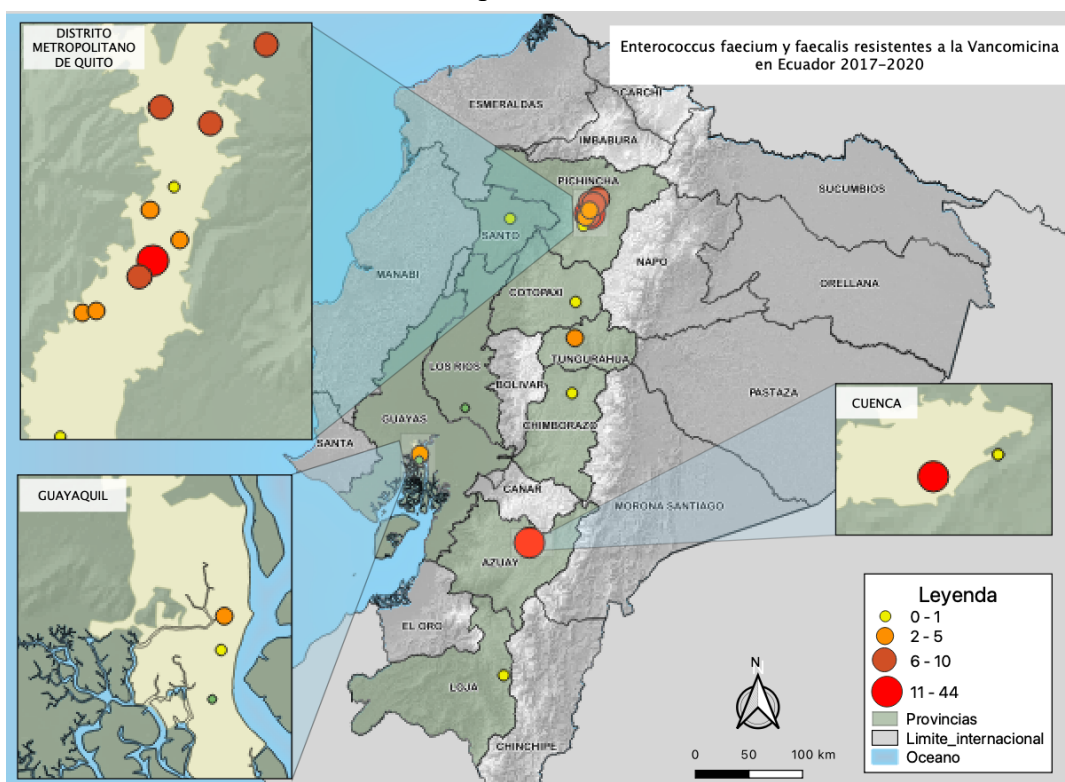


Gráfico Nro. 13. Presencia de genes *vanA* en *E. faecium* y *E. faecalis* en Ecuador, período 2017-2020

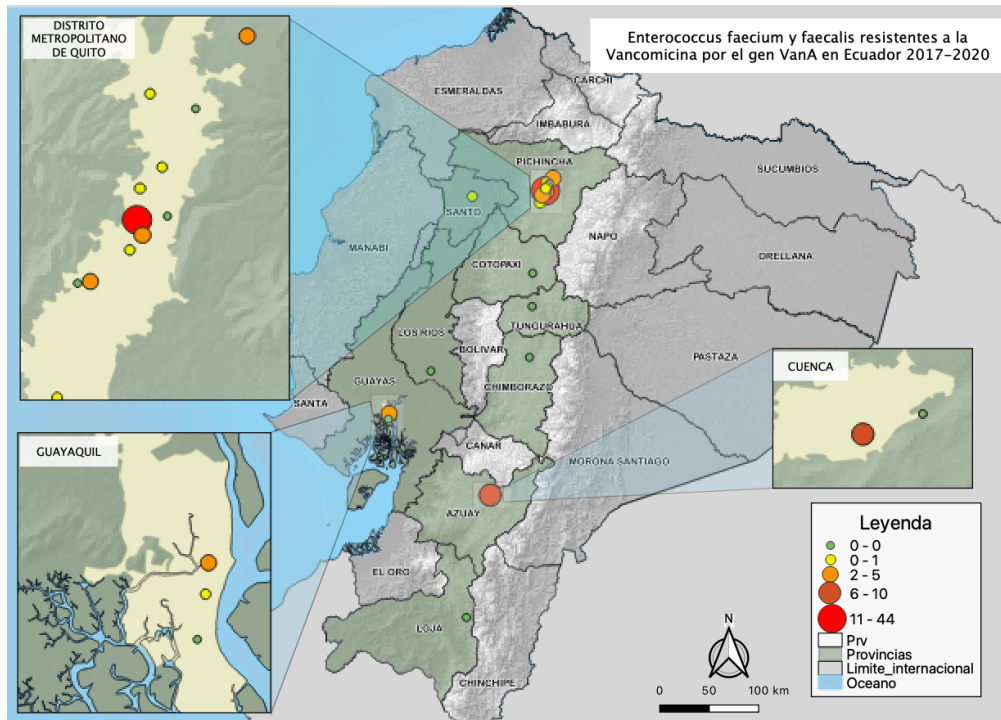
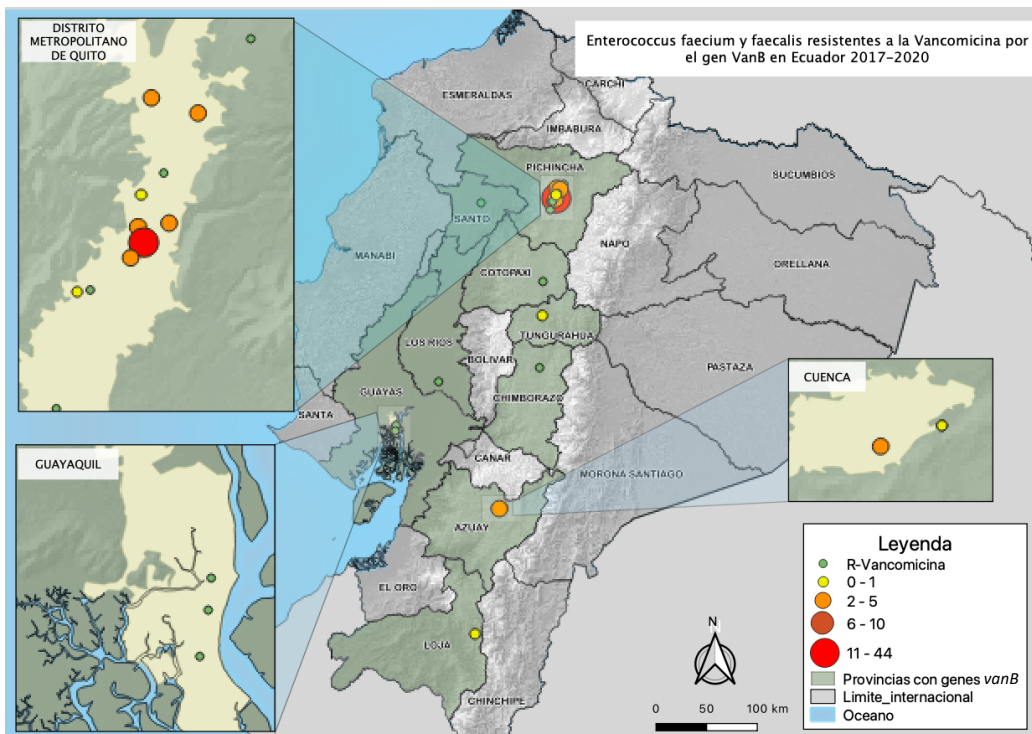


Gráfico Nro. 14. Presencia de genes *vanB* en *E. faecium* y *E. faecalis* en Ecuador, período 2017-2020



Por otro lado, se identificó que el mayor número de microorganismos resistentes a Linezolid se aislaron en la ciudad de Quito, seguido de Guayaquil. En el **Gráfico Nro.15**, se visualiza la distribución de los microorganismos resistentes a Linezolid en todo el país, identificando que en 3 provincias de la sierra del Ecuador y 2 de la costa, se ha identificado estos microorganismos. **Gráfico Nro.16**.

Gráfico Nro. 15. *E. faecalis* y *E. faecium* resistentes a Linezolid

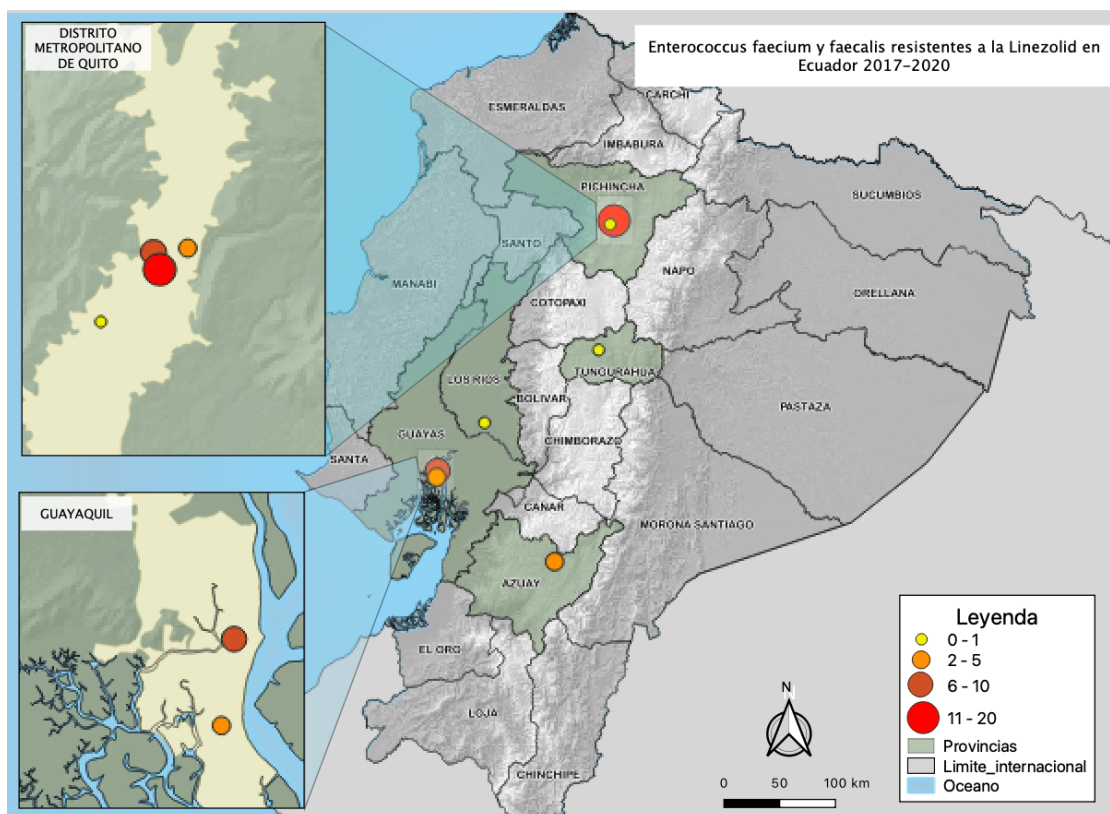
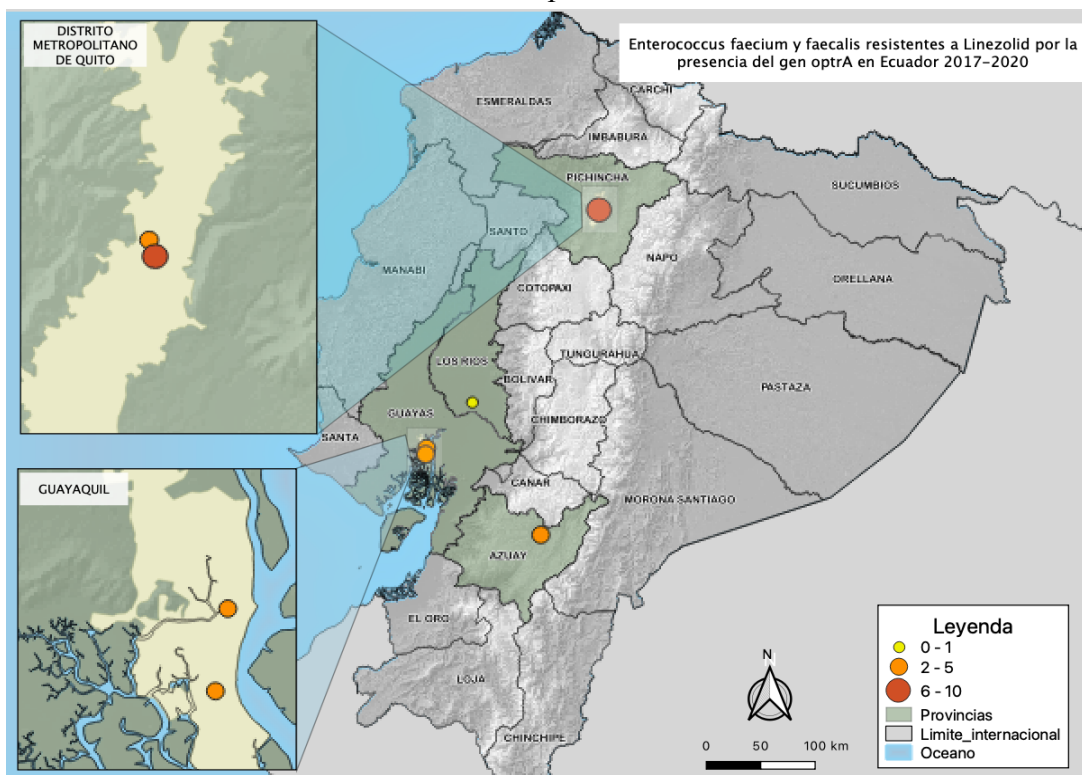


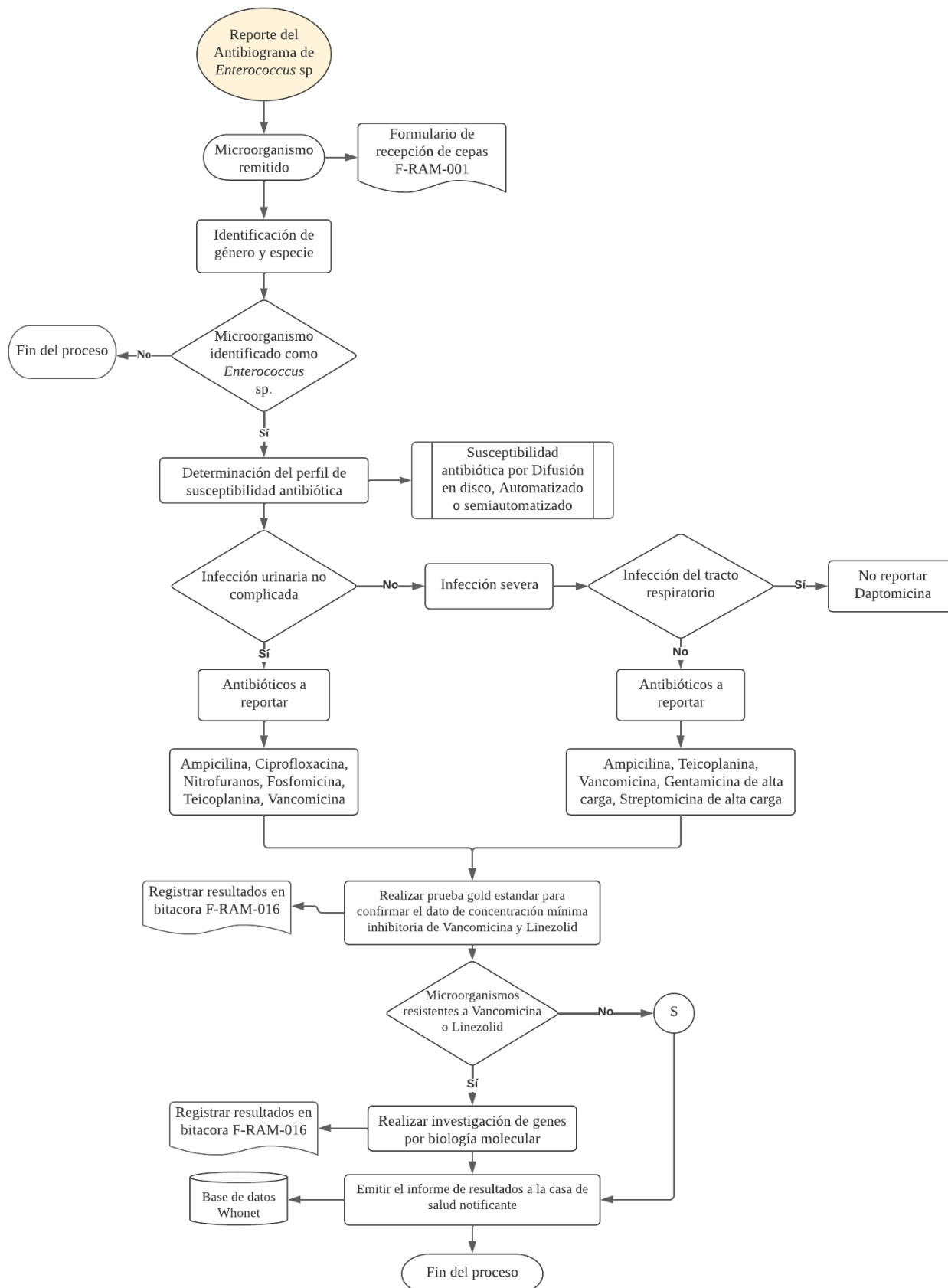
Gráfico Nro. 16. *E. faecalis* y *E. faecium* resistente al Linezolid por la presencia del gen *optrA*



4.5. Algoritmo para la evaluación y reporte adecuado de linezolid y vancomicina en *Enterococcus* sp.

La OMS clasifica a *E. faecium* resistente a la vancomicina como un patógeno de alta prioridad en su lista de prioridad mundial de bacterias resistentes a los antibióticos, debido a la escasez de opciones de tratamiento disponibles y eficaces. Los altos niveles de *Enterococcus* resistentes a los antimicrobianos siguen siendo un desafío importante para el control de infecciones y una causa importante de infecciones asociadas a la atención médica, debido a que se diseminan fácilmente en los entornos sanitarios. Por ello se diseñó un algoritmo para la evaluación y reporte adecuado de linezolid y vancomicina en *Enterococcus* sp, descrito en el **Gráfico Nro.17**.

Gráfico Nro. 17. Flujograma para el reporte del antibiograma en *Enterococcus* sp.



4.6. DISCUSIÓN

En los últimos años la diseminación de bacterias multirresistentes ha ido aumentando a nivel mundial. *Enterococcus sp* es uno de los patógenos oportunistas con alta prioridad para la investigación, siendo así la Organización Mundial de la Salud, ha categorizado a *E. faecium* resistente a la vancomicina como de prioridad Alta (Prioridad 2) (Tacconelli et al., 2017). Las especies que se aíslan con mayor frecuencia en entornos nosocomiales son *E. faecium* y *E. faecalis* (Zhang et al., 2017).

Por lo que, la finalidad de este estudio fue caracterizar el nivel de resistencia a vancomicina y linezolid en las especies descritas. Al analizar las variables epidemiológicas, se identifica que las infecciones asociadas a *Enterococcus sp*. suelen presentarse tanto en adultos y adultos mayores, sin tendencia a un solo género, pero con predominio en el género masculino (55.7%), resultados que se relacionan con el estudio realizado por Medina y otros, el cual refiere que la media de edad de personas que presentan infecciones por *Enterococcus sp*. es de 53.1 años; en cuanto a la variable sexo, registran el 52.6% de aislamientos provenientes del género masculino y 47.4% del género femenino (Medina-Polo et al., 2015).

Además, se identifica que la población de *Enterococcus* resistente es mayor en pacientes hospitalizados (60.6%), que ambulatorios (8.4%), así como lo describe la CDC en el reporte del 2019 (Centers for Disease Control and Prevention, 2019), por lo que esta resistencia se puede atribuir a los tratamientos antimicrobianos prolongados o empíricos durante una estancia hospitalaria.

Para la identificación de la concentración mínima inhibitoria, el método *gold estándar* es la microdilución en caldo para vancomicina. Para la lectura, se requiere realizar la incubación completa de 24 horas (CLSI, 2018); sin embargo, en el estudio de Klare, et al. realizan la lectura a las 48 h, identificando el 100% de sensibilidad para la detección de microorganismos resistentes a la vancomicina. En nuestro estudio se realiza la comparación de la lectura a las 24 h y 48 h, identificando un número mayor de microorganismos resistentes a la vancomicina a las

48 h; la identificación correcta de la CMI, sobre todo en VRE tipo *vanB* suele ser un desafío ya que la presencia de este genotipo no suele otorgar CMI elevadas a vancomicina (Klare et al., 2019).

Los *Enterococcus* tienen resistencia intrínseca a varias clases de antimicrobianos, por lo tanto cualquier resistencia adquirida limita las opciones terapéuticas, en este estudio se identifica un mayor porcentaje de resistencia en el perfil de *E. faecium*, así como lo reporta el estudio de Zhang 2017, por lo que pacientes con infecciones por *E. faecalis*, presentan más probabilidades de obtener un tratamiento eficaz mediante el uso empírico de antibióticos (Zhang et al., 2017).

En este estudio, se reporta resistencia a la vancomicina únicamente en los aislamientos de *E. faecium*; sin embargo, el reporte a nivel nacional en Ecuador, identifica un porcentaje bajo de resistencia a la vancomicina (1.8%) en *E. faecalis*, (Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública CRN-RAM, 2019), además, en países europeos ya se ha reportado resistencia a la vancomicina también en *E. faecalis*, aunque estos niveles permanecen muy bajos (ECDC, 2019). Por otro lado, se describe el 100% de resistencia a ampicilina y ampicilina/sulbactam al tratarse de *E. faecium*, siendo el principal determinante de la susceptibilidad reducida a los antibióticos β -lactámicos la enzima de clase B de baja afinidad PBP5 (Galloway-Peña et al., 2011; Miller et al., 2020); dejando como opción terapéutica a linezolid en esta población.

A nivel genotípico, el gen que confiere resistencia a la vancomicina con mayor frecuencia es *vanA*, el cual está presente en la mayoría de aislamientos VRE de origen humano en todo el mundo y en su mayoría es portado por *E. faecium*, los cuales presentan altas tasas de resistencia ampicilina, gentamicina y estreptomina de alta carga, (O'Driscoll & Crank, 2015), en este estudio se identifica que los microorganismos portadores del gen *vanA* presentan un perfil de resistencia a ampicilina y gentamicina de alta carga. Además, la resistencia a vancomicina ha ido aumentando al pasar los años, como lo reporta el Centro Europeo de Control y prevención de Enfermedades, así como un estudio de Ayobami (Ayobami et al., 2020a; European Centre for Disease Prevention and Control, 2020). En el presente estudio se ha identificado un 44% *vanA*, el cual ha ido incrementando considerablemente su frecuencia del 2017 al 2020, por el

contrario microorganismos con resistencia a la vancomicina debido a mutaciones cromosomales ha ido disminuyendo.

Al determinar la CMI de linezolid por microdilución en caldo, se suele observar un efecto de arrastre en el crecimiento (training), lo que dificulta la lectura del punto final; En estos casos, se debe ignorar el crecimiento de botones muy pequeños, por lo que hay que identificar con cuidado el pocillo que el antibiótico ha sido capaz de inhibir todo el crecimiento bacteriano (CLSI, 2018). De acuerdo a los porcentajes del perfil de susceptibilidad en *Enterococcus* resistentes a linezolid, se describe un 97,6% de sensibilidad a AMP y SAM, al tratarse en su mayor población de *E. faecalis*, en esta especie no es muy común la resistencia a penicilina o ampicilina debido a la producción de β -lactamasas. Además, este mecanismo no suele detectarse de forma fiable con los métodos habituales de disco o dilución, pero se detecta mediante una prueba directa de β -lactamasa basada en nitrocefina; sin embargo, este mecanismo no es muy común, por lo que no es necesario realizar esta prueba de rutina (CLSI, 2022). Además, en Ecuador el reporte a nivel nacional de resistencia a linezolid en *Enterococcus* es aún baja (Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, 2019).

En cuanto a la presencia de genes que confieren resistencia a linezolid, Egan et al. en su estudio publicado el 2020, identifica que la mayoría de *Enterococcus* que presentan el gen *optrA* pertenecen a la especie *E. faecalis* (Egan et al., 2020); así como en nuestro estudio, en el cual se detectó que el 88% presenta el gen *optrA*, observándose un aumento considerable de su frecuencia de detección desde el año 2017 hasta el 2020; por otro lado, los genes *cfr*, *poxtA*, no fueron identificados en los aislamientos estudiados, a diferencia de estudios realizados en países europeos (Egan et al., 2020). Además, un estudio que realiza el análisis de *Enterococcus* aislados en América Latina, reporta la presencia del gen *optrA* en un aislamiento susceptible a linezolid en un genoma de Colombia, también identificaron *cfrB*, en un aislado Mexicano (Rios et al., 2020).

Los *Enterococcus* tienen resistencia intrínseca a varias clases de antimicrobianos y cualquier resistencia adquirida adicional limita las opciones terapéuticas; en este estudio se identifica un mayor porcentaje de resistencia en los perfiles de *E. faecium*, así como lo reportan otros estudios,

por lo que pacientes con infecciones por *E. faecalis*, presentan más probabilidades de obtener un tratamiento eficaz mediante el uso empírico de antibióticos (O'Driscoll & Crank, 2015; Zhang et al., 2017).

El tratamiento combinado con ampicilina, penicilina o vancomicina (solo para cepas susceptibles), más un aminoglucósido está indicado para las infecciones enterocócicas graves, como la endocarditis; a menos que se evidencie un alto nivel de resistencia, tanto a la gentamicina como a la estreptomina. Se predice que tales combinaciones darán como resultado la destrucción sinérgica de *Enterococcus* para las cepas con un bajo nivel de resistencia a la penicilina o a la ampicilina cuando se considera la terapia combinada con un β -lactámico (CLSI, 2022)

CAPITULO V

5.1.CONCLUSIONES

- Se implementó la técnica de microdilución en caldo de vancomicina y linezolid, siendo el método “*gold standar*” para identificar la concentración mínima inhibitoria, obteniendo que la resistencia a vancomicina se detecta principalmente en aislados de *E. faecium*, en pacientes hospitalizados y un elevado porcentaje de resistencia a linezolid en *E. faecalis*, en pacientes ambulatorios aislados en unidades de salud del país.
- Se estandarizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa permitiendo identificar que el 88% de la resistencia a linezolid se debe a la presencia del gen *optrA*, por otro lado, la resistencia a vancomicina se debe a la presencia del gen *vanA* en un 44% y al gen *vanB* en un 22%.
- Se implementó un sistema informático de georeferenciación para *E. faecalis* y *E. faecium* resistentes a vancomicina y linezolid, logrando evidenciar que la presencia de estos microorganismos se encuentra distribuidos en diversas provincias de la sierra y costa del Ecuador.
- Se elaboró el algoritmo para la evaluación y reporte de vancomicina y linezolid en *Enterococcus* sp., lo que permitirá guiar al personal de microbiología para un reporte adecuado, según el aislamiento y tipo de muestra receptado.

5.2. RECOMENDACIONES

- Los hallazgos de este estudio tienen implicaciones para la atención al paciente y justifican la necesidad de analizar los datos disponibles con mayor eficacia a nivel de país, además de identificar las unidades de salud o localidades con alta frecuencia de *Enterococcus spp.* resistentes a vancomicina y linezolid, con el fin de instaurar políticas nacionales, para regular el uso de estos antimicrobianos.
- Continuar con el desarrollo investigaciones para el diagnóstico, administración y vigilancia de antimicrobianos de último recurso, para el control de las infecciones nosocomiales por *Enterococcus sp.*
- Implementar el algoritmo elaborado en esta investigación, en los laboratorios de microbiología.
- Proponer nuevas investigaciones donde se aborden estrategias educativas, para capacitar a la población sobre normas de bioseguridad.
- Se recomienda ampliar el alcance de este estudio a nivel comunitario, con el fin de vigilar la distribución de los genes de resistencia a vancomicina y linezolid, en la comunidad así como en muestras de animales de corral descritos en la bibliografía, para englobar estudio dentro de la iniciativa “Una Sola Salud” (*One Health*).
- Por último, ampliar el alcance de este estudio a nivel genómico para identificar las secuencias tipo circulantes en el país y los plásmidos que están transmitiendo la resistencia a la vancomicina y linezolid.

5.3. BIBLIOGRAFÍA

- Akpaka, P. E., Kissoon, S., & Jayaratne, P. (2016). Molecular Analysis of Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated from Regional Hospitals in Trinidad and Tobago. *Advance Un Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2016/8762691>
- Álvarez-Artero, E., Campo-Nuñez, A., García-García, I., García-Bravo, M., Cores-Calvo, O., Galindo-Pérez, I., Pendones-Ulerio, J., López-Bernus, A., Belhassen-García, M., & Pardo-Lledías, J. (2021). Urinary tract infection caused by Enterococcus spp.: risk factors and mortality. An observational study. *Revista Clinica Espanola*. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2020.09.005>
- Antimicrobial Resistance Fighter Coalition. (2020). *AMR: Combat Antimicrobial Resistance*. <https://antimicrobialresistancefighters.org/>
- Ayobami, O., Willrich, N., Reuss, A., Eckmanns, T., & Markwart, R. (2020a). The ongoing challenge of vancomycin-resistant Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis in Europe: an epidemiological analysis of bloodstream infections. *Emerging Microbes & Infections*, 9, 1180–1193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1769500>
- Bender, J. K., Fleige, C., Klare, I., & Werner, G. (2019). Development of a multiplex-PCR to simultaneously detect acquired linezolid resistance genes cfr, oprA and poxtA in enterococci of clinical origin. *Journal of Microbiological Methods*, 160, 101–103. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.03.025>
- Brenciani, A., Morroni, G., Vincenzi, C., Manso, E., Mingoia, M., Giovanetti, E., & Varaldo, P. E. (2016). Detection in Italy of two clinical Enterococcus faecium isolates carrying both the oxazolidinone and phenicol resistance gene oprA and a silent multiresistance gene cfr. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71, 1118–1119. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv438>
- Cavaco, L. M., Bernal, J. F., Zankari, E., Léon, M., Hendriksen, R. S., Perez-Gutierrez, E., Aarestrup, F. M., & Donado-Godoy, P. (2017). Detection of linezolid resistance due to the oprA gene in Enterococcus faecalis from poultry meat from the American continent (Colombia). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(3), 678–683. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw490>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019* (pp. 95–96). Department of Health and Human Services, CDC. www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html.
- Changhua, C., Chen, C.-H., Lin, L.-C., Chang, Y.-J., & Chang, C.-Y. (2016). Mortality analysis of Enterococcus faecium bloodstream infection in central Taiwan. *Revista Chilena de Infectologia*, 33(4), 395–402. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v33n4/art04.pdf>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). *M100 - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (30th ed). <http://em100.edaptivedocs.net/dashboard.aspx>
- CLSI. (2018). *M07 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically* (11th Editi, Vol. 38, Issue 2). www.clsi.org

- CLSI. (2022). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100* (Edaptive Technologies LLC (ed.); 31st ed.). <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI M100 ED31:2021&scope=user>
- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3903–3910. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
- Dejoies, L., Boukthir, S., de Ponfilly, G. P., Le Guen, R., Zouari, A., Potrel, S., Collet, A., Auger, G., Jacquier, H., Fihman, V., Dortet, L., & Cattoir, V. (2020). Performance of commercial methods for linezolid susceptibility testing of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(9), 2587–2593. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa180>
- Domig, K. J., Mayer, H. K., & Kneifel, W. (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. - 2. Pheno- and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2–3), 165–188. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00178-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00178-8)
- ECDC. (2019). *Surveillance Atlas of Infectious Diseases*. <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
- Egan, S. A., Shore, A. C., O’Connell, B., Brennan, G. I., & Coleman, D. C. (2020). Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from hospitalized patients in Ireland: High prevalence of the MDR genes *optrA* and *poxtA* in isolates with diverse genetic backgrounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(7), 1704–1711. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA075>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2020). Annual Epidemiological Report for 2019. In *Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net)*.
- Galloway-Peña, J. R., Rice, L. B., & Murray, B. E. (2011). Analysis of PBP5 of early U.S. isolates of *Enterococcus faecium*: Sequence variation alone does not explain increasing ampicillin resistance over time. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3272–3277. <https://doi.org/10.1128/AAC.00099-11>
- García-Solache, M., & Rice, L. B. (2019). The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), 1–28. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>
- Guzman Prieto, A. M., van Schaik, W., Rogers, M. R. C., Coque, T. M., Baquero, F., Corander, J., & Willems, R. J. L. (2016). Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: Attack of the clones? *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00788>
- Instituto Nacional de Investigacion en Salud Publica CRN-RAM. (2019). *Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana 2019 Red de resistencia a los antimicrobianos “ Red Whonet Ecuador .”* <http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ram/wp-content/uploads/2020/10/PERFILES-SUSCEPTIBILIDAD-2019.pdf>
- Jabbari Shiadeh, S. M., Pormohammad, A., Hashemi, A., & Lak, P. (2019). Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: a systematic review and meta-analysis. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2713–2725. <https://doi.org/10.2147/IDR.S206084>

- Kehrenberg, C., & Schwarz, S. (2006). Distribution of Florfenicol Resistance Genes *fexA* and *cfr* among Chloramphenicol-Resistant Staphylococcus Isolates. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 50(4), 1156–1163. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1156-1163.2006>
- Klare, I., Bender, J. K., Fleige, C., Kriebel, N., Hamprecht, A., Gatermann, S., & Werner, G. (2019). Comparison of VITEK2, three different gradient strip tests and broth microdilution for detecting vanB-positive Enterococcus faecium isolates with low vancomycin MICs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(10), 2926–2929. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz310>
- Kuo, C.-F., Lio, C. F., Chen, H.-T., Wang, Y.-T. T., Ma, K. S.-K., Chou, Y. T., Chang, F.-C., & Tsai, S.-Y. (2020). Discordance of vancomycin minimum inhibitory concentration for methicillin-resistant Staphylococcus aureus at 2 µg/mL between Vitek II, E-test, and Broth Microdilution. *PeerJ*, 8(3). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.8963>
- Lee, B. J., Vu, B. N., Seddon, A. N., Hodgson, H. A., & Wang, S. K. (2020). Treatment Considerations for CNS Infections Caused by Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium: A Focused Review of Linezolid and Daptomycin. *Annals of Pharmacotherapy*, 54(12), 1243–1251. <https://doi.org/10.1177/1060028020932513>
- Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W256–W259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>
- Medina-Polo, J., Guerrero-Ramos, F., Pérez-Cadavid, S., Arrébola-Pajares, A., Sopenña-Sutil, R., Benítez-Sala, R., Jiménez-Alcaide, E., García-González, L., Alonso-Isa, M., Lara-Isla, A., Passas-Martínez, J. B., & Tejido-Sánchez. (2015). Infecciones urinarias adquiridas en la comunidad que requieren hospitalización: factores de riesgo, características microbiológicas y resistencia a antibióticos. *Actas Urológicas Españolas*, 39(2), 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2014.08.001>
- Miller, W. R., Murray, B. E., Rice, L. B., & Arias, C. A. (2020). Resistance in Vancomycin-Resistant Enterococci. *Infectious Disease Clinics of North America*, 34(4), 751–771. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2020.08.004>
- Ministerio De Salud Pública del Ecuador. (2019). *Alerta Epidemiológica-Enterococcus faecalis resistente a linezolid por la presencia del gen optrA* (p. 2). http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ram/wp-content/uploads/2019/09/Alerta_Enterococcus_faecalis_optrA.pdf
- Murray, B. (1990). The life and times of the Enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(1), 46–65. <https://doi.org/10.1128/CMR.3.1.46>
- Murray, B. E., & Arias, C. A. (2008). Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6(5), 637–655. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.5.637>
- O'Driscoll, T., & Crank, C. W. (2015). Vancomycin-resistant enterococcal infections: Epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and Drug Resistance*, 8, 217–230. <https://doi.org/10.2147/IDR.S54125>

- O'Neill, J. (2014). *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*.
- Prematunge, C., Macdougall, C., Johnstone, J., Adomako, K., Lam, F., Robertson, J., & Garber, G. (2016). VRE and VSE Bacteremia Outcomes in the Era of Effective VRE Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 27(1), 26–35. <https://doi.org/10.1017/ice.2015.228>
- Rios, R., Reyes, J., Carvajal, L. P., Rincon, S., Panesso, D., Echeverri, A. M., Dinh, A., Kolokotronis, S.-O., Narechania, A., Tran, T. T., Munita, J. M., Murray, B. E., Planet, P. J., Arias, C. A., & Diaz, L. (2020). Genomic Epidemiology of Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium (VREfm) in Latin America: Revisiting The Global VRE Population Structure. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-62371-7>
- Taconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Kattula, D., & Burkert, F. (2017). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
- Thiercelin, M. (1899). Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. *C R Soc Biol*, 51, 269–271.
- Van Hal, S. J., Willems, R. J. L., Gouliouris, T., Ballard, S. A., Coque, T. M., Hammerum, A. M., Hegstad, K., Westh, H. T., Howden, B. P., Malhotra-Kumar, S., Werner, G., Yanagihara, K., Earl, A. M., Raven, K. E., Corander, J., & Bowden, R. (2021). The global dissemination of hospital clones of Enterococcus faecium. *Genome Medicine*, 13(52). <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00868-0>
- WHO. (2017). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. <https://doi.org/10.1590/S0100-15742013000100018>
- Zaheer, R., Cook, S. R., Barbieri, R., Goji, N., Cameron, A., Petkau, A., Polo, R. O., Tymensen, L., Stamm, C., Song, J., Hannon, S., Jones, T., Church, D., Booker, C. W., Amoako, K., Van Domselaar, G., Read, R. R., & McAllister, T. A. (2020). Surveillance of Enterococcus spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61002-5>
- Zhang, Y., Du, M., Chang, Y., Chen, L., & Zhang, Q. (2017). Incidence, clinical characteristics, and outcomes of nosocomial Enterococcus spp. bloodstream infections in a tertiary-care hospital in Beijing, China: a four-year retrospective study. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/S13756-017-0231-Y>

5.4. ANEXOS

Anexo Nro. 1. Operacionalización de variables

OBJETIVO GENERAL: Caracterizar la resistencia a Linezolid y Vancomicina mediada por plásmidos en *E. faecalis* y *E. faecium* aislados en el INSPI-Quito, período 2017-2020.

	VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO DE VARIABLE	DIMENSIÓN	ESCALA	INDICADOR	INSTRUMENTO
DEPENDIENTE	Cepas de Enterococcus resistentes a la vancomicina	Cepas que presenten un valor de CMI a vancomicina ≥ 32	Cualitativa Nominal	Interpretación del antibiograma	Sensible: ≤ 4 Intermedio: 8-16 Resistente: ≥ 32	% de Enterococcus resistentes a vancomicina / Total de Enterococcus	Antibiograma
	Cepas de Enterococcus resistentes a Linezolid	Cepas que presenten un valor de CMI a Linezolid ≥ 8	Cualitativa Nominal	Interpretación del antibiograma	Sensible: ≤ 2 Intermedio: 4 Resistente: ≥ 8	% de Enterococcus resistentes al Linezolid / Total de Enterococcus	Antibiograma
	VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO DE VARIABLE	DIMENSIÓN	ESCALA	INDICADOR	INSTRUMENTO
INDEPENDIENTE	Provincia de la Unidad de Salud	Localización de la Unidad de salud que derivó el aislamiento y derivó al INSPI	Cualitativa Nominal	Localidad	Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Azuay, Guayas, Sto. Domingo, Chimborazo	Nro.de cepas aisladas en cada provincia / Total de cepas	Software Whonet
	Sexo	Características sexuales que se atribuye a los seres humanos que distinguen entre hombre y mujer	Cualitativa Nominal	Diferenciación entre masculino o femenino	m: masculino f: femenino	Frecuencia Relativa %	Software Whonet
	Edad	Periodo en el que transcurre la vida de un ser vivo	Cuantitativa	años	Lactantes (0-1 años) Infancia (6-11 años) Niños y Adolescentes 2-18 años Adultos (19-59 años) Adulto Mayor (60 años o mas) envejecimiento y vejez (Ayobami et al., 2020b)	Rango	Software Whonet

OBJETIVO GENERAL: Caracterizar la resistencia a Linezolid y Vancomicina mediada por plásmidos en *E. faecalis* y *E. faecium* aislados en el INSPI-Quito, período 2017-2020.

	VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO DE VARIABLE	DIMENSIÓN	ESCALA	INDICADOR	INSTRUMENTO
DEPENDIENTE	Cepas de Enterococcus resistentes a la vancomicina	Cepas que presenten un valor de CMI a vancomicina ≥ 32	Cualitativa Nominal	Interpretación del antibiograma	Sensible: ≤ 4 Intermedio: 8-16 Resistente: ≥ 32	% de Enterococcus resistentes a vancomicina / Total de Enterococcus	Antibiograma
	Cepas de Enterococcus resistentes a Linezolid	Cepas que presenten un valor de CMI a Linezolid ≥ 8	Cualitativa Nominal	Interpretación del antibiograma	Sensible: ≤ 2 Intermedio: 4 Resistente: ≥ 8	% de Enterococcus resistentes al Linezolid / Total de Enterococcus	Antibiograma
	Tipo de servicio hospitalario	Unidad del hospital en la que el paciente es atendido	Cualitativa	Servicio Hospitalario	Unidad de Ciudados Intensivos = 1 Emergencia = 2 Consulta externa = 3 Hospitalizado = 4	Frecuencia de pacientes por servicio hospitalario	Software Whonet
	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de vancomicina	La concentración más baja (en $\mu\text{g/ml}$) de un vancomicina que inhibe el crecimiento bacterino	Cuantitativa Discreta	$\mu\text{g/mL}$	$\leq 1, 2, 4, 8, 16, 32, \geq 64$	Frecuencia de aislamientos resistentes	Antibiograma
	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de Linezolid	La concentración más baja (en $\mu\text{g/ml}$) de Linezolid que inhibe el crecimiento bacterino	Cuantitativa Discreta	$\mu\text{g/mL}$	$\leq 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, \geq 32$	Frecuencia de aislamientos resistentes	Antibiograma
	Genes que confieren resistencia a la vancomicina	Fragmento de ADN que codifica para proteínas que alteran la pared celular, para conferir resistencia a vancomicina	Cualitativa Nominal	Presencia o Ausencia	vanA: Positivo, Negativo vanB: Positivo, Negativo	Frecuencia de genes que confieren resistencia a vancomicina	Termociclador
	Genes que confieren resistencia al Linezolid	Fragmento de ADN que modifica la diana ribosómica del linezolid, para conferir resistencia al mismo	Cualitativa Nominal	Presencia o Ausencia	cfr: Positivo, Negativo optrA: Positivo, Negativo poxA: Positivo, Negativo	Frecuencia de genes que confieren resistencia a Linezolid	Termociclador

Anexo Nro. 2. Autorización de la Universidad Técnica de Ambato



Resolución Nro. UTA-UTP-FCS-2020-0431

Ambato, 17 de diciembre de 2020

UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO

La Unidad Académica de Titulación de Posgrado de la Facultad Ciencias de la Salud en sesión ordinaria efectuada el 10 de diciembre de 2020, mediante conferencia remota, para la cual se utilizó la herramienta Zoom; vista y analizada la comunicación s/n, suscrito por la maestrante, JARAMILLO RUALES EVELYN KATHERINE, estudiante de la MAESTRÍA EN LABORATORIO CLÍNICO MENCIÓN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA, COHORTE 2019, donde solicita designación de director y la aprobación del tema “**CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A LINEZOLID Y VANCOMICINA MEDIADA POR PLÁSMIDOS EN ENTEROCOCCUS FAECALIS Y ENTEROCOCCUS FAECIUM**”.

RESUELVE:

- **APROBAR** el Trabajo de Titulación con el tema: “**CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A LINEZOLID Y VANCOMICINA MEDIADA POR PLÁSMIDOS EN ENTEROCOCCUS FAECALIS Y ENTEROCOCCUS FAECIUM**”, modalidad Proyecto de Desarrollo, presentado por la maestrante JARAMILLO RUALES EVELYN KATHERINE, estudiante de la MAESTRÍA EN LABORATORIO CLÍNICO MENCIÓN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA, COHORTE 2019.
- **DESIGNAR** al QUÍMICO PHD. WILLIAM RICARDO CALERO CÁCERES, como director del Plan de Trabajo de Titulación.
- **INDICAR** que el programa de posgrado MAESTRÍA EN LABORATORIO CLÍNICO MENCIÓN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA, COHORTE 2019, inició sus actividades académicas el 31 de octubre del 2019 y finaliza el 15 de enero del 2022, por lo que, la estudiante en mención se encuentra habilitada dentro del tiempo establecido para su titulación.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
UNIDAD ACADÉMICA DE
TITULACIÓN DE POSGRADO
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

Resolución Nro. UTA-UTP-FCS-2020-0431

Ambato, 17 de diciembre de 2020

Documento firmado electrónicamente

Dr. Jesús Onorato Chicaiza Tayupanta
PRESIDENTE UNIDAD ACADÉMICA DE TITULACIÓN DE POSGRADO - FCS

Anexos:

- jaramillo-evelyn-inf-evaluación_y_aprobación.pdf

gm



Firmado electrónicamente por:
JESUS ONORATO CHICAIZA TAYUPANTA

DR. GALO NARANJO LÓPEZ, PH.D
RECTOR

Dirección: Av. Colombia y Chile
Teléfono: (+593) 3730268
Ambato - Ecuador

www.uta.edu.ec

2/2

Anexo Nro. 3. Autorización por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI)

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN
EN SALUD PÚBLICA INSPI - DR. LEOPOLDO IZQUIETA PÉREZ

DIRECCIÓN EJECUTIVA

Memorando Nro. INSPI-DE-2021-0362-M

Guayaquil, 03 de mayo de 2021

PARA: Srta. BQC. Evelyn Katherine Jaramillo Ruales
Analista Técnico del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos

ASUNTO: Aprobación de asesoría en ejecución de tesis de maestría con base en líneas de investigación en salud pública (código 00PC-0BFAPU) - Evelyn Katherine Jaramillo Ruales (C.C.: 1003639844)

De mi consideración:

Reciba un cordial saludo de quienes conformamos el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI).

En respuesta a la solicitud código **00PC-0BFAPU** ingresada a la Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación el 05 de abril de 2021 a través del Portal Único de Trámites Ciudadanos (www.gob.ec) por **Evelyn Katherine Jaramillo Ruales (C.C.: 1003639844)**, estudiante de la Maestría en Laboratorio Clínico mención Microbiología Clínica, Facultad Ciencias de la Salud – Universidad Técnica de Ambato, en la cual nos manifestó su voluntad de obtener asesoría en tesis de maestría con base a líneas de investigación en salud pública para el desarrollo de la tesis "*Caracterización de la resistencia a linezolid y vancomicina mediada por plásmidos en Enterococcus Faecalis y Enterococcus Faecium*", **me es grato comunicar que nuestra institución aprueba la petición.**

La fecha prevista para el inicio de la asesoría es el lunes 10 de mayo de 2021; estará a cargo del Ing. Fernando Villavicencio - Responsable del Centro Nacional de Referencia de Resistencia a los Antimicrobianos, quien la asesorará en los procesos técnicos y administrativos durante los meses que desarrolle sus actividades en el INSPI. **Es necesario indicar que los reactivos, materiales e insumos que requiera el desarrollo de la tesis, deberán ser provistos por la tesista, no son proporcionados por el INSPI.**

La tesista deberá leer los documentos anexos y obtener las firmas necesarias en la documentación. Posteriormente, hasta setenta y dos (72) horas previo al inicio de la asesoría, deberá enviar los documentos firmados a investigacion@inspi.gob.ec En caso que no se utilizaran firmas electrónicas, deberá entregar los documentos físicos en la Gestión Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación en la Coordinación Zonal 9 (Iquique N14-285 y Yaguachi, Barrio "El Dorado").

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Documento firmado electrónicamente

QF. Denis Fabricio Logroño Tello, Mgs.
DIRECTOR EJECUTIVO INSPI.

Referencias:
- INSPI-CZ9-CRNRAM-2021-0025-M


Dirección: Av. Julian Coronel 905 entre Esmeraldas y José Mascolo.
Código postal: 090150 / Guayaquil - Ecuador
Teléfono: 593-2-2288096 - 2281200 - 2282281 - 2399533
Fax: 593-04-2239189
www.investigacioninspi.gob.ec - www.inspi.gob.ec

* Documento firmado electrónicamente por Qupux



1/2

Anexo Nro.4 Acuerdo de entendimiento con el INSPI

	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	10-06-2019

Intervienen en la celebración, por una parte, el **INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION EN SALUD PÚBLICA, INSPI – “DR. LEOPOLDO IZQUIETA PÉREZ”**, en lo sucesivo denominado “INSPI”, representado por el/la **ING. FERNANDO XAVIER VILLAVICENCIO ZAMBRANO**, en su carácter de **ASESOR** y, por la otra parte, la **B.Q. EVELYN KATHERINE JARAMILLO RUALES** estudiante de la **UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**, en lo sucesivo denominadas “**TESISTA**”, declarando que es su voluntad, suscribir el presente documento al tenor de las siguientes cláusulas:

PRIMERA. ANTECEDENTES

El Reglamento General al Código Orgánico de la Economía Social de los conocimientos, creatividad e innovación, en el Artículo 13: “Los institutos públicos de investigación deberán trabajar en proyectos de investigación con los diferentes actores, gestores y generadores del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, entidades internacionales y en particular con las instituciones de educación superior con el propósito de circular los conocimientos y tecnologías así como desarrollarlos de manera colaborativa y responsable”.


Los y las investigadores de los institutos públicos de investigación podrán ser tutores de trabajos de titulación de los estudiantes de las instituciones de educación superior.

Las instituciones de educación superior podrán desarrollar investigación y desarrollo tecnológico en los institutos públicos de investigación.

Los resultados de las investigaciones de los institutos públicos de investigación podrán articularse con las oficinas de transferencia tecnológica de las instituciones de educación superior, a través de sus propias unidades de gestión de la innovación”.

Según el Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, Artículo 24.- Institutos públicos de investigación.- Los institutos públicos de investigación son entidades con autonomía administrativa y financiera los cuales tienen por objeto planificar, promover, coordinar, ejecutar e impulsar procesos de investigación científica, la generación, innovación, validación, difusión y transferencia de tecnologías.

Se garantiza el funcionamiento permanente de los institutos públicos de investigación relacionados a: salud pública, biodiversidad, investigación agropecuaria, pesca, geología, minería y metalurgia, eficiencia energética y energía renovable, oceanografía, estudio del espacio, estudio polar

 <p>INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquieta Pérez</p>	<p>ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS</p>		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	<p>Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación</p>	<p>Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación</p>	Fecha Aprobación:	10-06-2019

antártico, cartográfico y geografía, meteorología e hidrología, estadísticas y censos, patrimonio cultural y los demás que el Presidente de la República considere necesarios.

Todos los institutos públicos de investigación deberán contar con una estructura y regulación que permita su adecuado funcionamiento relacionado a la investigación, desarrollo tecnológico y transferencia de tecnología.


Los Institutos públicos de investigación, tendrán las siguientes atribuciones:

- 1.- Planificar, programar y ejecutar proyectos de investigación en el ámbito de su competencia;
2. Establecer relaciones con universidades y centros de investigación públicos y privados nacionales y extranjeros para el desarrollo de programas y proyectos de investigación de la materia correspondiente;
3. Contribuir al incremento sostenido de la producción y productividad del sector al que pertenecen;
4. Generar procesos de innovación, desarrollo y transferencia de tecnología;
5. Proveer servicios de laboratorio y especializados de investigación en función de las prioridades establecidas por la entidad rectora del sector. Estos servicios podrán ser onerosos; y,
6. Las demás que se establezcan en este Código, en el reglamento general que se expida para el efecto y en la normativa vigente.

SEGUNDA. OBJETIVOS.

El Presente acuerdo tiene los siguientes objetivos:

- Formalizar el vínculo entre la TESISISTA e INSPI, por el cual se manifiesta que el **ING. FERNANDO XAVIER VILLAVICENCIO ZAMBRANO** se compromete a asesorar el trabajo de tesis de **EVELYN KATHERINE JARAMILLO RUALES** para la obtención del título de **MAGISTER EN LABORATORIO CLÍNICO MENCIÓN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA** que se realizará bajo la responsabilidad conjunta.

 <p>INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquieta Pérez</p>	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	10-06-2019

TERCERA. COMPROMISO DE LAS PARTES.

DEL INSPI


El **ING. FERNANDO XAVIER VILLAVICENCIO ZAMBRANO, RESPONSABLE DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS** tendrá las siguientes obligaciones:

- ✓ Dar un trato respetuoso y cordial al TESISTA;
- ✓ Informar al estudiante sobre los Reglamentos y Lineamientos para vinculación académica, así como de las políticas internas y demás información necesaria que tenga que conocer para desarrollar debida y plenamente las actividades que le sean asignadas;
- ✓ Especificar al tesista los reglamentos y cláusulas de laboratorio y bioseguridad para un correcto manejo.
- ✓ Aceptar la designación como Asesor, con el fin de que el Tesista pueda cumplir a cabalidad sus actividades;
- ✓ Brindar las facilidades para el correcto desempeño de la investigación del TESISTA, conforme la planificación de actividades;
- ✓ Elaborar y entregar, al finalizar la investigación:
 - Artículo científico en digital, con los lineamientos de la revista INSPILIP, en formato PDF.
 - Informe de culminación de actividades de Tesis
- ✓ Revisar y avalar el registro de las actividades del TESISTA.

DEL TESISTA

Son compromisos del TESISTA:

- ✓ Entregar el Acuerdo de Entendimiento, firmado por el asesor del INSPI, el TESISTA y el TUTOR DE LA IES.
- ✓ Enviar propuesta de investigación bajo el formato establecido en el INSPI.
- ✓ Entregar informes periódicos de avances de la investigación y un informe final;
- ✓ Comunicar de toda situación o evento que afecte el desarrollo de sus actividades a ambas instituciones.
- ✓ Entregar Artículo Científico con lineamiento de revista INSPILIP, en formato PDF.

 <p>INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquieta Pérez</p>	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	10-06-2019

- ✓ Una vez finalizadas las actividades, se entregará una publicación científica en digital, en la cual figurarán como autores EL TESISISTA, EL TUTOR DE TESIS DE LA IES, EL ASESOR DE TESIS DEL INSPI Y EL ANALISTA DE I+D+i que la redacte.
- ✓ **Firmar Carta de Confidencialidad.**

Las partes se comprometen a establecer mecanismos para garantizar la ejecución, control, seguimiento y evaluación de los objetos descritos en este Acuerdo de Entendimiento.

CUARTA. RELACIÓN LABORAL.

El objeto de los Convenios con IES, es "establecer un marco general referencial a fin de que las partes puedan promover la colaboración en intercambio científico, la transferencia de tecnología y del conocimiento para el desarrollo de habilidades y destrezas en el campo de salud humana; la realización de investigaciones conjuntas; el intercambio de información científico-técnica y de personal especializado, procurando la complementación de acciones conjuntas en áreas de competencia de ambas partes."


Por la naturaleza de esta vinculación, no se generan derechos ni obligaciones laborales o administrativas, no se crea ningún tipo de estabilidad laboral, y se manifiesta que el "TESISTA" no es sujeto de indemnización alguna y no ingresa a la carrera de servicio público.

Los Tesisistas deberán contar con un seguro de salud privado o de la Universidad, para el ejercicio de actividades a desarrollar durante el período de estancia en la Institución.

Sin embargo, aun cuando el TESISTA no mantiene ningún vínculo laboral con la institución, tiene la obligación de cumplir cabalmente con lo establecido en el Reglamento Interno Vigente del INSPI, el Código de Ética Institucional, las Políticas Internas así como debe sujetarse a las normas y políticas, incluyendo a las políticas de bioseguridad del laboratorio que lo acoge.

QUINTA. DURACIÓN.

El presente instrumento entrará en vigor a partir de la fecha de su firma y tendrá una duración de 18 meses prorrogable cuando cuente con el justificativo, aprobado por la Máxima Autoridad, según evaluación y aprobación de ambas partes, previa evaluación de los resultados obtenidos y mediante acuerdo por escrito.

 INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquieta Pérez	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	10-06-2019

SEXTA. PROPIEDAD INTELECTUAL Y CONFIDENCIALIDAD.

Todos los datos ya sean oral, impresa, contenida en medios electrónicos o electromagnéticos, propiedad de las partes o de sus unidades, se deberán mantener en sigilo, protección y reserva, sin divulgación a terceros, y sólo serán accesibles cuando la tesis sea publicada.

Las partes convienen que las publicaciones, así como la difusión de los resultados derivados se realizarán de común acuerdo a los lineamientos de vinculación académica del "INSPI"

Las partes convienen de manera expresa que los trabajos que se deriven de la ejecución del presente Acuerdo de Entendimiento que sean susceptibles de protección intelectual, corresponderán a la parte cuyo personal haya realizado el trabajo objeto de protección, dándole el debido reconocimiento a quienes hayan intervenido en la realización del mismo.


En caso de trabajos generados y de los cuales no sea posible determinar el grado de participación del INSPI y el TESISTA, para titularidad de los derechos, las partes se acogerán a lo descrito en el Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, en este aspecto.

Queda expresamente entendido, que el TESISTA podrá utilizar en sus tareas académicas, los resultados obtenidos de las actividades amparadas por el presente instrumento.

SEPTIMA. AUTORÍAS:

Al preparar una publicación de cualquier índole usando los datos de estos proyectos, los investigadores involucrados se comprometen a regirse a las líneas guía del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE). Las líneas guía del ICMJE indican que la autoría se defina siguiendo las siguientes 4 condiciones (ICMJE, 2015):

1. Contribución substancial a la concepción o diseño del estudio; o la adquisición, análisis o interpretación de los datos del estudio,
2. Elaboración del borrador del manuscrito o revisión crítica del contenido intelectual del mismo,
3. Aprobación final de la versión que será publicada,
4. Estar de acuerdo con ser responsable (poder rendir cuentas) del contenido y todos los aspectos del estudio y del artículo, asegurando que cualquier pregunta o duda sobre la precisión del estudio sean investigadas y resueltas de forma apropiada.

 <p>INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquieta Pérez</p>	<p>ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS</p>		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	<p>Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación</p>	<p>Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación</p>	Fecha Aprobación:	10-06-2019

Los autores deberán cumplir con las 4 condiciones, donde en representación del INSPI el **ING. FERNANDO XAVIER VILLAVICENCIO ZAMBRANO** en su calidad de **RESPONSABLE DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS** y será coautor de la publicación.

Otras personas que contribuyen al trabajo, como por ejemplo proveedores de reactivos esenciales o recopilación de datos, también se los podrá incluir en la autoría siempre cuando cumplan con *las 4 condiciones, previamente descritas. Personas que no cumplan con los 4 criterios deberán figurar solamente en los agradecimientos.*

OCTAVA. TERMINACIÓN.

Se dará por terminado el presente acuerdo por las siguientes causales:

- Por el cumplimiento del plazo y objeto del presente documento;
- Por mutuo acuerdo de las partes;
- Por decisión unilateral del INSPI, a razón de que el TESISTA incurra en: faltas de Conducta/ incumplimiento e inobservancia de lo establecido en los Lineamientos y Reglamentos del INSPI; realización de actividades indebidas como: hacer mal uso de los bienes de la institución, realizar actividades no acordadas, realizar actos de proselitismo político dentro de la institución, ausencia injustificada o incumplimiento del tesista;
- Por abandono de estudios, sin comunicar de forma escrita su voluntad, mientras el mencionado se encuentre realizando sus actividades.
- Por petición del Tesista.

NOVENA. RESPONSABLES.

Son responsables de promover y cumplir las condiciones del presente acuerdo:

- **Por el INSPI :**


Nombre del asesor: ING. FERNANDO XAVIER VILLAVICENCIO ZAMBRANO

Cargo: RESPONSABLE DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Dirección: Iquique N14-285 y Yaguachi, Barrio "El Dorado"

Teléfono: 02 2509625 ext. 116

E-mail: fvillavicencio@inspi.gob.ec

 INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquieta Pérez	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	10-06-2019

➤ **Por el TESISISTA:**

Nombre Del Tesista: B.Q. EVELYN KATHERINE JARAMILLO RUALES

Facultad / Carrera: FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD - UNIVERSIDAD TÉCNICA DE
 AMBATO

Dirección: Av. De los Chasquis, Ambato

Teléfono: 0993515661

E-mail: ejaramillo@inspi.gob.ec

DÉCIMA. COMUNICACIONES.

Para efecto de las comunicaciones que se necesiten entre las partes, se establecen las siguientes direcciones:

INSPI: Gestión Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación, Iquique N14-285 y Yaguachi, Barrio "El Dorado"

TESISTA: Ingresar solicitud por Secretaría General, dirigida al Área técnica aprobada para desarrollo de la tesis


DÉCIMA PRIMERA. CONTROVERSIAS

Por ser este un Acuerdo, las eventuales controversias o reclamaciones que pudieran surgir de la interpretación y aplicación del mismo, sus posteriores enmiendas, o cualquier cuestión no acordada relacionada con su contenido, será resuelta en forma directa y amigable por las partes, en el plazo de quince (15) días, contados a partir de la notificación de la contraparte.

De no mediar acuerdo alguno y persistir las divergencias, las partes convienen someter las controversias al procedimiento de Mediación en el Centro de Mediación de la Procuraduría General del Estado.

DÉCIMA SEGUNDA. ACEPTACIÓN

Las Partes declaran estar de acuerdo con el contenido de todas y cada una de las cláusulas materia del presente instrumento, por así convenir a sus respectivos intereses, indicando que en su

 <p>INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquieta Pérez</p>	<p>ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS</p>		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	03
	<p>Macro-Proceso: Dirección Técnica de Investigación, Desarrollo e Innovación</p>	<p>Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación</p>	Fecha Aprobación:	10-06-2019

celebración no existe mala fe, o cualquier otro motivo que vicie su consentimiento, por lo que las aceptan y se ratifican en cada una de ellas, y para constancia de lo estipulado firman en unidad de acto en DOS (2) ejemplares del mismo contenido, y tenor, en la Ciudad de Quito a los 05 días del mes de Mayo de 2021.



Firmado electrónicamente por:
**FERNANDO XAVIER
 VILLAVICENCIO
 ZAMBRANO**

**ING. FERNANDO XAVIER
 VILLAVICENCIO ZAMBRANO,
 RESPONSABLE DEL CENTRO
 NACIONAL DE REFERENCIA DE
 RESISTENCIA A LOS
 ANTIMICROBIANOS**



Firmado electrónicamente por:
**EVELYN KATHERINE
 JARAMILLO RUALES**

**B.Q. EVELYN KATHERINE JARAMILLO
 RUALES**

**MAESTRANTE- UNIVERSIDAD TÉCNICA
 DE AMBATO**



Firmado electrónicamente por:
**WILLIAM RICARDO
 CALERO CACERES**

**QUÍMICO PHD. WILLIAM RICARDO
 CALERO CÁCERES
 UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

Anexo Nro.5 Preparación de solución madre de Vancomicina

DATOS ANTIBIÓTICO	
Catálogo: PHR17324X250MG	Casa Comercial: Sigma-Aldrich
Lote: LRAC0718	Almacenamiento: 2-8°C
Peso molecular: 1449,25 g/mol	Pureza HPLC: 93.2%
Fracción activa (libre de ácidos y sales): 100%	Contenido de agua mediante la valoración de Karl Fischer: 2.95%
Solvente: Agua (CLSI-M100., 2021.Tabla 6A. Solventes y diluyentes para preparar la solución stock)	

$$Potencia = pureza * fracción activa * (1 - \%H_2O)$$

$$Potencia = 902 * 1.00 * (1 - 0.295)$$

$$Potencia = 635,91 \mu g/mg$$

Volumen final: 5 mL

Concentración: 1280 $\mu g/mL$

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

$$Peso\ Vacomicina = \frac{5\ ml \times 1280\ \frac{\mu g}{ml}}{635.91\ \frac{\mu g}{mg}}$$

$$Peso\ Vancomicina = 10.06\ mg$$

10.06 mg en Polvo + 5000 ul de Agua Destilada

Realizar alicuotas de 500 ul y Almacenar a -70° C.

Anexo Nro.6 Preparación solución de trabajo (ST)

Solución de trabajo para 1 placa: Se recomienda realizar los cálculos para 16 muestras

Concentración de Solución madre: 1280 ug/mL

Concentración Final: 64 ug/mL

Volumen final de ST: 1600uL

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

$$V_1 = \frac{1600uL \times 64ug/mL}{1280ug/mL}$$

A partir de una alícuota de la SM pipetear **80 ul de SM + 1520 ul de MHB**

DILUCIONES

Solución de Trabajo 1 (ST1): 64 ug/mL

Tabla N^a 1: Guía para preparación de diluciones

Concentración solución (ug/ml)	Concentración pocillo (ug/ml)	Volumen ST (ul)	Volumen Solvente (ul)
64	32	800	-
32	16	400	400
16	8	200	600
8	4	100	700
4	2	50	750
2	1	25	775
1	0,5	12.5	787.5

Anexo Nro.7 Plantilla para recolección de datos

N° Placa		MUESTRAS											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DILUCIONES	32												
	16												
	8												
	4												
	2												
	1												
	0.5												
	CC												

Anexo Nro. 8 Preparación de solución madre de Linezolid

DATOS ANTIBIÓTICO	
Catálogo: PZ0014-25MG	Casa Comercial: Sigma-Aldrich
Lote: 015M4715V	Almacenamiento: Temperatura ambiente
Peso molecular: 337.35 g/mol	Pureza HPLC: 99.2 %
Fracción activa: 100%	Contenido de agua: 0.0 mol
Solubilidad DMSO: 52.0 mg/ml	
Solvente: Agua (CLSI-M100., 2021.Tabla 6A. Solventes y diluyentes para preparar la solución stock) DMSO: >20 mg/mL	

$$Potencia = pureza * fracción activa * (1 - \%H_2O)$$

$$Potencia = 99.2 * 1.00 * (1 - 0.0)$$

$$Potencia = 99.2 \mu g/mg$$

Volumen final: 5 mL

Concentración: 1280 $\mu g/mL$

$$Peso\ de\ Linezolid = \frac{Volumen\ (ml) \times Concentración\ \left(\frac{\mu g}{ml}\right)}{Potencia\ \mu g/mg}$$

$$Peso\ Linezolid = \frac{5\ ml \times 1280\ \frac{\mu g}{ml}}{99.2\ \frac{\mu g}{mg}}$$

$$Peso\ Linezolid = 6.45\ mg$$

6.45 mg en Polvo + 5000 μl de Agua Destilada

Realizar alicuotas de 100 μl y Almacenar a $-70^\circ C$.

Anexo Nro. 9 Preparación solución de trabajo (ST)

Solución de trabajo para 1 placa: Se recomienda realizar los cálculos para 16 muestras

Concentración de Solución madre: 1280 ug/mL

Concentración Final: 64 ug/mL

Volumen final de ST: 1600uL

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

$$V_1 = \frac{1600uL \times 64ug/mL}{1280ug/mL}$$

A partir de una alícuota de la SM pipetear **80 ul de SM + 1520 ul de MHB**

DILUCIONES

Solución de Trabajo 1 (ST1): 64 ug/mL

Tabla N^a 1: Guía para preparación de diluciones

Concentración solución (ug/ml)	Concentración pocillo (ug/ml)	Volumen ST (ul)	Volumen Solvente (ul)
64	32	800	-
32	16	400	400
16	8	200	600
8	4	100	700
4	2	50	750
2	1	25	775
1	0,5	12.5	787.5

Anexo Nro. 10 Plantilla para recolección de datos

N° Placa: _____		MUESTRAS											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DILUCIONES	32												
	16												
	8												
	4												
	2												
	1												
	0.5												
	CC												

Anexo Nro.11. Flujograma para realizar microdilución en caldo de vancomicina y linezolid

