



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Escherichia coli*
PRODUCTORAS DE β -lactamasas DE ESPECTRO EXTENDIDO AISLADAS EN
TRES HOSPITALES DE LA SELVA PERUANA

Línea de investigación:

Salud Pública

Tesis para optar por el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autor:

León Luna, Diana Mercedes

Asesor:

Gutiérrez Román, Ana Isabel Flor

ORCID: 0000-0002-7020-7387

Jurado:

Saez Flores, Gloria María

Velarde Vílchez, Mónica Margarita

Nolasco Cárdenas, Oscar Patricio

Lima - Perú

2022

Referencia:

León, L. (2022). Identificación y caracterización molecular de Escherichia coli productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas en tres hospitales de la selva Peruana [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/6088>



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
Escherichia coli PRODUCTORAS DE β -lactamasas DE ESPECTRO
EXTENDIDO AISLADAS EN TRES HOSPITALES DE LA SELVA
PERUANA

Línea de Investigación:

Salud Pública

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

Autora:

León Luna, Diana Mercedes

Asesor(a):

Gutiérrez Román, Ana Isabel Flor

(ORCID: 0000-0002-7020-7387)

Jurado:

Saez Flores, Gloria María

Velarde Vílchez, Mónica Margarita

Nolasco Cárdenas, Oscar Patricio

Lima – Perú

2022

Agradecimientos

El principal agradecimiento a Dios quien me ha guiado y me ha dado la fortaleza para seguir adelante.

A mi familia por su comprensión y por su apoyo incondicional durante mi carrera profesional, por levantarme y darme ánimos en los momentos cuando se tornaban difíciles.

A mis mentores por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis.

Y a todas las personas que de una u otra forma me apoyaron en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	8
1.1.	Descripción y formulación del problema	8
1.2.	Antecedentes.....	10
1.3.	Objetivos.....	13
1.3.1.	Objetivo General	13
1.3.2.	Objetivos Específicos.....	13
1.4.	Justificación.....	13
1.5.	Hipótesis	14
1.5.1.	Hipótesis nula.....	14
1.5.2.	Hipótesis alterna.....	14
II.	MARCO TEÓRICO.....	11
2.1.	Bases teóricas sobre el tema de investigación	11
2.1.1.	Escherichia coli.	11
2.1.2.	Resistencia bacteriana	11
2.1.3.	Tipos de resistencia	12
2.1.3.1.	Resistencia intrínseca.	12
2.1.3.2.	Resistencia adquirida.....	12
2.1.4.	Mecanismos de resistencia.....	13
2.1.4.1.	Permeabilidad en la membrana.	13
2.1.4.2.	Modificación en el sitio activo.....	13

2.1.4.3. Bombas de eflujo.....	14
2.1.4.4. Inactivación de antibióticos por enzimas hidrolíticas.	15
2.1.5. Betalactamasas de espectro extendido	16
2.1.6. Clasificación de β -lactamasas.	16
2.1.6.1. BLEE tipo SHV.....	20
2.1.6.2. BLEE tipo TEM..	20
2.1.6.3. BLEE tipo CTX-M.....	21
2.1.6.4. BLEE tipo PER.	21
III. MÉTODO	25
3.1. Tipo de investigación.....	25
3.2. Ámbito temporal y espacial.....	25
3.3. Variables.....	25
3.4. Población y muestra.....	26
3.5. Instrumentos	27
3.6. Procedimientos	28
3.6.1. Reactivación de las cepas	28
3.6.2. Identificación bacteriana y Susceptibilidad a los antimicrobianos	28
3.6.3. Extracción del ADN genómico	29
3.6.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	29
3.6.5. Electroforesis.....	30

3.7.	Análisis de datos.....	31
3.8.	Consideraciones éticas.....	31
IV.	RESULTADOS.....	32
V.	DISCUSION DE RESULTADOS.....	40
VI.	CONCLUSIONES.....	45
VII.	RECOMENDACIONES.....	46
VIII.	REFERENCIAS.....	47
IX.	ANEXO.....	59

RESUMEN

Introducción: Las infecciones invasivas ocasionadas por *Escherichia coli*, resistente a los antimicrobianos han ido aumentando en los pacientes hospitalizados en la selva peruana, lo cual requiere un mayor estudio sobre sus características específicas. Dado que el mecanismo común de resistencia de la familia Enterobacteriaceae es la activación de las enzimas beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) que inhiben a los antibióticos. **Objetivo:** Identificar y caracterizar a nivel molecular cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas aisladas en tres hospitales de la selva peruana. **Metodología:** Se empleó muestras recolectadas y almacenadas de orina, sangre, secreción vaginal y tubo traqueal de pacientes hospitalizados pertenecientes al Hospital Santa Rosa, Hospital Regional de Pucallpa y Hospital Regional de Loreto, donde se realizó la prueba de perfil de susceptibilidad antimicrobiana, por medio del sistema automatizado MicroScan®, la extracción del ADN genómico mediante kits comerciales y la caracterización génica de betalactamasas mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR, por su siglas en inglés). **Resultados:** Se analizó 68 cepas de *E. coli* apartadas de pacientes hospitalizados, cuyos resultados evidenciaron que el 58,8% fueron productoras de betalactamasas, resistentes a los antimicrobianos como ampicilina, cefotaxima, ciproflaxina, aztreonam, cefepima y cefuroxima, pero sensibles ante los antimicrobianos como amikacina, imipenem, meropenem y tigeciclina. La detección de genes mediante PCR, distinguió el gen *blaCTX-M* (50%), seguido del gen *blaTEM* (14,7%) y por último el gen *blaSHV* (11,8%). **Conclusiones:** El 58,8% de *E. coli* fueron productoras de betalactamasas, siendo detectadas con mayor frecuencia los genes de tipo CTX-M.

Palabras clave: *Escherichia coli*, resistencia betalactámica, hospitalizados.

ABSTRACT

Introduction: Invasive infections caused by antimicrobial-resistant *Escherichia coli* have been increasing in patients hospitalized in the Peruvian jungle, which requires further study of their specific characteristics. Since the common mechanism of resistance of the Enterobacteriaceae family is the activation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) enzymes that inhibit antibiotics. **Objective:** to identify and characterize at the molecular level strains of *Escherichia coli* producing beta-lactamases isolated in three hospitals in the Peruvian jungle. **Methodology:** It was used from samples collected and store of urine, blood, vaginal secretion and tracheal tube from hospitalized patients belonging to the Santa Rosa Hospital, Pucallpa Regional Hospital and Loreto Regional Hospital were used, where the antimicrobial susceptibility profile test was performed, through the MicroScan® automated system, the extraction of genomic DNA through commercial kits and the gene characterization of beta-lactamases using the polymerase chain reaction (PCR). **Results:** We analyzed 68 strains of *E. coli* separated from hospitalized patients, whose results showed that 58.8% were producers of beta-lactamases, susceptible to antimicrobials such as ampicillin, cefotaxime, ciproflaxin, aztreonam, cefepime and cefuroxime, but not to antimicrobials such as amikacin, imipenem, meropenem and tigecycline. Gene detection by PCR distinguished the *blaCTX-M* gene 50% followed by the *blaTEM* gene 14.7% and finally the *blaSHV* gene 11.8%. **Conclusions:** we concluded that 58.8% of *E. coli* were producers of beta-lactamases, in which the detection of the *blaCTX-M* gene was the most frequent.

Keywords: *Escherichia coli*, beta-lactam resistance, hospitalized.

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana (RAM) es un tema muy preocupante a nivel global en la salud pública (Bergšpica et al., 2020). Los microorganismos que poseen resistencia antimicrobiana, en su mayoría son enterobacterias nosocomiales, frecuentemente identificados como la *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) y *Escherichia coli* (*E. coli*). En la actualidad han adquirido resistencia, específicamente frente a los antimicrobianos betalactámicos (Oliver & Cantón, s. f.). Poseen una diversidad de defensa frente al mecanismo de acción de los antimicrobianos, ya sea por la mutación genética, permeabilidad de la membrana interna, eliminación del metabolito y/o alteración ribosomal (Carbajal, 2018).

La resistencia mediada por las enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), confieren capacidad hidrolítica ante los antimicrobianos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos) (Rada et al., 2019). Se conocen diversas familias de betalactamasas, entre estas las predominantes son las de clase A de grupo CTX-M, TEM y SHV, generalmente detectadas en *K. pneumoniae* y *E. coli* (Ghiglione, 2015).

El inicio y la difusión de las cepas bacterianas que producen las enzimas betalactamasas, se ha descrito a nivel mundial como punto clave de emergencia debido a la diseminación diversos tipos de infecciones (Paredes, 2013). Una de ellas es la infección del tracto urinario (ITU) la cual con frecuencia se encuentra alrededor de los entornos comunitarios y hospitalarios asociados con una morbilidad significativa (Aalpona y Kamrul, 2020).

1.1. Descripción y formulación del problema

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2020), la resistencia de las bacterias frente a los antibióticos es un problema de salud pública. Ante la aparición y propagación frecuente de *E. coli* resistente a múltiples antimicrobianos, ha obstaculizado el tratamiento a

diversas infecciones graves, tanto en la comunidad así como en los hospitales (Allocati et al., 2013).

La diseminación de cepas resistentes a diferentes fármacos ha sido impulsada por el uso inadecuado de los antimicrobianos, y la no adherencia al tratamiento que prevalece en nuestra población, ha generado consecuencias negativas que se expresan en términos de morbilidad, mortalidad y gastos sanitarios derivados de la atención clínica que amenazan el sostenimiento de nuestro precario sistema de salud en el Perú (Miranda, 2018).

La resistencia antimicrobiana, actualmente viene generando mortalidad de al menos 50,000 personas cada año solo en Europa y los Estados Unidos, con muchos cientos de miles más muriendo en otras áreas del mundo (Smith et al., 2016). En un mundo hiperconectado, las cepas resistentes llegan a cualquier parte, generando un problema a nivel general (Herrera et al., 2019). El costo global de la resistencia antimicrobiana, expone que un mundo sin antibióticos efectivos podría resultar en una pérdida económica muy significativa (Singh et al., 2019).

Los reportes informan que la resistencia va en crecimiento tanto en bacterias que generan infecciones por enterobacterias productoras de betalactamasas, especialmente el de tipo CTX-M, así como en el microbiota de personas sanas (Alós, 2015).

Los estudios realizados a nivel de Latinoamérica, demuestran que las cepas del género *Klebsiella* y *E. coli* productoras de betalactamasas poseen hallazgos más frecuentes a comparación con otras regiones del mundo (Mostajo et al., 2015). Y en nuestro país se ven reflejadas con el 50% para *E. coli* y el 71% para *K. pneumoniae* (Olarde-Luis et al., 2018). Según los análisis a nivel local, como es el caso de la región Loreto, se han reportado el 69,2% uro patógenos productoras de betalactamasa (Carbajal, 2018).

Frente a lo expuesto, observamos que en nuestro país aún quedan vacíos que explicar sobre el rechazo bacteriano frente a antimicrobianos betalactámicos, ocasionado por *E. coli*. A nivel región selva del Perú, aún son limitados las investigaciones sobre este tema, y son pocos los estudios que evalúan su característica a nivel molecular, debido a un limitado funcionamiento y prácticas de detección en el laboratorio y escasa ejecución de metodologías moleculares (Paredes, 2013). Es por ello que nos formulamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es la característica fenotípica y molecular de *E. coli* resistentes a antimicrobianos betalactámicos, en pacientes atendidos en los 3 hospitales de la región selva del Perú durante el periodo 2017 – 2018?

1.2. Antecedentes

La aparición de la resistencia antimicrobiana a los betalactámicos comenzó desde antes de que se desarrollara el primer betalactámico, la penicilina. Su identificación se dio por primera vez en *E. coli* antes del lanzamiento del antibiótico mencionado (penicilina) para su uso en la aplicación médica (Bradford, 2001). Las primeras epidemias nosocomiales causadas por cepas productoras de BLEE fueron reconocidas en 1985 en Francia, y desde entonces se han generalizado a nivel global (Gniadkowski et al., 1998).

Kpoda et al. (2018) en el estudio sobre los aislamientos de muestras biológicas en centros de salud en Uagadugú, Burkina Faso, determinaron que la frecuencia y la distribución de genes codificantes de betalactamasas en la familia Enterobacteriaceae fue alta. Resaltan que la detección del gen bla: CTX-M, TEM y SHV en *E. coli* represento el 39.6%, 24.6% y 3.7%, respectivamente, en comparación con *Klebsiella spp.* que tenía el 5.9% de gen blaCTX-M, 2.7%

de blaTEM y 1.6% del gen blaSHV. Concluyen mencionando que la diseminación y expansión de Enterobacteriaceae productoras de BLEE, proyecta serios desafíos de salud pública.

Sharma et al. (2013), durante sus estudios de caracterización molecular de cepas de *E. coli* y *Klebsiella spp.* productoras de BLEE, en zona rural de Jaipur, Rajasthan, India (2011 – 2012), informan que el 52.49% fueron productoras de BLEE, donde la principal fuente de muestra fue del tracto respiratorio, y la especie más involucrada fue *Klebsiella spp.* (67,04%), además el reporte demuestra que la detección de los genes blaCTX-M fue el 82.5%, blaTEM (67.5%) y blaSHV (57.5%). Afirman que las cepas productoras de BLEE entre los aislados clínicos ha aumentado constantemente, por lo que recomiendan avanzar con la vigilancia farmacoresistencia y características moleculares de los aislamientos de BLEE, además es necesario guiar el adecuado uso juicioso de antibióticos.

El análisis del Programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY, expone un acontecimiento de BLEE para *E. coli* en 18,1%, 12,8%, 23,8%, 48,4% y para *K. pneumoniae* fue de 60,4%, 49,9%, 59,2%, 33,3% en los países de Argentina, Brasil, Chile, y México, respectivamente. Además, añade que las tasas de resistencia de los microorganismos descritos en América Latina en los años 2008 a 2010 para *E. coli* BLEE positivos son los siguientes: Argentina (5.1%), Bolivia (0%), Brasil (0%), Chile (23,8%), Colombia (7 - 11%), Cuba (42,9%), Ecuador (15,1%), México (55 - 68%), Paraguay (1,4%), Perú (50%), Venezuela (12,5%) (Olarte-Luis et al., 2018).

Herrera et al. (2019), reportan el estudio basado en análisis molecular de urocultivos de pacientes atendidos en un Laboratorio Clínico – Guatemala 2016, señalan que *E. coli* BLEE alberga genes bla: CTX-M, SHV y TEM en 57%, 84% y 85%, respectivamente. Asimismo, describen que los análisis fenotípicos de *E. coli* indicaron una elevada resistencia a los

antibióticos betalactámicos, solo el 11.39% de las cepas adquirió resistencia a los antimicrobianos no betalactámicos.

Considerando que la infección urinaria afecta a la mayoría de las personas en la región, se realizó un estudio con una población de docentes universitarios en Nigeria, el cual demostró que las cepas de *E. coli* resistentes a betalactamasa de espectro extendido, estuvieron representados con 49 % y la resistencia a los antibióticos betalactámicos fue diversa y alta. En consecuencia, la presentación génica de todos los BLEE positivos fueron blaTEM, blaCTX-M-1 y blaCTX-M-9, el 75% codificó el gen blaSHV. El estudio reportó un alto nivel de resistencia a múltiples fármacos y portador de genes BLEE en *E. Coli* (Adekanmbi et al., 2021).

Según los reportes locales en nuestro país, se ha demostrado que la detección del gen CTX-M es más frecuente en cepas de *E. coli* productores de betalactamasa circulantes, una de estas evidencias se demostró en el estudio de Arce-Gil et al. (2013) en un Hospital de Chiclayo, Perú. Donde se describe que la detección de la presencia del gen CTX-M, fue el más frecuente en cepas de *E. coli* (51,4%). Remarcan que la mayoría de las cepas comunitarias, requieren mejoras técnicas para el estudio a nivel molecular, considerando métodos como el secuenciamiento.

Según Carbajal (2018), la caracterización clínica y epidemiológica asociadas a las infecciones urinarias en el hospital de Loreto, representaron el 69,2% de uropatógenos BLEE, siendo *E. coli* y *K. pneumoniae* los más habituales. Además, sostienen que el grupo etario que comprende los años entre 18 y 45, el sexo femenino y el origen urbano, son los indicadores epidemiológicos más frecuentes. En consecuencia, mencionan que existe una asociación significativa, entre las particularidades epidemiológicas con respecto a las infecciones urinarias BLEE.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Identificar y caracterizar a nivel molecular cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas de tres hospitales pertenecientes a la región selva.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Identificar cepas de *E. coli* BLEE mediante el sistema MicroScan®
- Determinar el perfil de susceptibilidad antibiótica en *E. coli* productoras y no productoras de BLEE.
- Detectar los genes de β -lactamasas blaCTX-M, blaTEM, blaSHV, y blaPER en *E. coli* productoras de BLEE mediante PCR.

1.4. Justificación

Ante la diseminación de resistencia antimicrobiana, muchos de los avances terapéuticos del siglo pasado podrían desorientarse, y traer como consecuencia el descontrol de muchas enfermedades infecciosas que hasta ahora han sido tratadas (Organización Mundial de la Salud, 2020). El fracaso terapéutico implica la destrucción del antimicrobiano por la bacteria responsable. Por lo tanto, la selección del antimicrobiano correcto requiere determinar las bacterias responsables de la enfermedad del paciente, aplicando métodos de identificación específica (OMS, 2020).

En Perú, por lo que se ha reportado, así como en Latinoamérica, existe elevada prevalencia de la infección urinaria ocasionadas a uro patógenos BLEE, que restringe opciones de tratamiento según los últimos reportes. De las cuales *E. coli*, ha sido el principal microorganismo responsable de la diseminación de la resistencia antimicrobiana. Además ya se

han reportado que un grupo de ellos son resistentes a varios antibióticos y han generado un problema mayor en el tratamiento de las infecciones (Sidjabat y Paterson, 2015).

La recomendación emitida por la OMS (2020) es dar iniciativa en los estudios del desarrollo de nuevos fármacos y mejorar el estudio de los antibióticos que ya están disponibles (Quiñones, 2017). Y por otro lado contribuir al uso debido de los antimicrobianos. Se reitera que la identificación del agente etiológico y su sensibilidad al tiempo de manejo del paciente, en particular a nivel hospitalario es necesario. Además, de acuerdo a Cires (2002), es fundamental continuar con el desarrollo de los programas de vigilancia de la resistencia bacteriana, ya que ello permite conocer la resistencia y susceptibilidad antimicrobiana a nivel local y es más accesible para el conocimiento del profesional de salud.

Según las revisiones bibliográficas, se ha observado que los estudios de identificación y caracterización molecular de *E. coli* a nivel local de la región selva de nuestro país es limitada, por lo que me generó interés investigar el tema de resistencia bacteriana, especialmente en *E. coli* productoras de BLEE, por la razón de tomar conciencia y de tal forma realizar uso adecuado de los antibióticos.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis nula

Ho: No es viable la identificación y caracterización molecular de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de los 3 hospitales de la región selva peruana.

1.5.2. Hipótesis alterna

Ha: Es viable la identificación y caracterización molecular de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de los 3 hospitales de la región selva peruana.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. *Escherichia coli*.

Es el microorganismo modelo mejor caracterizado. La cepa de laboratorio de referencia *E. coli* K-12 subcepa MG1655 y sus derivados han intervenido como un papel clave en el avance de varios campos científicos, sobre todo en las disciplinas de microbiología, genética y biología molecular. Fuera del entorno de laboratorio, el anaerobio facultativo no esporulado Gram-negativo comprende parte del microbioma fecal de vertebrados, incluidos los de mamíferos, aves y reptiles (Yu et al., 2021).

Siendo normalmente *E. coli* un comensal del tracto gastrointestinal de los vertebrados, de los cuales, algunos han generado virulencia convirtiéndose en patógenos tanto en humanos, así como en animales. Dichas cepas patógenas son responsables de ocasionar infecciones intestinales, que incluyen enfermedades diarreicas, así como infecciones extraintestinales, tales como urinarias, del torrente sanguíneo y meningitis (Bekal et al., 2003 y Yu et al., 2021).

Las proporciones resistentes en el organismo centinela *E. coli* a menudo se denominan "prevalencia" de resistencia. *E. coli* es conocida como un patógeno peligroso para la salud humana, ya que contribuye a la diseminación de resistencia a los antimicrobianos (AMR) y es un buen indicador de las vías de transmisión porque es ubicuo, comparte el mismo nicho que otros patógenos entéricos y puede transferirse por la misma vía (Martínez-Vázquez et al., 2021).

2.1.2. *Resistencia bacteriana*

Es un mecanismo de las bacterias por el cual pueden reducir el actuar de los antibióticos (Fernández et al., 2003). Se considera que la mayoría de los antimicrobianos recetados y

vendidos de manera inapropiada no son utilizadas correctamente. En consecuencia el uso inadecuado está generando la resistencia bacteriana (OMS, 2020).

2.1.3. Tipos de resistencia

2.1.3.1. Resistencia intrínseca. Es una característica singular de las bacterias del mismo especie, naturalmente resistentes a algún tipo o familia de antimicrobianos lo que les da una ventaja competitiva sobre otras cepas y pueden sobrevivir si se usan antibióticos de esa familia (Torres, 2014). Por ejemplo, todas las bacterias Gram negativas son intrínsecamente más resistentes que las bacterias Gram positivas, esto se debe su membrana externa que actúa como una barrera de permeabilidad e impide que los antibióticos alcancen sus objetivos. La membrana externa es una bicapa asimétrica compuesta de lipopolisacáridos y fosfolípidos (Arzanlou et al., 2017).

2.1.3.2. Resistencia adquirida. Se da evolutivamente, y su persistencia depende del consumo de antimicrobianos, partiendo de mutaciones y mediante transferencia de su material genético extra cromosómico con otras bacterias (Torres, 2014).

Mecanismos adicionales de resistencia adaptativa se han visto facilitados por la capacidad de las bacterias de generar un cambio de comportamiento ante la respuesta de las condiciones extracelulares. Esto se ve mayormente en el desarrollo de células persistentes y biopelículas. Las células persistentes son una subpoblación de células que entran en un estado de reposo y dejan de crecer activamente, reduciendo la capacidad de antimicrobiana frente a la inhibición de su actividad celular (Arzanlou et al., 2017).

2.1.4. Mecanismos de resistencia

2.1.4.1. Permeabilidad en la membrana. Se lleva a cabo con la alteración de la membrana externa bacteriana, dificultando los canales de ingreso (porinas) (Fernández et al., 2003). Dicha membrana de las bacterias Gram-negativas cumple la función de proporcionar una capa adicional de protección al organismo sin permitir el intercambio de material necesario para mantenerse viva.

En esta capacidad dual, esta barrera parece ser un ensamblaje macromolecular extremadamente sofisticado. Al combinar una bicapa lipídica altamente hidrofóbica que contiene proteínas formadoras de poros (Omps) de propiedades específicas de exclusión por tamaño, la membrana externa actúa como una barrera selectiva (Ghai, I., y Ghai, S., 2018; Ayzanoa, 2021).

2.1.4.2. Modificación en el sitio activo. En esta situación, el cambio de un aminoácido inicia un objetivo distinto y, por tanto, reduce la afinidad de conexión del agente antimicrobiano.

A) Modificación de Penicillin-Binding-Protein (PBP): Las moléculas llamadas proteínas de unión a penicilina, poseen un complejo de enzimas para dirigir la síntesis del peptidoglicano, sobre todo en las bacterias grampositivas. Se ha visto casos de que si ocurre una mutación en el sitio de unión al agente antimicrobiano, tal es el caso de los betalactámicos, éstos no pueden actuar y solo les queda crear resistencia (Moreno et al., 2009).

Los antibióticos β -lactámicos, cuya estructura química imita a los dos últimos pentapéptidos d-residuos de alanina, bloquean la reacción transpeptidación (TP; entrecruzamiento de péptidos entre cadenas) al formar un complejo estable con el sitio activo

serina en el dominio TP de las PBP, lo que provoca la fragilidad del peptidoglucano y, a menudo, conduce a la lisis y muerte bacteriana (Contreras et al., 2009).

B) Modificación en el ribosoma: Los encargados de originar la alteración en el sitio activo ribosomal son los genes *erm A* y *B*, mediante el proceso llamado metilación. Como un ejemplo de este mecanismo tenemos a la resistencia *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* frente a los antibióticos macrólidos (Moreno et al., 2009 y Ayzanoa, 2021).

2.1.4.3. Bombas de eflujo. Es un sistema de excreción de residuos y tóxicos, del mismo modo puede eliminar diversos agentes antibacterianos que ingresan con el objetivo de protección y defensa ante la inhibición enzimática microbiana.

Dada su clasificación, se ha determinado cinco familias, siendo la primera como la superfamilia de los transportadores ATP Binding Cassette (ABC) (Li y Nikaido, 2009), un ejemplo de ello es la daunorrubicina, un fármaco de antraciclina producido por *Streptomyces peucetius*, del cual dos genes (*drxA* y *drxB*) que forman un sistema transportador de tipo I han sido clonado y se encontró que confería resistencia a la daunorrubicina/doxorubicina. En cuanto al gen *drxA* se demostró que el componente hidrofílico une ATP y GTP en una reacción dependiente de Mg^{2+} , con unión potenciada por la adición de doxorubicina o daunorrubicina (Méndez y Salas, 2001).

Una de las variantes de la bomba de resistencia a múltiples drogas (MDR) es la Superfamilia Facilitadora Principal (MFS, por su siglas en inglés) (Ayzanoa, 2021). El modelo más habitual de esta categorización es la similitud general entre el gen *Bmr* de *Bacillus subtilis* y gen *NorA* que se encuentra en *Staphylococcus aureus* (Neyfakh et al., 1993). Se ha descubierto que las bacterias patógenas y como no patógenas albergan y expresan eficazmente

bombas de eflujo de múltiples fármacos, y muchos de estos transportadores pertenecen al MFS (Neyfakh et al., 1993) y (Andersen et al., 2015).

La familia de los transportadores MATE está referida por NorM de *Vibrio parahaemolyticus*, la cual concede resistencia a diversos agentes tóxicos catiónicos (antibióticos fluoroquinolónicos) como antiportadores de H^+ o Na^+ (Kuroda y Tsuchiya, 2009). Sin embargo, los perfiles de sustrato naturalmente más conocidos son los transportadores de resistencia nodulación-división celular (RND) que dispone el operón mexA, MexB y OprM de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Se describe, que la estructura, así como los mecanismos de las bombas RND en el flujo de salida son de amplia gama. Dado que posee amplios dominios periplásmicos, formando complejos tripartitos con moléculas de conexión periplásmicas o proteínas de fusión membranal (MFP) como el acrA y mexA, y los canales de la membrana externa tolC y oprM (Li y Nikaido, 2009).

2.1.4.4. Inactivación de antibióticos por enzimas hidrolíticas. Las β -lactamasas son una de las enzimas hidrolíticas más comunes e importantes que inactivan a las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos (Liu et al., 2019). La serina β -lactamasas acilan los antibióticos β -lactámicos, al igual que las PBP, y luego usan moléculas de agua estratégicamente ubicadas para hidrolizar la β -lactama acilada. De esta manera, la β -lactamasa se regenera y puede inactivar moléculas adicionales de β -lactámicos (Drawz y Bonomo, 2010).

Otro ejemplo de la hidrólisis es frente a los antibióticos de tipo macrólidos (eritromicina), que matan bacterias al unirse a la subunidad mayor ribosomal e interferir con la síntesis de proteínas (Seiple et al., 2016). Los macrólidos se ciclan a través de un enlace éster, que es el paso crítico para su actividad. Sin embargo, las esterasas de macrólidos podrían

destruir la estructura cíclica del antibiótico al abrir el anillo, lo que es seguido por una ciclación interna y deshidratación a través de la condensación intramolecular. Como resultado, los macrólidos con anillo abierto pierden su actividad antibacteriana (Liu et al., 2019).

2.1.5. *Betalactamasas de espectro extendido*

Las β -lactamasas son enzimas versátiles con una gama limitada de estructuras moleculares que se encuentran en una diversidad de fuentes bacterianas (Bush, 2018). Poseen la capacidad para hidrolizar los enlaces amida del anillo β -lactámico, el elemento estructural más común de todos los antimicrobianos betalactámicos. Hasta la actualidad se conoce más de 200 miembros de esta superfamilia de enzimas (Egorov et al., 2018).

Bioquímicamente se clasifican en dos grandes divisiones según el mecanismo de hidrólisis, ya sea por medio de la creación de una enzima acilo con una serina en el sitio activo o mediante una reacción hidrolítica facilitada por uno o dos iones de zinc esenciales en los sitios activos de las metalo- β -lactamasas (MBL) (Bush, 2018).

2.1.6. *Clasificación de β -lactamasas.*

El número de variantes de BLEE identificadas ha crecido constantemente desde 1983, lo que demuestra cuán rápida ha sido la evolución de BLEE. Actualmente se conocen más de 100 variantes naturales distintas de BLEE. Siendo clasificados en nueve familias estructurales/evolutivas diferentes según la comparación de sus secuencias de aminoácidos deducidas. El grupo fundamental están formadas por las enzimas TEM y SHV, que incluyen las primeras variantes de betalactamasas identificadas (Gniadkowski, 2001).

Las denominadas β -lactamasas de amplio espectro adquiridas, son derivados estructurales de las enzimas SHV, TEM y OXA. La genealogía familiar restante de BLEE es, en general, más misteriosa. Las comparaciones de secuencias de aminoácidos han revelado

similitudes, algunos de ellos han presentado ciertas β -lactamasas específicas de especie de los subgrupos 2be y 2e de Bush. Dichas similitudes van del 30 al 40 % hasta el 99 %, lo que indica orígenes comunes de los grupos de enzimas discernidos (Gniadkowski, 2001).

La **Tabla 1** muestra una versión ampliada del esquema de clasificación funcional propuesto inicialmente por Bush en 1989 y expandido en 1995 (Bush et al., 1995). Dicha tabla alinea las clasificaciones estructurales y funcionales lo más estrechamente posible, según la información disponible en el dominio público. La **Tabla 2** muestra nuevos subgrupos funcionales que se han agregado al esquema como resultado de la identificación y expansión de las principales familias de lactamasas, en las cuales las variantes continúan siendo identificadas regularmente (Bush y Jacoby, 2010).

Tabla 1*Esquemas de clasificación para las bacterias β -lactamasas.*

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	E. coli AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxyimino- β -lactams	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxyimino- β -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxyimino- β -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and cefpirome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxyimino- β -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxyimino- β -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1) B (B3)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

Nota. Tomada de Bush y Jacoby, 2010.

a CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam. b NI, not included.

Tabla 2*Principales familias de β -lactamasas de importancia clínica.*

Enzyme family ^a	Functional group or subgroup	No. of enzymes ^{b,c}	Representative enzymes
CMY	1, 1e	50	CMY-1 to CMY-50
TEM	2b, 2be, 2br, 2ber	172	
	2b	12	TEM-1, TEM-2, TEM-13
	2be	79	TEM-3, TEM-10, TEM-26
	2br	36	TEM-30 (IRT-2), TEM-31 (IRT-1), TEM-163
	2ber	9	TEM-50 (CMT-1), TEM-158 (CMT-9)
SHV	2b, 2be, 2br	127	
	2b	30	SHV-1, SHV-11, SHV-89
	2be	37	SHV-2, SHV-3, SHV-115
	2br	5	SHV-10, SHV-72
CTX-M	2be	90	CTX-M-1, CTX-M-44 (Toho-1) to CTX-M-92
PER	2be	5	PER-1 to PER-5
VEB	2be	7	VEB-1 to VEB-7
GES	2f	15d	GES-2 to GES-7 (IBC-1) to GES-15
KPC	2f	9	KPC-2 to KPC-10
SME	2f	3	SME-1, SME-2, SME-3
OXA	2d, 2de, 2df	158	
	2d	5	OXA-1, OXA-2, OXA-10
	2de	9	OXA-11, OXA-14, OXA-15
	2df	48e	OXA-23 (ARI-1), OXA-51, OXA-58
IMP	3a	26	IMP-1 to IMP-26
VIM	3a	23	VIM-1 to VIM-23
IND	3a	8	IND-1, IND-2, IND-2a, IND-3 to IND-7

Nota. Tomada de Bush & Jacoby, 2010.

a Familias de enzimas incluyen aquellos para los números que han sido asignados sobre la base de las estructuras primarias de aminoácidos.

b Compilado hasta diciembre de 2009.

c La suma de los subgrupos en cada familia no siempre es igual al número total de enzimas en cada familia, porque algunos números de enzimas han sido retirados, y algunos investigadores no han asignado una designación funcional por los investigadores que proporcionaron la secuencia de aminoácidos.

d GES-1, a diferencia de otros miembros de la familia GES, tiene poca interacción detectable con Imipenem.

e Nueve grupos de carbapenemasas OXA con sus miembros individuales.

2.1.6.1. BLEE tipo SHV. Constan de dos subdominios: un α/β que incluye una lámina β antiparalela de cinco hebras flanqueada por hélices α y un subdominio totalmente helicoidal α . Siendo el sitio activo ubicado dentro de la hendidura creada por los subdominios y contiene un residuo de Ser 70. Entre las betalactamasas de tipo SHV, las sustituciones de aminoácidos se ubican predominantemente en las posiciones Leu 35 , Gly 238 y Glu 240 , mientras tanto existen sustituciones pocas comunes y no obstante necesarias para la expresión del espectro extendido que ocurren en diversos aminoácidos, incluidos Asp 179, Arg 43, Arg 205, Glu 64, Gly 156 y Ile 8 (Liakopoulos et al., 2016).

Esta enzima es capaz de hidrolizar antibióticos betalactámicos y son vigorosamente inhibidas por los antimicrobianos como el tazobactam y el ácido clavulánico. Se describe que estas enzimas han sido localizadas comúnmente en *E. coli* y *K. pneumoniae*. Hasta la actualidad se tiene conocimiento de 189 variantes alélicas de la enzima SHV. Y su primer hallazgo fue en América del Sur, detectada en la cepa de *K. pneumoniae* (Rada et al., 2019).

2.1.6.2. BLEE tipo TEM. La conformación estructural de la enzima originada por el gen bla TEM, posee dos dominios (α -helical y $\alpha\beta$). Su sitio activo está localizado en la interfase de los dos dominios circundante de las cadenas β y $\alpha\beta$ -dominio. Y como su sitio catalítico fundamental es la Ser70 (Stec et al., 2005). Las mutaciones puntuales que transportan al fenotipo resistente a los inhibidores se obtienen en algunos residuos de aminoácidos específicos dentro del gen estructural para la enzima TEM, Arg-244, Met-69, Asn-276 y Arg-275 (Bradford, 2001).

A principios de la década 1960 se descubrió la primera β -lactamasa conducida por plásmidos en gramnegativos, llamada TEM-1. Fue aislado de un hemocultivo paciente llamado Temoniera en el continente europeo (Grecia), de ahí el nombre de TEM. Su disseminación en

otras bacterias avanza muy a la ligera por medio de plásmidos y transposones (Bradford, 2001). Su primer hallazgo en América Latina fue en *K. pneumoniae* en Argentina - 2003 (Rada et al., 2019).

2.1.6.3. BLEE tipo CTX-M. Estas enzimas son mucho más activas frente a cefotaxima que con respecto a ceftazidima y aztreonam. Sus residuos de aminoácidos críticos para su actividad de espectro extendido se conocen parcialmente. En cuanto a la actividad hidrolítica frente cefotaxima de las enzimas CTX-M parecen involucrar Ser-237 y Arg-276, pero los experimentos de mutagénesis de estos residuos conducen solo a ligeros cambios en sus actividades catalíticas (Bonnet et al., 2001; Gazouli et al., 1998).

En la actualidad se tiene identificado 172 variantes de CTX-M clasificadas en cinco grupos, su identificación está basada en la secuencia de los aminoácidos conformada por CTX-M 1, 2, 8 y 25. Su primer hallazgo fue en Alemania (en el año 1989), en una cepa de *E. coli*. Y su diseminación a nivel Latinoamérica fue muy dinámica (Rada et al., 2019).

2.1.6.4. BLEE tipo PER. Estas enzimas pertenecen a la clase A y conceden resistencia a los antimicrobianos como las oximiino-cefalosporinas, penicilinas y aztreonam, sin embargo, no confieren resistencia los del grupo cefamicinas y carbapenémicos. Según análisis in vitro se resalta que su mecanismo de acción es inhibido por el ácido clavulánico y el tazobactam. Según su homología de secuencia con PER-1, se han categorizado en dos grupos. El primer grupo comprende PER-1 y posee derivados como el PER-3,4, 5, 7 y 8, mientras que el otro grupo está compuesto por PER-2 y PER-6, que comparten un 85 % de similitud de aminoácidos con PER-1 (Mancini et al., 2018).

La primera identificación del gen PER-1, se dio en 1993 en un plásmido en *P. aeruginosa* aisladas en pacientes de Turquía (Bradford, 2001).

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

Nuestro estudio es descriptivo, transversal y retrospectivo. Retrospectivo porque investigamos una tendencia de un fenómeno que ya aconteció en una población con precedencia al comienzo del estudio, transversal porque los datos de cada sujeto representan un momento en el tiempo y descriptivo porque su propósito es describir la frecuencia y las características relevantes de un problema de salud en una población dada.

3.2. Ámbito temporal y espacial

El proceso de esta investigación, se llevó a cabo con las muestras colectadas durante enero-diciembre (2017-2018). Los análisis de las muestras fueron desarrollados en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del departamento de la Escuela Profesional de Medicina Humana (EPMH) - Universidad Peruana Unión, Lima.

3.3. Variables

Variable	Definición operacional	Tipo de variable	Criterios de medición	Valores posibles
Detección de Gen BLEE	Detección de genotipos de <i>E. coli</i> mediante amplificación por PCR	Desenlace dependiente	Categórica politómica	Presencia - Ausencia
Fenotipo BLEE	Presencia de fenotipo BLEE, resultados de Antibiograma mediante sistema MicroScan®	Exposición independiente	Categórica dicotómica	Positivo - Negativo
Agente etiológico	Microorganismo obtenido de la muestra clínica, identificado por cultivo microbiológico y sistema MicroScan®	Exposición independiente	Categórica dicotómica	Positivo - Negativo

Tipo de muestra	Porción o volumen de líquidos corporales del paciente hospitalizado	Exposición independiente	Categórica politómica	Orina – sangre - secreción vaginal - tubo traqueal
Centro de salud	Espacio/lugar donde pertenecen los pacientes hospitalizados de la región selva	Exposición independiente	Categórica politómica	Hospital Santa Rosa- Hospital Regional de Loreto - Hospital Regional de Pucallpa.
Perfil de susceptibilidad antimicrobiana	Susceptibilidad fenotípica a diversos antimicrobianos tomando el punto de corte de la CLSI evaluada mediante sistema MicroScan®	Exposición independiente	Categórica politómica	Susceptible - Intermedio - Resistente
Genero	Según sexo biológico de cada paciente	Exposición independiente	Categórica dicotómica	Femenino - Masculino
Edad	Edad en años cumplidos de cada paciente	Exposición independiente	Cuantitativa continua	≤20 21-40 41-60 >60

3.4. Población y muestra

Población. – Nuestra población inicial comprendió 94 aislados de enterobacterias provenientes de pacientes hospitalizados de tres establecimientos de salud (Tabla 3), durante el periodo Enero – Diciembre, 2017 - 2018.

Muestra. – Fueron analizadas un total de 68 muestras, identificadas como *E. coli*, el criterio de determinación del tamaño de la muestra fue por el beneficio propio de encontrar cepas de *E coli* productoras de BLEE, siendo en general aisladas de muestras de orina (n=64), así como otras muestras complementarias de muestras de sangre (n=1), secreción vaginal (n=2) y tubo traqueal (n=1). El estudio solo incluyo cepas identificadas como *E. coli*.

Tabla 3

Tabla descriptiva de la población según establecimiento de salud.

Departamento	Hospital	Nivel de atención	Número de cepas
Madre de Dios	Santa Rosa	II-2	41
Ucayali	Regional de Pucallpa	II-2	21
Loreto	Regional de Loreto	III-1	32
Total			94

3.5. Instrumentos

La técnica que se utilizó en el presente trabajo de investigación fue la observación científica.

Para la recolección de datos se utilizaron los siguientes instrumentos:

Plantillas de Excel 2016, donde se registraron los datos de la investigación como edad, sexo, genero, diagnóstico de infección urinaria, año de recolección y el establecimiento de salud registrados en la ficha clínica de cada paciente.

Reporte de resultados brindado por el equipo automatizado MicroScan® donde se encuentra la información sobre la identificación y el perfil de susceptibilidad a los antibióticos.

Registro de base de datos emitido por el programa Lab Pro y WHONET (World Health Organization Net v. 5.6), programa estadístico propuesto por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) para la vigilancia de la resistencia bacteriana, se obtuvieron datos de las características de las enterobacterias en estudio.

Registro de base de datos de los resultados de electroforesis en una plantilla de Excel 2016.

3.6. Procedimientos

3.6.1. Reactivación de las cepas

Se descongelaron a las cepas madre de las muestras preservadas a una temperatura de -20°C del congelador vertical -20°C (Mirray), manteniendo el radio de descontaminación con un Mechero de Bunsen se extrajo dos asadas de la muestra y se sembró en el Caldo Trypticase Soya CTS (Oxoid®, UK), posteriormente se incubo a 37°C durante 24 horas. Teniendo la siembra enriquecida en el caldo tripticase soya CTS (Oxoid®, UK) se extrajeron una asada del cultivo y se esparció por agotamiento en placas de Agar MacConkey (Oxoid®, UK) (Koneman y Allen, 2008).

3.6.2. Identificación bacteriana y Susceptibilidad a los antimicrobianos

La identificación se realizó a partir de un cultivo microbiológico de las cepas en el Agar MacConkey (Oxoid®, UK) siguiendo lo descrito por Koneman y Allen (2008), posteriormente se confirmó con el sistema MicroScan® que posee sustratos diferenciales de identificación bioquímica mediante el uso de sustratos clásicos, del mismo modo se determinó la resistencia y susceptibilidad antibiótica. La tipificación de los paneles (tipo 66) se realizó por intermedio del software LabPro y Whonet v5.6, el cual emitió una base de datos del perfil de resistencia y susceptibilidad antimicrobiana, según criterios del Clinical & Laboratory Standards Institute [CLSI] (2020) registrando como sensible-S, intermedio-I y resistente-R.

La presencia de BLEE se corrobora mediante el CLSI (2020). Se empleo la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603 como control positivo para BLEE y *E. coli* ATCC 25922 como el control negativo (Marcos -Carbajal et al., 2021). Las cepas aisladas e identificados como *E. coli* positivas para BLEE se conservaron en crioviales de 2ml con TSA a 4°C (Galván et al., 2016).

3.6.3. Extracción del ADN genómico

La extracción de ADN se dio dentro de una Cabina de flujo laminar (Esco), para lo cual se empleó 0.5 ml de cultivo bacteriano, por consiguiente, se procedió a aplicar el método descrito en el protocolo del fabricante kit innuPREP Bacteria DNA (Analytikjena, Alemania) (Analytikjena, 2009).

3.6.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de los genes bla: CTX-M, TEM, SHV y PER se realizó bajo los estándares de PCR para betalactamasas de Kiratisin et al. (2008) y (Arce-Gil et al., 2013). Y se emplearon los primers específicos descritos (**Tabla 4**).

Tabla 4

Secuencia de primers (forward-reverse) para la PCR.

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Tamaño del amplicon
CTX-M	GAAGGTCATCAAGAAGGTGCG	GCATTGCCACGCTTTTCATAG	544
TEM	TCCGCTCATGAGACAATAACC	TTGGTCTGACAGTTACCAATGC	931
SHV	TGGTTATGCGTTATATTCGCC	GGTTAGCGTTGCCAGTGCT	868
PER	ATGAATGTCATCACAAAATG	TCAATCCGGACTCACT	927

Nota. Referencia de primers: CTX-M (Arce-Gil et al. 2013) y TEM, SHV y PER (Kiratisin et al. 2008).

La preparación del Master Mix (MM) se realizó bajo una Cabina de flujo laminar (Esco) Modelo PCR-4A, los cuales fueron ajustados a una concentración final de 25 μ L siguiendo los términos descritos en el protocolo estandarizado del Laboratorio (LIBM). Para la reacción se emplearon solución tampón para PCR 10X incluido Magnesio (10 μ L), Desoxinucleósidos trifosfato (1 μ L), Primer-F (0.5 μ L), Primer-R (0.5 μ L), agua ultrapura (17.3 μ L), Taq polimerasa (0.2 μ L) y ADN genómico (2.5 μ L).

La programación del termociclador se configuro siguiendo los puntos mencionados a continuación: 1. Denaturación, 2. Anidamiento, 3. Extensión.

Gen bla	Thermocycler Program			
	Cycle	Temp (°C)	Time	Repeat
CTX-M y TEM	1	94	5 min	1x
		94	50 sec	35x
	2	55	50 sec	
	3	72	1 min	
		72	5 min	1x
Hold	8	∞		
SHV	1	94	5 min	1x
		94	30 sec	35x
	2	55	1 min	
	3	72	1 min	
		72	10 min	1x
Hold	8	∞		
PER	1	94	5 min	1x
		94	1 min	35x
	2	55	1 min	
	3	72	1 min	
		72	5 min	1x
Hold	8	∞		

3.6.5. Electroforesis

Los productos de la amplificación, se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y una disolución tampón formada por Tris, Acetato y EDTA (Buffer TAE-1X, Lac Biotecnología), a 120 voltios por 40 minutos de acuerdo al protocolo estandarizado en el laboratorio (LIBM, 2019), como buffer de carga se usó Safe Green y para verificar el tamaño del DNA amplificado empleamos un marcador de peso molecular de 100 pb. Para la lectura de los geles se empleó un fotodocumentador de marca Cleaver Scientific. En cada corrida del gel de agarosa se adicionaron un control positivo y negativo para cada gen correspondiente. Los resultados obtenidos fueron registrados en una plantilla Excel 2016.

3.7. Análisis de datos

En las variables numéricas se aplicó la medida de tendencia central. Y las variables categóricas fueron descritas mediante el uso de frecuencias relativas (porcentajes). El análisis de datos se realizó en el software estadístico Stata® v16. La identificación y el análisis del perfil de susceptibilidad antibiótica fueron emitidas por los programas LabPro® y Whonet (World Health Organization Net v. 5.6). Los mapas de calor fueron diseñados en el programa Microsoft Excel.

3.8. Consideraciones éticas

El protocolo del estudio de investigación cuenta con la aprobación por el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Peruana Unión, con código N2019-CEUPeU-0001 y por los hospitales quienes donaron y autorizaron el análisis de las muestras para este estudio.

IV. RESULTADOS

Nuestra población de estudio inicial abarcó 94 pacientes hospitalizados referentes a los tres principales centros de salud con atención de nivel II y nivel III en la región selva del Perú. De los cuales, se identificó 68 muestras de pacientes con infecciones por *E. coli* (n=68), el resto fueron excluidos por presentar otro tipo de enterobacterias. De tal forma como se observa en la Tabla 5, nuestro análisis prosiguió con las 68 muestras identificadas como *E. coli*. De entre estos pacientes la mayoría albergó *E. coli* productora de BLEE (n=40, 58.8%). Siendo los pacientes femeninos con mayor frecuencia en presentar dicha infección (n=33, 48.5%).

En relación a los grupos etarios, el 10,3 % de los pacientes (n=7) fueron mayores de 60 años, el 19,1% (n=13) pertenecieron al rango de 41-60 años, el 23,5% (n=16) se encontraron entre 21-40 años, y el 5,9 % (n=4) fueron menores o iguales de 20 años. El rango de edad de los grupos etarios estudiados y confirmados con *E. coli* productoras de BLEE abarcó de entre 1 a 85 años, siendo la media de edad $41,4 \pm 19,1$.

De los tres establecimientos de salud que participaron en el estudio, los pacientes provenientes del Hospital Regional de Pucallpa fueron los más habituales en presentar la infección por *E. coli* BLEE (n=16, 23,5%). El mayor aislamiento de cepas *E. coli* BLEE, fueron en el año 2017 (n=22, 32.3%). El mayor número de los *E. coli* BLEE que se aislaron fueron de las muestras de orina (n=36, 52.9%), seguido de secreción vaginal (n=2, 2.9%), finalmente de sangre (n=1, 1.5%) y tubo traqueal (n=1, 1.5%) (Tabla 5).

Tabla 5*Descripción de las variables generales del estudio.*

Variable	Valor	<i>Escherichia coli</i> (n=68)	
		BLEE n (%)	No BLEE n (%)
Genero	Masculino	7 (10,8)	5 (7,3)
	Femenino	33 (48,5)	23 (33,8)
Grupo de edad	≤20	4 (5,9)	3 (4,4)
	21-40	16 (23,5)	13 (19,1)
	41-60	13 (19,1)	6 (8,8)
	>60	7 (10,3)	6 (8,9)
Hospital	HSR	10 (14,7)	21 (30,9)
	HRP	16 (23,5)	3 (4,4)
	HRL	14 (20,6)	4 (5,9)
Año de muestreo	2017	22 (32,3)	12 (17,6)
	2018	18 (26,5)	16 (23,5)
Tipo de muestra	Orina	36 (52,9)	28 (41,2)
	Sangre	1 (1,5)	0,0
	Secreción vaginal	2 (2,9)	0,0
	Tubo traqueal	1 (1,5)	0,0

Nota. HRS: Hospital Regional Santa Rosa (Puerto Maldonado), HRP: Hospital Regional Pucallpa, HRL: Hospital Regional "Felipe Santiago Arriola Iglesias" (Loreto).

La Tabla 6 detalla el porcentaje de resistencia y susceptibilidad de los antibióticos confrontados a las *E. coli* (n=68). Se resaltó que los aislados fueron altamente resistentes frente a los antibióticos como la ampicilina con 76.5%, cefotaxima el 72,1%, ciproflaxina el 69.1%, aztreonam el 67.6%, cefepima el 66.2% y ante cefuroxima el 63.2%. Sin embargo, fueron sensibles ante los antibióticos como la amikacina, imipenem, meropenem y tigeciclina.

Tabla 6*Porcentaje de susceptibilidad antimicrobiana en E. coli.*

Antibióticos	Sensible	Intermedio	Resistente
	n (%)	n (%)	n (%)
Amikacina	64 (94,1)	4 (5,9)	0,0
Amox/A Clav	50 (73,5)	11 (16,2)	7 (10,3)
Amp/Sulbactam	30 (44,1)	19 (27,9)	19 (27,9)
Ampicilina	14 (20,6)	2 (2,9)	52 (76,5)
Aztreonam	17 (25)	5 (7,4)	46 (67,6)
Cefepima	22 (32,3)	1 (1,5)	45 (66,2)
Cefotaxima	18 (26,5)	1 (1,5)	49 (72,1)
Ceftazidima	26 (38,2)	15 (22,1)	27 (39,7)
Cefuroxima	19 (27,9)	6 (8,8)	43 (63,2)
Ciprofloxacina	21 (30,9)	0,0	47 (69,1)
Colistina	65 (95,6)	0,0	3 (4,4)
Ertapenem	67 (98,5)	0,0	1 (1,5)
Gentamicina	35 (51,5)	8 (11,8)	25 (36,8)
Imipenem	100	0,0	0,0
Meropenem	100	0,0	0,0
Pip/Tazo	62 (91,2)	2 (2,9)	4 (5,8)
Tigeciclina	67 (98,5)	1 (1,5)	0,0
Tobramicina	35 (51,5)	6 (8,8)	27 (39,7)
Trimet/sulfameto	30 (44,1)	5 (7,4)	33 (48,5)

Nota. Amox/A Clav: amoxicilina con ácido clavulánico; Amp/Sulbactam: Ampicilina con sulbactam; Pip/Tazo: Piperacilina con tazobactam; Trimet/sulfameto: Trimetoprim sulfametoxazol.

La caracterización génica de *E. coli*, se realizó mediante PCR, en el cual se detectaron los grupos de genes bla: CTX-M, TEM y SHV en 50%, 14,7% y 11,8% respectivamente (Tabla 7). De entre todos los aislados, ninguno del grupo bla PER se detectó.

Tabla 7

Descripción general de la frecuencia de E. coli fenotipo BLEE y los genes de β - lactamasas detectados en el estudio.

Microorganismo (n=68)	BLEE n (%)	CTX-M n (%)	TEM n (%)	SHV n (%)	PER n (%)	
<i>Escherichia coli</i>	Positivo	40 (58,8)	34 (50)	10 (14,7)	8 (11,8)	0,0
	Negativo	28 (41,2)	34 (50)	58 (85,3)	60 (88,2)	0,0

Con relación a la distribución de β - lactamasas por hospital (Tabla 8), se registró que la mayoría de las cepas *E coli* BLEE pertenecieron al Hospital Regional de Pucallpa (n=16, 23.5%), y se detectó comúnmente el gen bla CTX-M (n=16, 23,5%), seguido del gen bla TEM (n=2, 2.9%) y por último el gen bla SHV (n=2, 2.9%) y el gen bla PER (0%). En el Hospital Regional de Loreto la frecuencia de *E. coli* BLEE fue (n=14, 20.6%), y la detección del gen bla CTX-M fue el más prevalente (n=12, 17.7%) con respecto al gen bla SHV (n=2, 2.9%), y sin presencia de los genes bla TEM y bla PER. En cuanto al Hospital Santa Rosa, la frecuencia de los *E. coli* BLEE fue menor (n=10, 14.7%), la detección del gen bla TEM fue el más frecuente (n=8, 11.8%), seguido del gen bla CTX-M (n=6, 8.8%), por último, el gen bla SHV (n=4, 5,6%) y ninguno codifico para el gen bla PER. Cabe resaltar que algunas cepas bacterianas codificaron más de un gen.

Tabla 8

Detección de genes de betalactamasas de espectro extendido en E. coli según hospital de procedencia

Hospital	N° cepas (n)	BLEE + n (%)	bla CTX-M n (%)	bla TEM n (%)	bla SHV n (%)	bla PER n (%)
Santa Rosa	31	10 (14,7)	6 (8,8)	8 (11,8)	4 (5,8)	0,0
Regional de Pucallpa	19	16 (23,5)	16 (23,5)	2 (2,9)	2 (2,9)	0,0
Regional de Loreto	18	14 (20,6)	12 (17,7)	0,0	2 (2,9)	0,0
Total	68	40 (50,8)	34(50)	10(14,7)	8(11,8)	0,0

En la Figura 1, se observa la caracterización molecular de los *E. coli* BLEE (n=40, 58.8%) detectados mediante PCR. Como se distingue, el 15% de las cepas codifico más de un tipo de gen. Siendo el 7,5% (n=3) codificantes de los genes bla: TEM, CTX-M y SHV. El 10% (n=4) codificantes para las enzimas de tipo CTX-M y TEM y por último el 5% (n=2) codificaron para las enzimas de tipo CTX-M y SHV. La detección de gen bla PER se mantuvo ausente. Gráficamente observando se distingue que la detección del gen bla CTX-M es la más frecuente en nuestra población de estudio.

Se resalta que el 42% de las cepas mostraron un fenotipo multidrogo resistente (MDR), es decir que fueron resistentes a más de dos tipos de antibióticos, por lo general estas cepas multidrogoresistentes codificaron más de un tipo de gen. El 16,1 % (n=11) de las cepas fueron la excepción de no presentar la multidrogoresistencia, pero si codificaron al menos un tipo de gen de betalactamasa. El 3% (n=2) de las cepas fueron sospechosas ante una posible resistencia al antibiótico descrito, como es el tazobactam. Finalmente, el 11,8% (n=8) fueron sensibles a todos los antibióticos expuestos, sin embargo, mediante el análisis molecular se detectó el gen bla CTX-M y bla SHV.

Los aislados multidrogo resistentes evaluadas en el Hospital Santa Rosa y Hospital Regional de Loreto demostraron resistencia frente a ampicilina con sulbactam, ampicilina, aztreonam, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima, ciprofloxacina, tobramicina y trimetoprim sulfametoxazol. En cuanto al Hospital Regional de Pucallpa la distribución de aislados multidrogo resistentes es mínima, pero se detectó con mayor frecuencia el gen blaCTX.

V. DISCUSION DE RESULTADOS

La propagación de bacterias productoras de BLEE ha sido sorprendentemente rápida en todo el mundo, lo que indica que se requieren absolutamente sistemas de monitoreo continuo y medidas efectivas de control de infecciones (Kiratisin et al., 2008). En nuestro estudio, a partir de 68 muestras identificadas como *E. coli*, colectados durante el periodo 2017 y 2018, de pacientes hospitalizados en los tres establecimientos de salud descritos en la selva peruana, se encontró que el 58,8% de los aislados fueron BLEE positivos, siendo esta frecuencia similar al estudio realizado por Arce-Gil et al. (2014) en la ciudad de Chiclayo, donde encontró que de los aislados de *E. coli* en 50 pacientes con infecciones urinarias, todas fueron confirmadas como BLEE positivos.

Según el análisis en los grupos etarios, el hallazgo de los *E. coli* positivas para BLEE aisladas habitualmente, fueron en las edades comprendidas entre 21 a 40 y 41 a 60 años con el 23,5% y 19,1% respectivamente, y el 10,3% en los pacientes mayores de 60 años. Dicho resultado es similar al estudio reportado por Marcos-Carbajal et al. (2020), realizado en los establecimientos de salud privados de Perú, siendo los grupos etarios de entre los 31- 45 y mayores de 61 años donde la prevalencia de *E. coli* BLEE positivos fueron de 26,5% y 24,5 % respectivamente. Otro estudio respecto al grupo etario, reportado por Ticona (2014), describe que la edad donde uno puede adquirir una infección urinaria por BLEE, suele ser diferente en pacientes masculinos y femeninos, de modo que el género masculino concibe cuando es mayor de edad, dado al factor agregado, como es el caso de la Hiperplasia Benigna de Próstata.

Habiendo aislado *E. coli* BLEE de los pacientes de sexo femenino en un 48,5%, comprobamos que se ajusta con lo expuesto por Galván et al. (2016), en su estudio con los pacientes ambulatorios de Lima, del cual el 88,7% fueron detectados en el sexo femenino. Con respecto a estos resultados se ha demostrado que las micro ARN están codificados en el cromosoma X, estas moléculas debilitan la capacidad de resistir la enfermedad al silenciar los

genes de la defensa inmune, pero como el género femenino posee dos cromosomas X, su cuerpo es más capaz de compensar la debilidad a diferencia de los hombres. Pero una vez que se ha adquirido la infección, puede provocar una inflamación más grave (British Broadcasting Corporation [BBC], 2011; Pabón-Martínez, 2011). Según Ticona (2014) las características anatómicas también influyen, una de ellas es el tramo reducido entre el ano y la uretra que poseen las mujeres, lo que conlleva a una infección urinaria.

La resistencia a los antimicrobianos generalmente tiene peculiaridades locales. Los promedios nacionales pueden enmascarar diferencias importantes entre las instalaciones que informan sobre la vigilancia (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2009). Para evaluar este aspecto, se comparó la resistencia antimicrobiana en *E. coli* para cada hospital descrito en nuestro estudio.

En el análisis de las cepas aisladas de cada hospital, encontramos que el Hospital Regional de Loreto describe el 26,6% de cepas productoras de BLEE, lo cual difiere al estudio evaluado por Carbajal (2018) realizado en el Hospital Regional de Loreto, durante 2017-2018; sostiene que el 58,1% de las cepas de *E. coli* dieron positivo para BLEE. Para el Hospital Regional de Pucallpa resaltamos que el 23,3% de las cepas fueron BLEE productoras, a comparación con lo expuesto por Navarro y Rojas (2017) donde describe que las *E. coli* productoras de BLEE aisladas en Hospital II ESSALUD – Pucallpa, fueron el 53%. Para el caso del Hospital Santa Rosa, los reportes son limitados, lo cual es recomendable continuar investigando sobre el tema de resistencia bacteriana en esta localidad con enfoques a nivel genético.

Se determinó que la resistencia frente a los antibióticos, tales como ampicilina, cefotaxima, ciproflaxina, aztreonam, cefepima y cefuroxima fue alta. Dichos resultados de resistencia y susceptibilidad antibiótica concuerdan con lo expuesto por Marcos-Carbajal et al., (2021), excepto para Cefotaxima y Aztreonam. Oliveira et al. (2011), describe que la

resistencia a múltiples antibióticos en las regiones del continente americano, generan el 95% de resistencia en *E. coli* uropatógena para un solo antibiótico y el 42% de multirresistencia.

Con respecto a los aislados de *E. coli*, expuestos a los antibióticos como amikacina, imipenem, meropenem y tigeciclina no se evidencio resistencia. Por tal motivo, estos antibióticos podrían ser considerados para la medicación de pacientes con infección al tracto urinario provocadas por *E. coli* resistentes a múltiples antimicrobianos (Morejón, 2013; Aguilar-Zapata, 2016).

En los últimos acontecimientos, los reportes a nivel mundial circularon entorno de las enzimas TEM y SHV, pero en instancias el aumento de bla CTX-M va extendiéndose (Bevan et al., 2017; Ayzanoa, 2021). Nuestro análisis a nivel molecular indicó que el gen blaCTX-M presento una frecuencia de 50%, seguida del bla TEM (14,7%) y bla SHV (11,8%). De acuerdo con Galván et al. (2016), que resalta al tipo de gen *bla* CTX-M en 55% y Hernández (2009) quien describe que la diseminación de los genes a nivel nosocomial es de 54.1%, 34.7% y 11.1% para bla: CTX-M, TEM y SHV, respectivamente; y para los pacientes comunitarios la prevalencia de *bla*CTX-M, *bla*TEM y *bla* SHV es de 14.7%, 27.7% y 17.5%, respectivamente.

Según señalado anteriormente, se puede observar que la prevalencia del gen bla CTX-M sobrepasa a otros tipos de genes *bla*. Conforme a ello, Kpoda et al. (2018) describe que los nosocomios externos a Latinoamérica no son una excepción al hecho de presentar casos de resistencia bacteriana con varios genes codificantes de *bla*CTX-M, gen *bla*TEM y gen *bla*SHV detectados en los tres hospitales principales de Uagadugú en Burkina Faso. Del mismo modo Mahazu et al. (2022) sostiene que los genes de tipo CTX-M de *E. coli*, y sus variantes blaCTX-M-15 y blaCTX-M-14 son los más comunes en todo el mundo; sin embargo, los datos sobre la prevalencia de estos genes en Ghana son limitados. Según la definición anterior sostenemos que los datos epidemiológicos locales son importantes para implementar una terapia antimicrobiana apropiada y medidas efectivas de control de infecciones.

Con respecto al reporte de los pacientes pertenecientes al Hospital Santa Rosa encontramos que el bla TEM fue el más frecuente siendo el 11,8%, lo cual concuerda con lo descrito por Alarcón et al. (2014), quien también resalta que *E. coli* BLEE en los pacientes comunitarios de Chilpancingo, México; codificaron con mayor frecuencia los genes *bla*TEM (94,4%), seguidos por *bla*CTX-M (50%) y *bla* SHV (5,5%). Del mismo modo, Marcos-Carbajal et al. (2021) reporta que, en su investigación realizado en hospitales públicos del Perú, encontró que *E. coli* codificadores del gen bla TEM fueron los más frecuentes.

Detectamos que el 15% de las cepas albergan más de un tipo de gen diferente, siendo el 7,5% portadores de los tres tipos de genes bla: CTX-M, TEM y SHV; el 10% presentaron el gen de tipo blaCTX-M y blaTEM, mientras que el 2,5% de las cepas codificaron las enzimas de tipo CTX-M y SHV. Reportes similares son los encontrados por Herrera et al. (2019) donde señala que el 82,3% de las cepas codificó a más de un tipo de gen de β -lactamasas, y el 53,2% de cepas codificó hasta tres tipos de tres genes bla.

Según expuesto por Abarca y Herrera (2001) la diferencia en los niveles de resistencia bacteriana, se definen por la capacidad de las β -lactamasas en hidrolizar el antimicrobiano, y también por el número de mecanismos de resistencia existentes. Observamos que las cepas aisladas en nuestro estudio codificaron uno o más genes, el cual implica una multiresistencia difícil para el tratamiento habitual en los pacientes.

Los *E. coli* multiresistentes fenotípicamente estudiados fueron más prevalentes en el Hospital Santa Rosa y Hospital regional de Loreto, por otra parte, para el Hospital regional de Pucallpa no hubo hallazgos de cepas *E. coli* multidrogoresistentes. Sin embargo, mediante la caracterización molecular resultaron ser productoras de Betalactamasas, donde se detectó el gen blaCTX-M con mayor frecuencia, dichos hallazgos sugieren que los factores tales como ambientales y socioeconómicos podrían estar influyendo en el perfil de susceptibilidad de cada

agente etiológico, debido a que habitamos en un país con ecosistema diverso (Instituto Geográfico Nacional [IGN], 1989).

Siendo *E. coli* un patógeno oportunista, motivo más común de las infecciones urinarias, de septicemia y adquirida de los alimentos, también el principal propulsor de presión en la elección de los antibióticos que conlleva a la resistencia bacteriana. Según lo expuesto, se ha encontrado poca investigación publicada que explore este tema a nivel genético en la selva peruana. En consecuencia, presentamos que nuestros hallazgos proporcionan una información importante sobre las características fenotípicas y moleculares en cepas *E. coli* BLEE dentro y entre poblaciones de la región selva. Según Bryce et al. (2016) es importante considerar a países en vías de desarrollo, como es el caso de nuestro país donde los antibióticos están generalmente disponibles sin receta médica. Lo cual es recomendable seguir una receta médica para discernir la resistencia antimicrobiana.

VI. CONCLUSIONES

- La resistencia frente a los antibióticos como ampicilina, aztreonam, cefepima, cefotaxima, cefuroxima y ciproflaxina fue alta, estudiadas en los tres hospitales: Hospital Santa Rosa, Hospital Regional Pucallpa y el Hospital Regional de Loreto.
- No se hubo resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos como amikacina, imepenem, meropenem y tigeciclina en los hospitales anteriormente mencionados.
- El gen blaCTX-M (50%) fue detectado habitualmente en las cepas de *E. coli* portadoras de betalactamasa de espectro extendido, analizados en los tres hospitales mencionados.
- La detección del gen bla TEM (11,8%) se dio con mayor frecuencia en cepas de *E. coli* BLEE aisladas en pacientes del Hospital Santa Rosa.
- El 11,8% de las cepas aisladas en el Hospital Regional de Pucallpa no fueron multirresistentes, pero según el análisis molecular se detectó el gen bla CTX-M y un mínimo número de cepas codificaron tanto bla: CTX-M y TEM.
- El 15% de los *E. coli* positivos para *BLEE*, aislados de los tres hospitales mencionados, codificó entre dos a más genes de resistencia frente a antimicrobianos expuestos en este estudio.

VII. RECOMENDACIONES

- Ampliar las investigaciones y realizar el seguimiento de otras enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido procedentes de los hospitales del Perú.
- Continuar trabajando en restablecer los métodos microbiológicos y moleculares para el hallazgo de *Escherichia coli* y otros agentes etiológicos BLEE en otras regiones del Perú.
- Incrementar el desarrollo de la búsqueda de genes BLEE en los aislados de *E. coli* detectados en esta investigación a nivel región selva y otras regiones del Perú.
- Proseguir el estudio con la detección de otro tipo de genes resistentes en *E. coli* negativos para BLEE presentados en este estudio.
- Crear ensayos y medidas de vigilancia epidemiológica de *Escherichia coli* en otros establecimientos de salud aledañas a la región selva del Perú.

VIII. REFERENCIAS

- Aalpona, F. Z., & Kamrul-Hasan, A. B. (2020). Study of Bacterial Pathogens in Urinary Tract Infection and their Antimicrobial Sensitivity Pattern in the Setting of Gynecology Outpatient Department. *Mymensingh Medical Journal: MMJ*, 29(4), 838-846.
- Adekanmbi, A. O., Usidamen, S., & Onilude, A. A. (2021). Molecular characterization of ESBL- producing uropathogenic *Escherichia coli* recovered from urine samples of patients attending a University Teaching hospital in Nigeria. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica*. <https://doi.org/10.1556/030.2021.01380>
- Aguilar-Zapata, D. (2016). *E. coli* BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. *Médica Sur*, 22(2), 57-63.
<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=67244>
- Castro-Alarcón, N., Salgado-Gonzalez, J. F., Ocampo-Sarabia, R. L., Silva-Sánchez, J., y Ruíz-Rosas, M. (2014). Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido producidas por *Escherichia coli* de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, México. *Tlamati*, 5(1), 14-23. [chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglcfindmkaj/http://tlamati.uagro.mx/images/Archivos/Tlamati_Vol_5_2014/Castro-Alarcon_et_al_2014.pdf](http://tlamati.uagro.mx/images/Archivos/Tlamati_Vol_5_2014/Castro-Alarcon_et_al_2014.pdf)
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Ilio, C. D. (2013). *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- Alós, J.-I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: Una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692-699.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Andersen, J. L., He, G.-X., Kakarla, P., Kc, R., Kumar, S., Lakra, W. S., Mukherjee, M. M., Ranaweera, I., Shrestha, U., Tran, T., & Varela, M. F. (2015). Multidrug Efflux Pumps

from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* Bacterial Food Pathogens. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(2), 1487. <https://doi.org/10.3390/ijerph120201487>

Arce-Gil, Z., Llontop-Nuñez, J., Alarcón-Benavides, E., & López-López, E. (2014). Detección de los genes SHV, TEM Y CTX-M en cepas de *Escherichia coli* β -lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo- Perú. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, 7(3), 27-30. https://imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=103391&id_seccion=4615&id_ejemplar=10046&id_revista=299

Arce-Gil, Z., Llontop-Nuñez, J., Flores-Clavo, R., y Fernández-Valverde, D. (2013). Detección del gen CTX-M en cepas de *Escherichia coli* productoras de B-lactamasas de espectro extendido procedentes del Hospital Regional de Lambayeque; Chiclayo-Perú: Noviembre 2012-julio 2013. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, 6(4), 12-15. https://imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=99631&id_seccion=4615&id_ejemplar=9717&id_revista=299

Arzanlou, M., Chai, W. C., & Venter, H. (2017). Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays in Biochemistry*, 61(1), 49-59. <https://doi.org/10.1042/EBC20160063>

Ayzanoa Canales, B. S. (2021). *Caracterización genotípica y fenotípica de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias fermentadoras de lactosa aisladas de aguas residuales de un Hospital De Lima, Perú*. [Tesis pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio institucional UNFV. <https://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5448>

- British Broadcasting Corporation (28 septiembre 2011). *Por qué las mujeres son más resistentes a la enfermedad que los hombres*.
https://www.bbc.com/mundo/noticias/2011/09/110928_inmunidad_mujeres_cromoso_mas_men
- Bekal, S., Brousseau, R., Masson, L., Prefontaine, G., Fairbrother, J., & Harel, J. (2003). Rapid Identification of *Escherichia coli* Pathotypes by Virulence Gene Detection with DNA Microarrays. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(5), 2113.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2113-2125.2003>
- Bergšpica, I., Kaprou, G., Alexa, E. A., Prieto, M., & Alvarez-Ordóñez, A. (2020). Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* in Pigs and Pork Meat in the European Union. *Antibiotics*, *9*(10), 678.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9100678>
- Bevan, E. R., Jones, A. M., & Hawkey, P. M. (2017). Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(8), 2145-2155. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx146>
- Bonnet, R., Dutour, C., Sampaio, J. L. M., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R., Champs, C. D., & Sirot, J. (2001). Novel Cefotaximase (CTX-M-16) with Increased Catalytic Efficiency Due to Substitution Asp-240→Gly. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(8), 2269. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.8.2269-2275.2001>
- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, *14*(4), 933-951.
<https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
- Bryce, A, Costelloe C, Hawcroft C, Wootton M, Hay A.D. (2016). Faecal carriage of antibiotic resistant *Escherichia coli* in asymptomatic children and associations with primary care

- antibiotic prescribing: a systematic review and meta-analysis. *BioMed Central infectious diseases*. 16:359. doi: 10.1186/s12879-016-1697-6.
- Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(10), e01076-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969-976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), 1211-1233. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.6.1211>
- Carbajal López, R. A. (2018). *Características clínicas y epidemiológicas asociadas a infecciones del tracto urinario por uropatógenos blee, hospital regional de Loreto 2017-2018*. [Tesis Pregrado, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana]. Repositorio Institucional UNAP. <https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/20.500.12737/5622>
- Cires Pujol, M. (2002). La resistencia a los antimicrobianos, un problema mundial. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 18(2), 165-168. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0864-21252002000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Clinical & Laboratory Standards Institute (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th edition*. <chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>

- Contreras-Martel, C., Dahout-Gonzalez, C., Martins, A. D. S., Kotnik, M., & Dessen, A. (2009). PBP Active Site Flexibility as the Key Mechanism for β -Lactam Resistance in Pneumococci. *Journal of Molecular Biology*, 387(4), 899-909.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.02.024>
- Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 160. <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09>
- Egorov, A. M., Ulyashova, M. M., & Rubtsova, M. Y. (2018). Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance. *Acta Naturae*, 10(4), 33.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6351036/>
- Fernández Riverón, F., López Hernández, J., Ponce Martínez, L. M., y Machado Betarte, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32(1), 0-0.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0138-65572003000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Galván, F., Agapito, J., Bravo, N., Lagos, J., y Tamariz, J. (2016). Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Revista Medica Herediana*, 27(1), 22-29.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1018-130X2016000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Gazouli, M., Legakis, N. J., & Tzouveleki, L. S. (1998). Effect of substitution of Asn for Arg-276 in the cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase CTX-M-4. *FEMS Microbiology Letters*, 169(2), 289-293.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13331.x>
- Ghai, I., & Ghai, S. (2018). Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infection and Drug Resistance*, 11, 523.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S156995>

- Ghiglione B. (2015). *Estudio de las bases bioquímicas y moleculares de la actividad hidrolítica de variantes salvajes y mutacionales de β -lactamasas CTX-M sobre oximino-cefalosporinas. Papel de mutaciones puntuales en la expansión del espectro de hidrólisis*. [Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires]. <https://docplayer.es/58856158-Universidad-de-buenos-aires-facultad-de-farmacia-y-bioquimica-departamento-de-microbiologia-inmunologia-y-biotecnologia-catedra-de-microbiologia.html>
- Gniadkowski, M. (2001). Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clinical Microbiology and Infection*, 7(11), 597-608. <https://doi.org/10.1046/j.1198-743x.2001.00330.x>
- Gniadkowski, M., Pałucha, A., Grzesiowski, P., & Hryniewicz, W. (1998). Outbreak of Ceftazidime-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a Pediatric Hospital in Warsaw, Poland: Clonal Spread of the TEM-47 Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing Strain and Transfer of a Plasmid Carrying the SHV-5-Like ESBL-Encoding Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(12), 3079. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC106002/>
- Hernández Álvarez, E. (2009, junio 24). «*Escherichia coli*» productores de BLEE aislados de urocultivo: Implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria. [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://eprints.ucm.es/id/eprint/10442/1/T31499.pdf>
- Herrera García, M., Arévalo Valdez, C., & Velásquez Porta, T. (2019). Detección de los genes de β -lactamasas blaTEM, blaSHV y blaCTX-M en aislamientos de *Escherichia coli* comunitarios. *Revista científica (Guatemala)*, 28(2), 45-56. <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/50/50602013/html/index.html>

- Instituto Geográfico Nacional (1989). *Atmospheric Laboratory for Applications and Science of Perú*. <https://www.worldcat.org/title/atlas-del-peru/oclc/754993794>
- Kiratisin, P., Apisarntharak, A., Laesripa, C., & Saifon, P. (2008). Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), 2818-2824. <https://doi.org/10.1128/AAC.00171-08>
- Koneman, E. W. y Allen, S. (2008). *Diagnostico Microbiológico*. (6^{ta} ed.). Editorial Médica Panamericana.
https://books.google.com.pe/books?id=jyVQueKro88C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Kpoda, D. S., Ajayi, A., Somda, M., Traore, O., Guessennd, N., Ouattara, A. S., Sangare, L., Traore, A. S., & Dosso, M. (2018). Distribution of resistance genes encoding ESBLs in Enterobacteriaceae isolated from biological samples in health centers in Ouagadougou, Burkina Faso. *BMC Research Notes*, 11(1), 471. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3581-5>
- Kuroda, T., & Tsuchiya, T. (2009). Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1794(5), 763-768.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.012>
- Li, X.-Z., & Nikaido, H. (2009). Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: An Update. *Drugs*, 69(12), 1555. <https://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000>
- Liakopoulos, A., Mevius, D., & Ceccarelli, D. (2016). A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Frontiers in Microbiology*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01374>

- Liu, Y., Li, R., Xiao, X., & Wang, Z. (2019). Molecules that Inhibit Bacterial Resistance Enzymes. *Molecules*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/molecules24010043>
- Mahazu, S., Sato, W., Ayibieke, A., Prah, I., Hayashi, T., Suzuki, T., Iwanaga, S., Ablordey, A., & Saito, R. (2022). Insights and genetic features of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates from two hospitals in Ghana. *Scientific Reports*, 12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05869-6>
- Mancini, S., Poirel, L., Kieffer, N., & Nordmann, P. (2018). Transposition of Tn1213 Encoding the PER-1 Extended-Spectrum β -Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(3). <https://doi.org/10.1128/AAC.02453-17>
- Marcos-Carbajal, P., Galarza-Pérez, M., Huancahuire-Vega, S., Otiniano-Trujillo, M., Soto-Pastrana, J. (2020). Comparación de los perfiles de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* uropatógena e incidencia de la producción de betalactamasas de espectro extendido en tres establecimientos privados de salud de Perú. *Biomédica*, 40, 139-147. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4772>
- Marcos-Carbajal, P., Salvatierra, G., Yareta, J., Pino, J., Vásquez, N., Diaz, P., Martínez, I., Asmat, P., Peralta, C., Huamani, C., Briones, A., Ruiz, M., Laura, N., Luque, Á., Arapa, L., & Tsukayama, P. (2021). Caracterización microbiológica y molecular de la resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* uropatógenas de hospitales públicos peruanos. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 38(1), 119-123. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.381.6182>
- Martínez-Vázquez, A. V., Vázquez-Villanueva, J., Leyva-Zapata, L. M., Barrios-García, H., Rivera, G., & Bocanegra-García, V. (2021). Multidrug Resistance of *Escherichia coli* Strains Isolated From Bovine Feces and Carcasses in Northeast Mexico. *Frontiers in Veterinary Science*, 8:643802. doi: 10.3389/fvets.2021.643802

- Méndez, C., & Salas, J. A. (2001). The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: Drug secretion and resistance mechanisms. *Research in Microbiology*, 152(3), 341-350. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01205-0](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01205-0)
- Miranda Sanabria, J. V. (2018). *Mecanismos de resistencia bacteriana en uropatógenos aislados de pacientes geriátricos en la Clínica Centenario Peruano Japonesa, Enero 2014-Octubre 2016*. [Tesis Pregrado, Universidad Privada San Juan Bautista]. Repositorio institucional USJB. <http://repositorio.upsjb.edu.pe/handle/upsjb/1796>
- Morejón García, M. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*, 52(4), 272-280.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-75232013000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Moreno M, C., González E, R., & Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 69(2), 185-192. <https://doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>
- Mostajo, J. A. G., Díaz, C. A., & Morón, P. R. (2015). Frecuencia de infección del tracto urinario intrahospitalaria por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido y factores asociados en un hospital nacional. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 28(3), 113-120.
<http://51.79.48.69/index.php/spmi/article/view/143>
- Navarro, A. C., & Rojas, D. (2017). *Factores de riesgo asociados a infección urinaria intrahospitalaria por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en un hospital privado de Pucallpa: 2014 - 2016*. [Tesis Pregrado, Universidad de San Martín de Porres]. Repositorio institucional USMP. <https://repositorio.usmp.edu.pe/handle/20.500.12727/4866>

- Neyfakh, A. A., Borsch, C. M., & Kaatz, G. W. (1993). Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *37*(1), 128-129. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.1.128>
- Olarte-Luis, T., Cáceres-Galíndez, D., Cortés, J. A. (2018). Nuevas cefalosporinas. *Revista chilena de infectología*, *35*(5), 465-475. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000500465>
- Oliveira, F. A., Paludo, K. S., Arend, L. N. V. S., Farah, S. M. S. S., Pedrosa, F. O., Souza, E. M., Surek, M., Picheth, G., & Fadel-Picheth, C. M. T. (2011). Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Genetics and Molecular Research*, *10*(4), 4114-4125. <https://doi.org/10.4238/2011.October.31.5>
- Oliver y Cantón, A. (s. f.). *Enterobacterias productoras de β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido*.
chromeextension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Blees.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (2020). *Resistencia a los antimicrobianos*.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Pabón-Martínez, Y. V. (2011). MicroARNs: Una visión molecular. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, *43*(3), 289-297.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-08072011000300010&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Paredes Gago, R. (2013). *Prevalencia de enterobacteriáceas productoras de betalactamasas de espectro extendido (Blee) en la clínica Good Hope durante el periodo marzo – agosto del 2012*. [Tesis Pregrado , Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/3497>

- Ministerio de Defensa & Instituto Geográfico Nacional (1989). *Atlas del Perú*.
<https://www.worldcat.org/title/atlas-del-peru/oclc/754993794>
- Quiñones Pérez, D. (2017). Resistencia antimicrobiana: Evolución y perspectivas actuales ante el enfoque «Una salud». *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(3), 1-17.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602017000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=pt
- Rada, A. M., Hernández-Gómez, C., Restrepo, E., Villegas, M. V., Rada, A. M., Hernández-Gómez, C., Restrepo, E., & Villegas, M. V. (2019). Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. *Biomédica*, 39, 199-220. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351>
- Seiple, I. B., Zhang, Z., Jakubec, P., Langlois-Mercier, A., Wright, P. M., Hog, D. T., Yabu, K., Allu, S. R., Fukuzaki, T., Carlsen, P. N., Kitamura, Y., Zhou, X., Condakes, M. L., Szczypiński, F. T., Green, W. D., & Myers, A. G. (2016). A Platform for the Discovery of New Macrolide Antibiotics. *Nature*, 533(7603), 338.
<https://doi.org/10.1038/nature17967>
- Sharma, M., Pathak, S., & Srivastava, P. (2013). Prevalence and antibiogram of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) producing Gram negative bacilli and further molecular characterization of ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 7(10), 2173.
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/6460.3462>
- Sidjabat, H. E., & Paterson, D. L. (2015). Multidrug-resistant *Escherichia coli* in Asia: Epidemiology and management. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(5), 575-591. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1028365>
- Singh, S., Charani, E., Wattal, C., Arora, A., Jenkins, A., & Nathwani, D. (2019). The State of Education and Training for Antimicrobial Stewardship Programs in Indian Hospitals-

- A Qualitative and Quantitative Assessment. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 8(1), E11.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics8010011>
- Smith E, Lichten CA, Taylor J, MacLure C, Lepetit L, Harte E & Dujso E. & RAND Europe. (2016). *Evaluation of the EC Action Plan against the rising threats from antimicrobial resistance: Final report*. <https://data.europa.eu/doi/10.2875/42939>
- Stec, B., Holtz, K. M., Wojciechowski, C. L., & Kantrowitz, E. R. (2005). Structure of the wild-type TEM-1 β -lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 61(8), 1072-1079.
<https://doi.org/10.1107/S0907444905014356>
- Ticona, J. C. J. (2014). *Características clínicas y microbiológicas de las infecciones del tracto urinario por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes hospitalizados, servicio de medicina interna del hospital nacional Carlos Alberto Seguí Escobedo, EsSalud, Arequipa 2012 – 2013*. [Tesis Pregrado de Medicina Humana, Universidad Católica de Santa María]. Repositorio institucional UCSM. <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/4780>.
- Torres, D. (2014). *Resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el periodo agosto-septiembre 2013*. [Tesis Pregrado, Universidad Técnica de Ambato]. <http://dspace.utpl.edu.ec/jspui/handle/123456789/10825>
- Yu, D., Banting, G., & Neumann, N. F. (2021). A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 67(8), 553-571. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0508>

IX. ANEXO

Anexo A

Flujograma de trabajo experimental en el laboratorio de investigación.



