



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS DE
ESPECTRO EXTENDIDO EN ENTEROBACTERIAS FERMENTADORAS DE LACTOSA
AISLADAS DE AGUAS RESIDUALES DE UN HOSPITAL DE LIMA, PERÚ.

Línea de investigación:

Salud Pública

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

Autor (a):

Ayzanoa Canales, Brenda Solange

Asesor (a):

Salas Asencios, Ramsés
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Jurado:

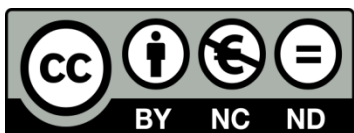
Nolasco Cardenas, Oscar Patricio
Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel
Mayanga Herrera, Ana Lucia

Lima - Perú

2021

Referencia:

Ayzanoa Canales, B. (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 de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5448>



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

**CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS
DE ESPECTRO EXTENDIDO EN ENTEROBACTERIAS FERMENTADORAS DE
LACTOSA AISLADAS DE AGUAS RESIDUALES DE UN HOSPITAL DE LIMA,
PERÚ.**

Línea de Investigación:

Salud Publica

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

Autor(a):

Ayzanoa Canales, Brenda Solange

Asesor(a):

Salas Asencios, Ramsés

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4075-1736>

Jurado:

Nolasco Cardenas, Oscar Patricio

Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel

Mayanga Herrera, Ana Lucia

Lima – Perú

2021

Agradecimientos

Agradecer a Dios por la oportunidad que me dio para poder finalizar este trabajo de investigación. Un agradecimiento especial a mis mentores que estuvieron conmigo durante todo el proceso, guiándome y permitiéndome aprender cada día más.

A mis padres por haberme apoyado incondicionalmente durante toda mi carrera profesional, por creer en mis capacidades y habilidades; por levantarme y darme ánimos cuando las cosas no se tornaban tan simples.

Por último, pero no menos importante a mis amigos más cercanos, por apoyarme y escucharme cuando mas los necesitaba. Todo lo que he logrado ha sido por el apoyo de todos, estoy muy feliz de la profesional que soy hoy en día.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Descripción y formulación del problema	9
1.2. Antecedentes	10
1.3. Objetivos	14
1.3.1. Objetivo general	14
1.3.2. Objetivos específicos	14
1.4. Justificación	15
1.5. Hipótesis	16
1.5.1. Hipótesis nula	16
1.5.2. Hipótesis alterna	17
II. MARCO TEÓRICO	18
2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación	18
2.1.1. Enterobacterias	18
2.1.2. Resistencia a los antibióticos	18
2.1.2.1. Reducción de permeabilidad en la membrana	18
2.1.2.2. Bombas de eflujo	19
2.1.2.3. Cambios de sitio objetivo de los antibióticos debido a mutación	21
2.1.2.4. Modificación directa de los antibióticos	22
A. Hidrólisis	22
B. Macrólido esterasas	23

	4
2.1.2.5. Modificación de los targets	24
2.1.3. Clasificación de las enzimas betalactámicas	24
2.1.3.1. Clasificación según Ambler	25
2.1.3.2. Clasificación según Bush & Jacoby	26
2.1.4. Producción de enzimas betalactámicas	27
2.1.4.1. Betalactamasas de espectro extendido	28
A. BLEE tipo TEM	28
B. BLEE tipo CTX-M	29
E. BLEE tipo PER, VEB y GES-1	30
2.1.4.2. Betalactamasas de tipo AmpC	31
2.1.4.3. Carbapenemasas.	31
III. MÉTODO	33
3.1. Tipo de Investigación	33
3.2. Ámbito temporal y espacial	33
3.3. Variables	33
3.4. Población y muestra	35
3.5. Instrumentos	35
3.5.1. Equipos	35
3.5.2. Medios de cultivo	36
3.5.3. Reactivos	36
3.6. Procedimientos	38

	5
3.6.1. Recolección de las muestras de agua	38
3.6.2. Identificación de enterobacterias	38
3.6.3. Criopreservación de aislados bacterianos	39
3.6.4. Susceptibilidad a los antimicrobianos	39
3.6.5. Extracción de ADN	39
3.6.6. Identificación de genes BLEE	40
3.6.7. Secuenciamiento genómico-Análisis bioinformático	41
3.7. Análisis de datos	41
IV. RESULTADOS	42
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
VI. CONCLUSIONES	53
VII. RECOMENDACIONES	54
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
IX. ANEXOS	80

RESUMEN

La contaminación de los ecosistemas acuáticos por aguas residuales hospitalarias es uno de los temas de preocupación ambiental y de salud pública actual. Se ha reportado que las aguas residuales de hospitales poseen un microbioma cargado de bacterias resistentes a diversos antimicrobianos. Las enterobacterias conforman un gran porcentaje de estas poblaciones bacterianas y su capacidad de producir betalactamasas de espectro extendido (BLEE) supone un riesgo a la salud pública. La diseminación de estas bacterias a través de efluentes hospitalarios, la falta de un tratamiento eficaz y de sistemas de vigilancia, suponen un escenario de riesgo que facilita la dispersión de estas cepas en ambientes no hospitalarios. El presente estudio tiene como objetivo caracterizar fenotípica y genotípicamente las BLEE en enterobacterias fermentadoras de lactosa aisladas de aguas residuales provenientes de un Hospital de Lima-Perú. Las enterobacterias fueron inicialmente aisladas en medio McConkey, luego fueron identificados mediante pruebas bioquímicas convencionales. Los perfiles de resistencia antimicrobiana fueron procesados mediante la prueba de Kirby Bauer y la producción de aislados BLEE positivos fueron identificadas mediante el método de Jarlier. La identificación de genes de resistencia se realizó mediante PCR convencional y las secuencias genómicas fueron obtenidas mediante el uso de un secuenciador MiSeq de Illumina. Los resultados de este estudio mostraron que la distribución para el fenotipo BLEE positivo fue: *Citrobacter* sp. (37%), *Klebsiella* sp. (24%), y *E. coli* (16%). El análisis de susceptibilidad antimicrobiana reportó que Amoxicilina fue uno de los antibióticos con mayor porcentaje (63.33%), seguido de Cefalotina (38.33%) y Amoxicilina con ácido clavulánico (33.33%). El análisis molecular indicó que el gen CTX-M (35%) fue el más frecuente en este estudio, seguido de OXA-1 (16.67%), TEM (13.33%) y SHV (3.33%).

Palabras clave: betalactamasas de espectro extendido, enterobacterias, aguas residuales.

ABSTRACT

The contamination of aquatic ecosystems by hospital sewage water is one of the topics of environmental concern and current public health. Wastewater from hospitals has been reported to pose a microbiome loaded with bacteria resistant to various antimicrobials. Enterobacteria make up a large percentage of these bacterial poblaciones and their ability to produce extended-spectrum beta-lactamasas (BLEE) is a risk to public health. The dissemination of these bacterias through hospital sewage water, the lack of effective treatment and surveillance systems, supposes a risk scenario that facilitates the dispersion of these strains in other environments. The present study aims to characterize phenotypic and genotypically BLEE in lactose fermenting enterobacteria isolated from residual water from a Hospital in Lima-Peru. The enterobacterias were initially isolated from McConkey, then were identified by means of conventional biochemical tests. The profiles of antimicrobial resistance were processed using Kirby Bauer's method and the production of positive BLEE isolates were identified using the Jarlier method. The identification of resistance genes was carried out using conventional PCR and the genomic sequences were obtained using a MiSeq Illumina sequencer. The results of this study showed that the distribution for the positive BLEE phenotype was: *Citrobacter* sp. (37%), *Klebsiella* sp. (24%), and *E. coli* (16%). The antimicrobial susceptibility analysis reported that Amoxicillin was one of the antibiotics with the highest percentage (63.33%), followed by Cephalotin (38.33%) and Amoxicillin with clavulanic acid (33.33%). The molecular analysis indicated that the CTX-M gene (35%) was the most frequent in this study, followed by OXA-1 (16.67%), TEM (13.33%) and SHV (3.33%).

Key words: extended-spectrum betalactamasas, enterobacteriales, sewage water.

I. INTRODUCCIÓN

Los betalactámicos son los antimicrobianos más utilizados para el tratamiento de las infecciones producidas por enterobacterias. La actividad de estos compuestos se ve comprometida por la creciente proliferación y diversificación de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), enzimas bacterianas con capacidad de hidrolizar y conferir resistencia a los betalactámicos (Rivera et al., 2014). Las BLEE son capaces de hidrolizar a las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, y aztreonam (pero no las cefamicinas o carbapenemasas), pero son inhibidos por el ácido clavulánico (Paterson & Bonomo, 2005). Más de 200 tipos diferentes de betalactamasas de espectro extendido han sido identificadas en todo el mundo; principalmente en la familia Enterobacteriaceae (Zaniani et al., 2012).

Una revisión en el 2018 en agua potable sostiene que los genes más comunes encontrados en bacterias como *Klebsiella* sp., *E. coli*, *Citrobacter* sp., *Acinetobacter* sp. y *Pseudomona* sp., suelen ser blaCTX-M, blaTEM, blaSHV y blaOXA (Tanner et al., 2019). La dispersión de estos genes ha incrementado en los últimos años (Rahman et al., 2018), encontrándose en diferentes fuentes animales, humanas, vegetales y ambientales (Boehmer et al., 2018; Hassen et al., 2018; Huizinga et al., 2018; Ma et al., 2012; Ye et al., 2018).

1.1. Descripción y formulación del problema

El incremento de los genes para betalactamasas de espectro extendido (BLEE), así como el éxito de su diseminación, se debe a su ubicación en plásmidos o elementos genéticos móviles y a los mecanismos de transferencia horizontal, lo que hace posible actualmente detectar genomas

que portan simultáneamente varios genotipos BLEE en una misma cepa bacteriana (Díaz et al., 2017).

Uno de los medios de diseminación de estas bacterias son las fuentes de agua, esto incluye a los efluentes hospitalarios los cuales albergan distintas comunidades bacterianas. El vertimiento de estos efluentes hacia el sistema de alcantarillado muchas veces se realiza sin un tratamiento previo y un control inadecuado, ocasionando la dispersión de bacterias BLEE hacia las comunidades. Sin embargo, en nuestro país no se han reportado estudios de los genes BLEE en aguas residuales provenientes de un sistema hospitalario, por lo que se requiere de una investigación y monitoreo de estos con el fin de controlar futuros brotes comunitarios.

Por lo expuesto, el presente Proyecto plantea el siguiente problema:

¿Se puede caracterizar fenotípica y genotípicamente las betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias fermentadoras de lactosa aisladas de aguas residuales provenientes de un Hospital de Lima, Perú?

¿Es posible que a través de la caracterización genómica de las enterobacterias se pueda monitorear genes BLEE de efluentes hospitalarios, permitiendo plantear un sistema de vigilancia en centros de salud?

1.2. Antecedentes

Al inicio del decenio de 1980, el primer aislado capaz de producir una betalactamasa de espectro extendido (BLEE) fue *Klebsiella pneumoniae*. El aislamiento fue originario del continente europeo (Alemania), proveniente de una infección nosocomial. Los siguientes reportes

fueron encontrados en Francia, Inglaterra y al final de esa década en el continente americano (Bois et al., 1995; G. A. Jacoby et al., 1988; Morones-Esquivel et al., 2016; A. Philippon et al., 1989).

Los primeros genes betalactamasas en aparecer fueron blaTEM y blaSHV, para luego dar lugar a sus derivados blaTEM-1, blaTEM-2 y blaSHV-1 por mutaciones puntuales que amplían su espectro (Rivera et al., 2014). Las primeras especies de enterobacterias que incluían en su genoma el gen blaTEM-1 fueron *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Shigella* spp., y *P. mirabilis*. Y en el caso del gen blaTEM-2 *Shigella* spp. fue la única especie portadora (Roy et al., 1983). La determinación de gen blaSHV en un inicio, sostuvo que este estuvo asociado a *K. pneumoniae*; sin embargo, su derivado blaSHV-1, se ha descrito también en *E. coli* u otros miembros de la familia Enterobacteriaceae. Se ha postulado que el blaSHV-1 puede haberse originado por la separación del gen ubicado inicialmente en el cromosoma de *K. pneumoniae* y, la propagación extracromosómica hacia otras bacterias (Chang et al., 2001).

Hasta finales de los años 90, la mayoría de las BLEE detectadas pertenecían a estas dos familias, que provenían, fundamentalmente, de brotes epidémicos nosocomiales. En el momento actual se han descrito más de 160 tipos de blaTEM y 100 tipos de blaSHV. Estas enzimas son de codificación plasmídica y transferibles a otras bacterias por conjugación, lo que favoreció su rápida dispersión (Morejón García, 2013).

El siguiente gen de importancia en este estudio es blaOXA. Fue identificado originalmente en *Pseudomona aeruginosa*, pero su importancia clínica se sostuvo cuando se aisló en un paciente de Turquía en octubre de 1991. La bacteria era multirresistente, particularmente a la ceftazidima. Esta resistencia fue transferible, y como consecuencia se generaron otras variantes de este gen (L. M. Hall et al., 1993). El primer reporte de genes en esta clasificación fueron los genes blaOXA-1,

blaOXA-2 y blaOXA-3, clasificados mediante su punto isoeléctrico, inhibidos por iones de cloruro y reportados en enterobacterias (Sykes & Matthew, 1976).

Otro grupo de enzimas son las blaCTX-M, las cuales no alcanzaron prominencia sobre las otras BLEE hasta la primera década del 2000 cuando se observó una acelerada evolución y extraordinaria dispersión de estas enzimas. Estaban confinados no solo al entorno hospitalario sino también a la comunidad, siendo *E. coli* el patógeno más importante que produce estas enzimas (Cantón et al., 2008). Los genes blaCTX-M se movilizaron y se incorporaron en elementos genéticos móviles. Esto también les dio a las enzimas CTX-M la oportunidad de mejorar la actividad hidrolítica contra ceftazidima generando nuevas variantes (Cantón et al., 2012).

Otros genes betalactamasas poco frecuentes como blaPER, blaVES y blaGES se encuentran en aislados como *Pseudomona aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Potron et al., 2015). blaPER fue descrito por primera vez en Turquía en 1993. Hoy en día el árbol filogenético basado en secuencias de aminoácidos revela dos clúster en el gen blaPER, uno contiene los genes blaPER-1, bla PER-3, blaPER-4, blaPER-5, y blaPER-7 y el otro contiene los genes blaPER-2 y blaPER-6 (Nordmann et al., 1993; Tada et al., 2017).

Recientemente, estudios realizados por el Programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY determinaron que *Klebsiella pneumoniae* (45.4%) es una de las enterobacterias que posee mayor fenotipo BLEE (MIC, ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$) a nivel de Latinoamérica, en comparación con los resultados donde la misma especie es frecuente en un 22.6% el continente europeo (Winokur et al., 2001). La dispersión de enterobacterias portadoras de genes BLEE involucra muchos países de Latinoamérica, incluyendo el nuestro. En Argentina los genes más frecuentes encontrados son

blaCTX-M-2 (55%) y blaCTX-M-15 (40%) (Sennati et al., 2012) también se han reportado la presencia de genes blaPER-2 y blaSHV enterobacterias provenientes de pacientes hospitalizados (Quinteros et al., 2003). En Colombia, los resultados recolectados de 10 hospitales de Bogotá indicaron que los genes blaCTX-M-12 (56%) y blaSHV-12 (33.3%) fueron los más prevalentes (Pulido et al., 2011) sin embargo, en la actualidad la prevalencia de genes blaKPC (70,3 %), blaNDM (7 %) y blaVIM (2,8 %) también han sido reportados en enterobacterias causantes de infecciones en pacientes hospitalizados (Ovalle et al., 2017). En adición Chile recientemente tiene al gen blaCTX-M-1 (84.7%) y blaSHV (81%) (Pavez et al., 2019) como los mayores reportados en *E.coli* y *Klebsiella pneumoniae*, mientras que Brasil posee al gen blaCTX-M-2 (58.7%) como uno de los más dominantes reportados en *K. pneumoniae* y *E. cloacae* (Nogueira et al., 2015) sin embargo, el problema más serio en Brasil es causado por enterobacterias resistentes a colistina (*mcr-1*) (Sampaio & Gales, 2016). Bolivia tiene a los genes blaCTX-M-2 (71%) y blaCTX-M-43 (21%) como los más frecuentes reportados para enterobacterias (Celenza et al., 2006). Por último, aislados provenientes de un hospital en Paraguay (Asunción) identificaron a *E.coli*, *K. pneumoniae* y *Enterobacter* sp. portadores de genes blaCTX-M2 (49%) y blaTEM (45%) como los más frecuentes (Guillén et al., 2016).

En Perú, el primer estudio relacionado a resistencia hacia los antimicrobianos fue realizado en niños con cuadros diarreicos residentes en la selva peruana (Bartoloni et al., 2006). Seis años después se realizó un reporte sobre la incidencia de aislados con fenotipo BLEE entre la resistencia de los mismos hacia otro grupo de antibióticos. Este reporte abordó aislados de pacientes internados en el área de cuidados intensivos; sin embargo el estudio genotípico no fue llevado a cabo (García et al., 2012).

Muy pocas investigaciones han evaluado e integrado estudios sobre el fenotipo BLEE con genotipo específico en los últimos años. Existen reportes en distintas ciudades de Perú enfocados a muestras clínicas fecales, urocultivos y hemocultivos enfocados a perfiles de susceptibilidad. (Colquechagua Aliaga et al., 2015; Galván et al., 2016; García-Mostajo et al., 2015). Sin embargo, no se han reportado estudios fenotípicos y genotípicos de aislados BLEE provenientes de aguas residuales en sistemas hospitalarios.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Caracterizar fenotípica y genotípicamente las betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias fermentadoras de lactosa aisladas de aguas residuales provenientes de un Hospital en Lima, Perú.

1.3.2. Objetivos específicos

- Identificar las especies de enterobacterias fermentadoras de lactosa provenientes de aguas residuales en un hospital en Lima, Perú.
- Determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las enterobacterias fermentadoras de lactosa usando métodos fenotípicos.
- Determinar la presencia de betalactamasas de espectro extendido en las enterobacterias fermentadoras de lactosa utilizando métodos fenotípicos y moleculares.

- Determinar los genes de resistencia en 30 aislados utilizando métodos de secuenciamiento de última generación (NGS, por sus siglas en inglés).

1.4. Justificación

La emergencia y diseminación de bacterias multidrogo-resistentes (MDR) es actualmente un problema alarmante de salud pública en todo el mundo. Las enterobacterias son un grupo importante de bacterias que presentan resistencia a antibióticos los cuales se desenvuelven gracias a diferentes mecanismos de resistencia para neutralizar, modificar o destruir antibióticos. Muchas enterobacterias fermentadoras de lactosa han sido reportadas en estudios sobre resistencia antimicrobiana, portando una variedad de genes BLEE las cuales codifican enzimas que les otorgan esta propiedad. La rápida diseminación de enterobacterias MDR potencialmente patógenas se debe a la capacidad que tienen estas de realizar transferencia horizontal de genes (THG) a través de plásmidos, inclusive entre diferentes especies y fuentes de procedencia (Lerminiaux & Cameron, 2019; van Duin & Paterson, 2016).

En los dos últimos años, el uso indiscriminado de antibióticos ha sido la principal causa de aceleración para la resistencia antimicrobiana en microorganismos causantes de enfermedades infecciosas en todo el mundo (Klein et al., 2018). Antibióticos como los betalactámicos son uno de los medicamentos más comúnmente recetados en numerosas indicaciones clínicas, razón por la cual el nivel de resistencia en estas bacterias ha incrementado en las últimas décadas.

En el Perú, se ha reportado un incremento de la frecuencia de aislados BLEE principalmente en pacientes hospitalizados en los últimos años, debido al descontrolado uso de

medicamentos. Sin embargo, el estudio de genes BLEE en bacterias provenientes en sistemas hospitalarios no ha sido reportado. Los efluentes de hospitales resultan una forma interesante para el estudio de monitoreo de genes BLEE en enterobacterias, ya que mediante estos la diseminación de estas bacterias en comunidades aledañas podría ser una forma rápida de llevar enfermedades, siendo de suma importancia realizar futuros estudios sobre este tema.

El presente trabajo de investigación propone identificar y caracterizar el nivel de resistencia a diferentes antibióticos y la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en enterobacterias fermentadoras de lactosa provenientes de aguas residuales en un hospital ubicado en Lima, Perú. Determinar los niveles de resistencia antimicrobiana de bacterias potencialmente patógenas para el humano permitirá generar evidencia y resaltar la necesidad de un programa de vigilancia epidemiológica de resistencia antimicrobiana en aguas residuales hospitalarias ya que representan un riesgo a la salud pública para el Perú.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis nula

H₀: No es posible la caracterización genotípica y fenotípica de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias fermentadoras de lactosa aisladas de aguas residuales provenientes de un hospital de Lima, Perú.

1.5.2. Hipótesis alterna

H_a: Es posible la caracterización genotípica y fenotípica de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias fermentadoras de lactosa aisladas de aguas residuales provenientes de un hospital de Lima, Perú.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. *Enterobacterias*

En los últimos años muchas especies bacterianas de importancia clínica han ido adquiriendo resistencia antimicrobiana. Estas incluyen bacterias resistentes a múltiples fármacos que representan una amenaza particular en sistemas hospitalarios. Entre las principales están *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y varias Enterobacteriaceae (incluidas *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* y *Proteus*). Estas pueden causar infecciones graves y, a menudo, mortales, como infecciones del torrente sanguíneo y neumonía. En su mayoría la resistencia es adquirida mediante transmisión horizontal de plásmidos (Karen Bush, 2010; World Health Organization, 2017).

2.1.2. *Resistencia a los antibióticos*

2.1.2.1. Reducción de permeabilidad en la membrana. La resistencia fenotípica de una bacteria resistente a ciertos antibióticos puede deberse a la incapacidad del agente antimicrobiano para entrar a la célula bacteriana donde se encuentran los sitios objetivos del antibiótico. La pared celular lipopolisacárido (LPS) de las Gramnegativas cumple uno de los principales roles en este mecanismo, la cual consta de tres partes: lípido A, un fosfolípido basado en glucosamina, un oligosacárido de núcleo relativamente corto, y un polisacárido distal (O-antígeno) (Delcour, 2009; Ghai & Ghai, 2018; Nikaido, 2003).

Antibióticos hidrófobos que tienen acceso al interior de la célula al penetrar a través de la bicapa de la membrana externa (ME) son los aminoglucósidos (gentamicina, kanamicina), macrólidos (eritromicina), rifamicinas, novobiocina, ácido fusídico y péptidos catiónicos. Las

polimixinas están dentro de este grupo de antibióticos que sensibilizan la membrana externa de bacterias Gramnegativas como *E. coli* y *S. typhimurium*. Cabe mencionar que dentro de esta familia el más resaltante es el nonapéptido de polimixina B (Nikaido, 2003). A pesar de que este antibiótico se use en último recurso terapéutico, este no se ha escapado a la evolución de la resistencia bacteriana (Band & Weiss, 2015).

Otro elemento importante de la ME son las porinas. Estas proporcionan una función de tamizado mediante la cual la ME es generalmente permeable a compuestos hidrofílicos debajo de un límite de exclusión específico que varía dependiendo del organismo bacteriano y está determinado por el diámetro de los canales presente en cada organismo individual (Fernández & Hancock, 2012). Por ejemplo, en *E. coli* las principales porinas son OmpF y OmpC, las cuales reducen la permeabilidad de la membrana externa y el antibiótico limitante. Este mecanismo se logra mediante la regulación negativa de porinas o por la sustitución de estas por canales más selectivos (Blair et al., 2015).

2.1.2.2. Bombas de eflujo. Las bombas de eflujo bacteriano transportan activamente muchos antibióticos fuera de la célula y son los principales contribuyentes de resistencia intrínseca en bacterias Gramnegativas a muchos de los medicamentos que se pueden usar para tratar infecciones bacterianas Grampositivas. Cuando se sobre expresan, las bombas de eflujo también pueden conferir altos niveles de resistencia a antibióticos clínicamente útiles (Blair et al., 2015).

Existen bombas de eflujo que pueden extruir una amplia gama de sustratos, mientras que algunas son específicas y extruyen pequeñas cantidades de compuestos antimicrobianos. Estas bombas son llamadas bombas de eflujo multirresistente (MDR), un ejemplo de estas son las *lmrS* encontradas en *Staphylococcus aureus* (Floyd et al., 2010). Los genes que codifican las bombas

de eflujo pueden ser encontrados en el cromosoma o en elementos transmisibles tales como plásmidos (Piddock, 2006). El sistema de bombas MDR es muy variado, uno de ellos son los RND.

Los transportadores familiares RND (División de Nodulación de Resistencia) están muy extendidos, especialmente entre bacterias Gramnegativas, catalizan el eflujo activo de muchos antibióticos y agentes quimioterapéuticos. Tienen dominios periplásmicos muy grandes y forman complejos tripartitos con la membrana externa y proteínas adaptativas periplásmicas (Nikaido & Takatsuka, 2009). Por ejemplo en *E. coli* existe la bomba AcrB y en *K. pneumoniae* la bomba AcrAB, las cuales son las responsables del reconocimiento y la extrusión inicial de los sustratos (Padilla et al., 2010; Ruggerone et al., 2013). Los estudios han revelado que AcrB de *E. coli* tiene un bolsillo de unión distal y un bolsillo de unión proximal. Estos bolsillos poseen varias entradas de unión la cual contribuyen a la especificidad del sustrato otorgando así la resistencia hacia diferentes antibióticos (Blair et al., 2015; Nakashima et al., 2011).

Otras de las variantes MDR es la MFS (Superfamilia Facilitadora Principal). Un ejemplo de esta clasificación es el gen NorA encontrado en *Staphylococcus aureus*, el cual puede extruir quinolonas hidrófilas como norfloxacin y ciprofloxacina (Yoshida et al., 1990) a través de la bomba de eflujo mediante la absorción y regulación del hierro (Deng et al., 2012).

Las bombas de flujo de salida MATE MDR han sido descritas para varias bacterias, incluyendo *Vibrio parahaemolyticus* (NorM), *Vibrio cólera* (VcrM; VcmA), *P. aeruginosa* (PmpM), *Clostridium difficile* (CdeA), *S. aureus* (MepA), entre otros. Se han identificado dos fuentes de energía para las bombas de flujo de salida MATE: la PMF (fuerza motriz de protones) y la gradiente de iones de sodio, así pequeños rastros de +Na en suspensiones celulares son suficientes para soportar la actividad de transporte. Las bombas MATE transportan algunos de

aquellos agentes también transportados por bombas RND. Sin embargo, una característica distintiva es que mientras que las bombas RND son tripartitas, las bombas MATE no lo son (Jin et al., 2014; Piddock, 2006).

Por último, tenemos a los transportadores ATP Binding Cassette (ABC). El gen *LmrA* en *Lactococcus lactis* es un ejemplo de este tipo de bomba, el cual puede trasladar eficientemente los fármacos en función de la ATP o PMF. A cambio, estos medicamentos son capaces de estimular la hidrólisis de ATP, mientras que el fluoruro de berilio y el vanadato inhiben la hidrólisis de ATP (Hellmich et al., 2015).

2.1.2.3. Cambios de sitio objetivo de los antibióticos debido a mutación. La mayoría de los antibióticos se unen específicamente a sus sitios objetivos con alta afinidad, impidiendo así la actividad normal de la bacteria. Cambios en la estructura del sitio objetivo evita la eficiencia de unión de los antibióticos, pero aun así le permite al sitio objetivo llevar a cabo su función normal, confiriendo resistencia (Blair et al., 2015).

Un ejemplo de cambio de *sitio objetivo* es la resistencia a la meticilina causada por la producción de una nueva Proteína de Unión a las penicilinas (PBP) denominada PBP 2 el cual está codificado por el gen *mecA*. Al igual que este, existe otro gen llamado *mecC* que ha sido descrito en los últimos años. Este se evaluó mediante un ensayo rápido que incluye cebadores y sondas para la detección de *ambos genes* junto con la detección de los tipos I a IV de SCCmec (staphylococcal cassette chromosome *mec*) (incluido el subtipo IVa) y V (Becker et al., 2016; Katayama et al., 2000). Cada elemento SCCmec lleva un cromosoma en cassette recombinasa (*ccr*) y complejo del gen *mec*. Los genes *ccr* codifican serinas recombinasas que median en sitios

y orientaciones específicas y escisión de SCCmec. Los genes complejos *mec* pueden incluir el gen *mecA* y, presenta genes reguladores *mecR1*, un sensor inductor, y un represor *mecI*. Los elementos del SCCmec también con frecuencia albergan secuencias de inserción integradas, plásmidos y transposones, que a menudo codifican determinantes de resistencia adicionales (Shore & Coleman, 2013).

2.1.2.4. Modificación directa de los antibióticos

A. Hidrólisis. Muchos antibióticos tienen susceptibilidad hidrolítica en enlaces químicos, cuya integridad es central para la actividad biológica. El principal mecanismo de esta acción son las amilasas, las cuales rompen el anillo β -lactámico de la penicilina y de las cefalosporinas. Dentro de otros ejemplos se incluyen esterases que se han vinculado a resistencia a los antibióticos macrólidos y resistencia al anillo fosfomicina, ya que estas enzimas sólo requieren agua como co-sustrato, a menudo pueden ser excretadas por la bacteria, interceptando así antibióticos antes de que entren en contacto con la bacteria (Wright, 2005). El problema de la resistencia a betalactámicos surgió en la comunidad a principios de la década de 2000 y desde entonces ha aumentado regularmente en todas las regiones de manera significativa. Desde el principio, los alelos blaCTX-M representaron la mayoría de los casos, muy a menudo superando el 90% (Woerther et al., 2013). Sin embargo, las carbapenemasas como las metalo- β -lactamasas (M β L) emplean Zn (II) como un cofactor esencial para escindir el anillo β -lactámico e inactivar estos agentes antibacterianos. Estos hechos, junto con la diseminación mundial de genes que codifican M β L, plantean un alarmante problema clínico. El gen NDM-1 está dentro de los que se han propagado en todo el mundo. Los inhibidores desarrollados para las serin- β -lactamasas no son

efectivos contra M β L e inhibidores específicos para M β L todavía no están disponibles para uso clínico (Lisa et al., 2017).

B. Macrólido esterasas. Los macrólidos inhiben la síntesis de proteínas bacterianas uniendo sus compuestos amino azúcares al túnel de salida de la subunidad ribosómica 50S y el desecho posterior del crecimiento de las cadenas peptídicas nacientes (Poehlsgaard & Douthwaite, 2005).

Las esterasas macrólidas, EreA y EreB, inactivan drogas a través del proceso de hidrólisis del anillo de macrolactona. EreA y EreB se encuentran normalmente en integrones y transposones, lo que aumenta la preocupación debido al potencial facilidad de diseminación genética. Las dos enzimas son débilmente relacionadas con 25% de identidad de secuencia de proteína. EreA es asociado con bacterias Gramnegativas, mientras que EreB, aunque originalmente descubierto en *Escherichia coli* en un exógeno plásmido, se cree que se origina a partir de organismos Grampositivos sobre la base del análisis de contenido GC (Biskri & Mazel, 2003; Morar et al., 2012).

C. Grupos transfer. La familia de N-acetiltransferasas relacionadas con GCN5 (GNAT) es una importante familia de proteínas que incluye más de 100.000 miembros entre eucariotas y procariotas. La acetilación aparece como una importante modificación postraduccional regulatoria y está tan extendida como la fosforilación. Las N-acetiltransferasas transfieren un grupo acetilo de acetil-CoA a una gran variedad de sustratos, desde moléculas pequeñas como antibióticos aminoglucósidos hasta macromoléculas. La acetilación de proteínas puede tener lugar en dos posiciones diferentes, ya sea en el extremo amino terminal (α N-acetilación) o en el grupo ϵ -amino (ϵ N-acetilación) de un residuo interno de lisina. Desde entonces se han caracterizado muchos aminoglucósidos acetiltransferasas y son clínicamente una de las razones más comunes de la

resistencia a los aminoglucósidos (Favrot et al., 2016). En un estudio previo *Campylobacter coli* resultó tener seis genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos y un gen tet (O) truncado en el cromosoma (Qin et al., 2012). Otro reciente descubrimiento es la dispersión de resistencia hacia una novedosa rifampicina glicosiltransferasa reportada en cuatro géneros divergentes de actinomicetos (*Streptomyces*, *Mycobacteria*, *Rhodococcus*, y *Nocardia*). Los resultados de secuencia del ADN identificaron una región upstream repetitiva a rif (RAE) la cual está presente en varias especies de Actinomicetos asociada a la resistencia a rifampicina (Spanogiannopoulos et al., 2014).

2.1.2.5. Modificación de los targets. La protección por modificación del sitio objetivo también puede ser uno de los medios efectivos de resistencia a los antibióticos que no requieren un cambio mutacional en los genes que codifican las moléculas del sitio objetivo. Un ejemplo de este mecanismo son los miembros de la familia erm metiltransferasa los cuales modifican el rRNA 23S del ribosoma bacteriano y proporcionan resistencia cruzada a los macrólidos y a varios antibióticos a distancia. Estudios previos han demostrado que la expresión de erm se activa cuando un ribosoma unido a macrólidos detiene la traducción del péptido líder que precede al erm co-transcrito (Dzyubak & Yap, 2016).

2.1.3. Clasificación de las enzimas betalactámicas

2.1.3.1. Clasificación según Ambler. En un principio las betalactamasas se dividían en las clases A y B. La clase A contiene en su centro activo serina, mientras que la clase B o metalo-betalactamasas, contiene un ion metálico bivalente de zinc (Ambler, 1980). Estudios posteriores demostraron que había un grupo de bacterias con pocas similitudes a los grupos ya descritos por Ambler, por lo que se designaron nuevos grupos de clasificación C y D (Hall & Barlow, 2005).

La clase A contiene a las betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas. En las de espectro extendido se encuentran aquellas que poseen actividad antimicrobiana como ampicilina y cefalotina, las primeras en ser descubiertas pertenecen al tipo blaTEM-1 y blaSHV-1 (Bradford, 2001). Posteriormente estos genes empezaron a presentar mutaciones dando origen a las BLEE que incluyen a las nuevas variantes del grupo blaTEM (blaTEM-3, blaTEM-52), blaSHV (blaSHV-5, blaSHV-12) y un grupo de genes con el nombre de blaCTX-M (Pfeifer et al., 2010). Por otro lado, las carbapenemasas caracterizadas también por hidrolizar a los carbapenems, incluyen cuatro grupos de genes diferentes conocidos como blaSME, blaIMI, blaGES y blaKPC (García, Astocondor, et al., 2012).

En la clase C están incluidas principalmente las betalactamasas tipos AmpC, las cuales son activas a cefalosporinas, penicilinas, cefamicinas y monobactámicos, pero inactivas a cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos (Seral et al., 2012).

Por último, está la clase D, aquí se encuentran las que son resistentes a penicilinas y cefalosporinas de espectro extendido (blaOXA-11, blaOXA-16, blaOXA-17) y las blaOXA tipo carbapenemasas que confieren resistencia a carbapenems (blaOXA-48) (García, Astocondor, et al., 2012).

2.1.3.2. Clasificación según Bush & Jacoby. En 1989 Bush elaboró una clasificación previa de betalactamasas basados en la capacidad de las enzimas para hidrolizar betalactámicos. Junto con Jacoby y Medeiros elaboraron una clasificación molecular de estas enzimas, definidas a través de la secuencia de aminoácidos, dividiendo a las betalactamasas en clases A, C y D las cuales utilizan serina para la hidrólisis y metaloenzimas de clase B que requieren iones de zinc divalentes para el sustrato hidrólisis. Sin embargo, para diagnósticos clínicos sugieren que la nueva clasificación está basada en la capacidad hidrolítica de estas enzimas (Bush, K., 1989; Bush, K. et al., 1995; Bush & Jacoby, 2010).

Grupo 1 cefalosporinasas. Las enzimas del grupo 1 son cefalosporinasas pertenecientes a la clase molecular C que están codificados en los cromosomas de muchas enterobacterias (George A. Jacoby, 2009). Son más activos en cefalosporinas que bencilpenicilina y suelen ser resistentes a la inhibición por el ácido clavulánico y activos sobre las cefamicinas, como la cefoxitina. En muchos organismos incluyendo *Enterobacter cloacae* la expresión del gen AmpC está constituido por un regulador (AmpR) donde, en ausencia de betalactámicos, AmpR reprime la transcripción de ampC (Guérin et al., 2015).

Grupo 2 serina-betalactamasas. Incluyendo las clases moleculares A y D, representan el mayor grupo de β -lactamasas, debido principalmente al aumento de identificación de BLEEs durante los últimos 20 años.

Existen varios subgrupos dentro de esta clasificación. El subgrupo 2a incluye penicilinasas con espectro limitado de actividad hidrolítica, mientras que el subgrupo 2b hidroliza cefalosporinas de primera generación como cefaloridina y cefalotina, ambos subgrupos son inhibidos por el ácido clavulánico y el tazobactam. En el subgrupo 2be tiene actividad penicilinasas, pero además

hidrolizan uno o más oximino-betalactamasas, como cefotaxima, ceftazidima y aztreonam. La mayoría de los subgrupos es inhibida por el ácido clavulánico, incluido el subgrupo 2be y el 2ber, sin embargo, el subgrupo 2ber es resistente ante el ácido clavulánico. El subgrupo 2c puede hidrolizar carbenicilina o ticarcilina al igual que el subgrupo 2ce, pero este último hidroliza cefalosporinas de cuarta generación como cefepime y cefpiroma. El subgrupo 2d y 2de se caracteriza por hidrolizar cloxacilina u oxacilina, pero no carbapenemasas, en contraste con el nuevo grupo 2df que posee la capacidad de hidrolizar carbapenemasas. El grupo 2e posee la capacidad de hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido, pero poca afinidad con el aztreonam. Por último, el grupo 2f posee la capacidad de hidrolizar las carbapenemasas, pero es inhibida con mayor capacidad por el tazobactam que por el ácido clavulánico, no incluye la hidrólisis para cefalosporinas como ceftazidima.

Grupo 3 Metalobetalactamasas. Este grupo posee diferencias estructuras en comparación a otras betalactamasas por su requerimiento de un ion de zinc en el sitio activo. Tiene una afinidad hidrolítica pobre hacia los monobactámicos y no son inhibidos por el ácido clavulánico y tazobactam, pero si por EDTA, ácido dipicolínico o fenantrolina.

Grupo 4. Estas enzimas probablemente se incluirían en uno de los grupos de enzimas existentes si más información sobre ellos fuera disponible. Debido a que estas enzimas aún no han sido caracterizadas completamente no se ha intentado una categorización adicional.

2.1.4. Producción de enzimas betalactámicas

2.1.4.1. Betalactamasas de espectro extendido. Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son capaces de conferir resistencia bacteriana a las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, y aztreonam (pero no las cefamicinas o carbapenemasas) por hidrólisis de estos antibióticos, y que son inhibidos por el ácido clavulánico. Dentro de la clasificación de Bush & Jacoby pertenecen al grupo 2be y 2d (Paterson & Bonomo, 2005).

Se han descrito más de 350 variantes diferentes de ESBL naturales que se han clasificado en nueve familias con distinciones evolutivas y estructurales basadas en comparaciones de secuencias de aminoácidos, tales como blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, blaPER, blaVEB, blaGES, blaBES, blaTLA, y blaOXA (Bajpai et al., 2017).

A. BLEE tipo TEM. Las betalactamasas tipo TEM se caracterizan por poseer una diversidad significativa de formas mutantes. En el contexto de los mecanismos y desarrollo de resistencia, este tipo de betalactamasa es muy interesante, ya que su evolución ocurre a largo plazo en comparación con otros tipos de betalactamasas, siendo al mismo tiempo los más frecuentes. Más de 200 variantes de este tipo de enzimas han sido descritas (Grigorenko et al., 2017).

La enzima producida por este gen está constituida por dos dominios, uno predominantemente α -helical y un dominio- $\alpha\beta$. El sitio activo se encuentra en la interfaz de ambos dominios cerca de las cadenas β del $\alpha\beta$ -dominio. El sitio catalítico importante Ser70 se encuentra en el Hélice 310 iniciando una de las hélices del dominio helicoidal. El sitio activo parece estar muy cargado con varios residuos conservados: Lys73, Lys234, Glu166 y dos residuos de serina Ser70 y Ser130 (Stec et al., 2005).

B. BLEE tipo CTX-M. Las betalactamasas CTX-M generalmente confieren resistencia de alto nivel a las penicilinas y cefalosporinas (cefalotina, cefaloridina y cefuroxima). Sus susceptibilidades a las 7- α -metoxi cefalosporinas (cefoxitina) y carbapenems (imipenem y meropenem) se mantienen sin cambios.

Mucho de las variedades de genes blaCTX-M difieren solo de una sustitución de un aminoácido. Como ejemplo tenemos la sustitución de aspartato por glicina en la posición 240 del blagen CTX-M-3 dando como resultado una variación del gen a blaCTX-M-15 (Baraniak A. et al., 2002). El gen blaCTX-M-15 se caracteriza por la actividad hidrolítica hacia la ceftazidima. El caso de blaCTX-M-19 tiene esta propiedad por la mutación Ser167Pro y en blaCTX-M-15 y blaCTX-M-16 se debe a la sustitución Asp240Gly (Bonnet, 2004). Por lo tanto, la expansión de la familia blaCTX-M puede deberse a la diseminación y las mutaciones de los genes que codifican blaCTX-M, pero no se pueden excluir los eventos genéticos independientes (Bonnet R. et al., 2000).

Hoy en día la actividad hacia ceftazidima no representa una pérdida de eficiencia hidrolítica hacia cefepime o cefotaxima. De hecho, la mutación de Asp240Gly no parece tener un impacto perjudicial sobre el fenotipo de resistencia global de las cepas de *E. coli* que producen variantes de blaCTX-M Asp240Gly; todos los productores de blaCTX-M se mantuvieron resistentes a las penicilinas, así como a las cefalosporinas de espectro estrecho y expandido, y solo el MIC (concentración mínima inhibitoria) de CAZ aumentó en dos o más diluciones en todas las variantes de Asp240Gly excepto en blaCTX-M-131 (Ghiglione B. et al., 2018).

C. BLEE tipo SHV. Las betalactamasas tipo SHV están conformados por dos dominios α/β : una hoja antiparalela β de cinco cadenas flanqueadas con el α -hélice y, el subdominio α -helicoidal, en donde el sitio activo está ubicado entre los subdominios y contiene un residuo de Ser70 (Liakopoulos et al., 2016; Matagne et al., 1998). Las variantes de blaSHV son conformadas

por sustituciones de aminoácidos: las más comunes están ubicadas en las posiciones Leu35, Gly238 y Glu240, mientras que otras sustituciones menos frecuentes pero críticas en el fenotipo de espectro extendido incluyen Ile8, Arg43, Glu64, Gly156, Asp179, y Arg205. Estas variantes han sido reportadas en especies de enterobacterias como *E. coli* y *K. pneumoniae*. (Liakopoulos et al., 2016).

D. BLEE tipo OXA-1. blaOXA-1 pertenece a la clase D de las betalactamasas y está frecuentemente asociado a genes que codifican betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Recibe el nombre de oxacilinasas ya que hidroliza oxacilina y cloxacilina mucho más rápido que las penicilinas (ureidopenicilinas). Cabe resaltar que blaOXA-1 hidroliza cefalosporinas de amplio espectro por lo que posee reducida susceptibilidad a cefepime y a ceftiproma (Sugumar et al., 2014).

Una característica resaltante del subgrupo blaOXA-1 es la ausencia en la hélice carboxi-terminal de una arginina dirigida al sitio activo. blaOXA-1 contiene Ser 258 mientras otros subgrupos contienen Arg 261 en la misma posición (Sun et al., 2003).

E. BLEE tipo PER, VEB y GES-1. blaPER (Pseudomonas extended resistance), VEB (Vietnamese extended-spectrum betalactamase) y blaGES (Guyana extended spectrum β -lactamase) como enzimas pertenecen a la clase A de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) por conferir resistencia a penicilinas, oximino-cefalosporinas y aztreonam, pero no son resistentes a cefamicinas y carbapenemasas. Su actividad es inhibida por ácido clavulánico y tazobactam (Mancini et al., 2018; Potron et al., 2015).

En estudios anteriores la diseminación de blaPER1, blaPER-2, blaVEB-1 se ha debido a la presencia de una secuencia de inserción llamada INT-1 en aislados de *A. baumannii* recuperados

en pacientes hospitalizados en el Hospital de Tabriz. En el caso del gen blaGES-1 apareció por primera vez en Francia en un aislado de *K. pneumoniae* (Farajnia et al., 2013; Poirel et al., 2000).

Otros genes como blaSFO-1, blaBES-1, blaBEL-1, blaTLA-1 y blaTLA-2, son todavía muy raros en comparación con blaPER, blaVEB y blaGES (Naas et al., 2008).

2.1.4.2. Betalactamasas de tipo AmpC. Este tipo de betalactamasa representan una nueva amenaza, ya que confieren resistencias a las penicilinas y cefalosporinas, pudiendo hidrolizar cefamicinas (cefotetina y cefotetan) y monobactams (aztreonam). No hidrolizan cefalosporinas de cuarta generación (cefepime, cefpiroma) ni carbapenems y no se ven afectadas por inhibidores como la amoxicilina/ácido clavulánico (Alain Philippon et al., 2002; Seral et al., 2012).

El gen blaCMY es uno de los más comunes encontrados de esta clasificación. El origen de seis de sus variedades (blaCMY-1, -8, -9, -10, -11, and -19) está relacionado con las enzimas cromosomales AmpC en *Aeromonas* spp., mientras que blaCMY-2 (gen blaCMY más común) se relaciona con las enzimas AmpC de *Citrobacter freundii*. Otras enzimas como blaLAT también han sido reportadas: En donde blaLAT-1 resultó ser blaLAT-4, blaLAT-3 fue idéntico a blaCMY-6, siendo todas estas originarias de blaCMY-2 (Barlow & Hall, 2002).

Estos genes ya han sido reportados en diferentes enterobacterias como *Enterobacter* spp, *E. coli* y *Klebsiella* sp en pacientes adultos, sin embargo no es común observar este tipo de genes en neonatos, con lo cual resulta un problema de salud futuro (Fakioglu et al., 2006; Khari et al., 2016; Lin et al., 2016).

2.1.4.3. Carbapenemasas. Poseen una actividad de espectro amplio ya que su estructura molecular de estas enzimas se define por un carbapenem acoplado a un anillo de betalactámico que le confiere protección a antimicrobianos como imipenem, ertapenem, doripenem, y

meropenem (Codjoe & Donkor, 2017). Una de las razones principales se debe a la falta de nuevas clases de agentes antimicrobianos que pueden superar dicha resistencia (Meletis, 2016).

El principal mecanismo de resistencia a los carbapenems está mediado por la presencia de plásmidos, como es el caso de las carbapenemasas KPC, tipo OXA y las metalo-betalactamasas de Nueva Delhi. Estas dos primeras pertenecen a la clase A y D de la clasificación de Ambler por poseer un ion de serina en su sitio activo (Lapuebla et al., 2015). Los genes más comunes para la familia blaKPC son blaKPC-1 y blaKPC-2, mientras que para blaOXA, blaOXA-48 sería el más reportado en enterobacterias. Por último la familia NDM pertenece a la clasificación B de Ambler, ya que contiene un ion de zinc en su sitio activo, el gen más común para esta familia sería NDM-1 (Chiu et al., 2018; Melgarejo et al., 2019).

III. MÉTODO

3.1. Tipo de Investigación

Estudio descriptivo y de corte transversal. El estudio propone caracterizar el nivel de resistencia antimicrobiana de las enterobacterias fermentadoras de lactosa provenientes de aguas residuales en un hospital en Lima, Perú.

3.2. Ámbito temporal y espacial

Los muestreos fueron realizados durante los meses de noviembre-diciembre (2017), enero-febrero (2018) y enero-mayo (2019). Se muestrearon dos puntos del hospital: “A” comprendido todos los servicios del hospital y el “B” las Unidades de Cuidados Intensivos de Cardiología, Neurología, Cirugía Experimental y Quemados.

3.3. Variables

Variable	Definición Operacional	Valores posibles	Criterios de medición	Tipo de variable	Fuente
Presencia de “Gen BLEE”	Presencia de genes asociados a la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	Presencia/Ausencia	Categórica politómica	Principal/Desenlace Dependiente	Resultados de PCR de las enterobacterias aisladas.

Fenotipo BLEE	Presencia de fenotipo de resistencia compatible con la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	Positivo/Negativo	Catagórica dicotómica	Independiente	Resultados de antibiogramas mediante método de Jarlier
Aislado bacteriano	Género y especie del aislamiento bacteriano	<i>E.coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp., entre otras enterobacterias fermentadoras de lactosa	Catagórica, politómica	Independiente	Resultados de pruebas bioquímicas
Punto de muestreo	Muestras correspondientes a cada punto de muestreo	Punto "A" o punto "B"	Catagórica, dicotómica	Independiente	Buzón de agua
Susceptibilidad antimicrobiana	Susceptibilidad fenotípica a diversos antimicrobianos sugeridos por la CLSI y realizados mediante antibiograma.	Susceptible Intermedio Resistente	Catagórica, politómica	Independiente	Resultados de antibiograma
Multidrogo-resistente	Resistencia a tres o más familias de antimicrobianos	Positivo/Negativo	Catagórica. dicotómica.	Independiente	Resultados del perfil de susceptibilidad de los aislados
Gen de resistencia	Genes de resistencia a diferentes antimicrobianos	Presencia/Ausencia	Catagórica. dicotómica.	Independiente	Resultados del análisis de genoma bacteriano

3.4. Población y muestra

El presente estudio trabajó con los aislados de enterobacterias fermentadoras de lactosa provenientes de aguas residuales en un Hospital ubicado en Lima, Perú. La población del estudio comprendió la totalidad de aislados de enterobacterias fermentadoras de lactosa recolectados provenientes de aguas residuales. Se trabajó con un total 9 muestras recolectados a partir de dos puntos en un hospital pediátrico ubicado en Lima-Perú y criopreservados en el Laboratorio de Genómica Microbiana de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.5. Instrumentos

3.5.1. Equipos

- Refrigeradora
- Congeladora -20°C
- Incubadora 37°C
- Autoclave
- Centrífuga
- Cabina de flujo laminar
- Termociclador
- Secuenciador Miseq Illumina
- Cámara de electroforesis

- Transiluminador UV
- Vortex
- Micropipeta

3.5.2. Medios de cultivo

- Caldo tripticasa soya (TSB) marca BD
- Caldo MR-VP marca MERCK
- Agar McConkey marca MERCK
- Agar tripticasa soya (TSA) marca BD
- Agar Muller Hinton marca BD
- Agar citrato de Simmons marca BD
- Agar Triple Iron Sugar (TSI) marca BD
- Agar Lisyne Iron (LIA) marca BD
- Agar Motility Indole Ornithine (MIO)

3.5.3. Reactivos

- Disco de Cefalotina (KF) 30 μ g marca OXOID
- Disco de Ácido Nalidíxico (NA)
- Disco de Amoxicilina ácido clavulánico (AMC) 20/10 μ g marca OXOID

- Disco de Cefotaxima (CTX) 30µg marca OXOID
- Disco de Cefepime (FEP) 30µg marca OXOID
- Disco de Ceftazidime (CAZ) 30µg marca OXOID
- Disco de Aztreonam (AZ) 30µg marca OXOID
- Disco de Sulfatrimetropin (SXT) 1.25/23.75µg marca OXOID
- Disco de Cloranfenicol (C) 30µg marca OXOID
- Disco de Meropenem (MEM) 10µg marca OXOID
- Disco de Azitromicina (AZM) 15µg marca OXOID
- Disco de Tetraciclina (TE) 30µg marca OXOID
- Disco de Gentamicina (CN) 10µg marca OXOID
- Disco de Ciprofloxacino (CIP) 5µg marca OXOID
- Disco de Amoxicilina (AX) 25µg marca OXOID
- Primer específicos marca Invitrogen
- Kit de preparación de librerías Nextera XT

Tabla 1.

Secuencia de oligonucleótidos de cuatro genes betalactamasas

Gen		Secuencias (5' -> 3')	Especificidad	Tamaño Amplicón	Referencia
blaCTX-M	F	TTTGCGATGTGCAGTACCA GTAA	BLEE	544	(Edelstein et al., 2003)
	R	CGATATCGTTGGTGGTGCC ATA-			
blaTEM	F	ATTCTTGAAGACGAAAGGG C	BLEE	1150	(Belaouaj et al., 1994)
	R	ACGCTCAGTGGAACGAAA AC			
blaSHV	F	CACTCAAGGATGTATTGTG	BLEE	885	(Sáenz et al., 2004)
	R	TTAGCGTTGCCAGTGCTCG			
blaOXA-1	F	ACACAATACATATCAACTT CGC	BLEE	813	(Steward et al., 2001)
	R	AGTGTG TTTAGAATG GTGATC			

3.6. Procedimientos

3.6.1. *Recolección de las muestras de agua*

Los aislados de enterobacterias provinieron de muestras de aguas residuales colectadas durante los meses de noviembre-diciembre (2017), enero-febrero (2018) y enero-mayo (2019). Se colectaron 9 muestras de agua residual en total, cada una de 50 ml para ambos puntos de muestreo (“A” y “B”). Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Genómica Microbiana de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en cajas térmicas (coolers), según recomendaciones de DIGESA-MINSA (Dirección General de Salud Ambiental- Ministerio de Salud del Perú, 2007).

3.6.2. *Identificación de enterobacterias*

A partir de la muestra de agua residual se sembró por agotamiento en Agar McConkey, luego se incubó durante 24 horas a 37° C. A partir de cada muestra, se seleccionaron de 5-6 colonias fermentadoras de lactosa para su identificación bioquímica con diferentes medios selectivos: hierro triple azúcar (TSI), lisina hierro agar (LIA), Citrato de Simmons, medio

motilidad indol ornitina (MIO) y caldo MR-VP. La incubación se realizó a 37°C por 24 horas, con excepción del caldo MR-VP que fue por 48 horas (Brenner D et al., 2005).

3.6.3. Criopreservación de aislados bacterianos

La criopreservación de enterobacterias se realizó con caldo soja triptona (TSB) y glicerol al 15%. Se incubó a 37°C por dos horas y luego fueron llevados a una temperatura de -70°C hasta la extracción de ADN (Jorgensen J et al., 2015; Pell & Sneath, 1984).

3.6.4. Susceptibilidad a los antimicrobianos

Se realizó el antibiograma usando la técnica de Kirby Bauer (Bauer AW. et al., 1966) bajo indicaciones del CLSI (CLSI, 2018). Se determinó el perfil de susceptibilidad a los siguientes antimicrobianos: Cefalotina (30µg), Ácido nalidíxico (30µg), Tetraciclina (30µg), Meropenem (10µg), Ciprofloxacino (5µg), Cloranfenicol (30µg), Sulfatrimetropin (1.25/23.75µg), Azitromicina (15µg), Gentamicina (10µg), Aztreonam (30µg) y Amoxicilina (25µg). Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas. Para la identificación fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), se utilizó el método de Jarlier (Jarlier et al., 1988) con Cefotaxima (30µg), Cefoxitin (30µg), Ceftazidima (30µg) y Cefepime (30µg) colocados alrededor de un disco con amoxicilina + ácido clavulánico (20/10µg). Las sinergias formadas entre cualquiera de las cefalosporinas con el disco que contiene ácido clavulánico indicarán un resultado positivo para producción de BLEE. La lectura se realizó 24 horas después de incubar las placas a 37°C.

3.6.5. Extracción de ADN

Los aislados criopreservados fueron reactivados mediante la siembra por agotamiento en agar TSA y fueron incubados a 37°C por 24hrs. Para la extracción de ADN, se utilizó el kit

comercial GeneJET Genomic DNA Purification Kit de la marca Thermo Scientific para extraer ADN genómico de alta pureza y siguiendo indicaciones del fabricante.

3.6.6. Identificación de genes *BLEE*

Mediante el uso de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se identificaron los genes *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M* y *blaOXA-1*. Se utilizaron los cebadores específicos descritos en la Tabla 1. Para la reacción, se emplearon 3 μ L de ADN de la muestra y 22 μ L de la mezcla de reacción que incluyó 200 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM de Desoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs) y 5 U/ μ L de Taq Polimerasa. La programación de PCR para los genes *blaTEM*, *blaCTX-M* y *blaOXA-1* consistió en un paso inicial de 94°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para la denaturación, 58°C a 30 segundos y 72°C por 30 segundos para el anidamiento. Por último, un paso de extensión de 72°C por 5 minutos. Luego del último ciclo los productos fueron guardados a 10°C. Para la detección del gen SHV la programación de PCR consistió en un paso inicial de 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 95°C por 20 segundos para la denaturación, 50°C a 20 segundos y 72°C por 1.5 minutos para el anidamiento. Por último, un paso de extensión de 72°C por 10 minutos. Luego del último ciclo los productos fueron guardados a 10°C.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa de 2% a 100v por 50 minutos, donde se verificó el tamaño de ADN amplificado con un marcador de 100pb. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador ultravioleta. Se incluyó un control positivo y negativo para cada gen.

3.6.7. Secuenciamiento genómico-Análisis bioinformático

Se seleccionaron 30 aislados para el secuenciamiento genómico en la Plataforma Illumina MiSeq ubicado en la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las librerías fueron preparadas con kit Nextera XT en lotes de 24 aislados de ADNg y secuenciados en multiplex con una cobertura de 80-120x. La calidad de lecturas se realizó con FastQC. El software CLC v12 fue usado para el trimado, procesamiento de las lecturas y ensamblado de novo.

Luego de obtener ensamblado el genoma, las especies y los secuenciotipos (ST) fueron identificados con PubMLST <https://pubmlst.org/> (Jolley et al., 2018). Los genes de resistencia se determinaron mediante ResFinder 3.2 <https://cge.cbs.dtu.dk> (Clausen et al., 2016).

3.7. Análisis de datos

Las variables categóricas fueron descritas usando frecuencias e intervalos de confianza. Las variables numéricas serán descritas usando medidas de tendencia central y de dispersión. Los resultados del fenotipo de resistencia serán interpretados de acuerdo con los puntos de corte establecidos por el CLSI (2018). Se generará una variable MDR considerando la resistencia a 3 o más familias de antimicrobianos y se explorará la relación con la especie identificada. El análisis de datos se realizará con el programa Stata v14 utilizando un nivel de confianza del 95%.

IV. RESULTADOS

Se obtuvieron 60 aislados de enterobacterias provenientes de aguas residuales de un hospital de Lima. *Klebsiella* sp (41.67% n=25) y *E. coli* (41.67% n=25) fueron las especies de mayor prevalencia, seguido de *Citrobacter* sp (13.33% n=8) y *Enterobacter* sp (3.3% n=2). De la misma forma se evaluó el porcentaje de enterobacterias provenientes de los dos puntos de muestreo realizados en el Hospital. Los resultados según el número total de especies fueron: *Klebsiella* sp en el punto “A” obtuvo 41.38% y en el punto “B” un 41.98%, siendo esta la especie más común en ambos puntos. *E. coli* en el punto “A” tiene 55.17% y en el punto “B” 29.03%. En el caso de *Citrobacter* sp la diferencia entre ambos puntos es resaltante, en el punto “A” se encontró 3.45% y en el punto “B” 22.58%. Por último, *Enterobacter* sp. solo se reportó en el punto “B” con un 6.45% (Figura 1).

En la Tabla 2 se muestran los resultados fenotípicos de resistencia para las cuatro especies reportadas. Se determinó que el 21.67% de las enterobacterias presentaron un fenotipo BLEE positivo, y el 78.33% un fenotipo BLEE negativo. La distribución según especies para el fenotipo BLEE positivo fue: *Citrobacter* sp (37%), *Klebsiella* sp (24%), y *E. coli* (16%). *Enterobacter* sp no presentó aislados fenotípicos BLEE positivos.

El análisis de susceptibilidad antimicrobiana reportó que Amoxicilina fue uno de los antibióticos con mayor porcentaje (63.33%), seguido de Cefalotina (38.33%) y Amoxicilina con ácido clavulánico (33.33%). Se reportó también una resistencia del 5% para meropenem y 3.33% para colistina.

El total de aislados MDR reportados fue de 38.33% entre ambos puntos. El punto “A” (65.52%) obtuvo mayor porcentaje fenotípico MDR, mientras que en el punto “B” (12.90%) el porcentaje fue menor. La especie con mayor número de aislados multidrogosresistentes (MDR) fue *E. coli* (n=12, 48%), seguida de *Klebsiella* sp (n=6, 40%) y *Citrobacter* sp (n=8, 12.5%). *Enterobacter* sp no presentó aislados fenotípicos MDR positivos.

Tabla 2.

Resultados de la caracterización fenotípica de enterobacterias.

Resultados	Total	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.
	n=60 (%)	n=25 (%)	n=25 (%)	n=8 (%)	n=2 (%)
<i>Multidrogosresistencia</i>					
MDR (3)	23 (38.33)	10 (40)	12 (48)	1 (12.50)	0 (0)
<i>BLEE</i>					
Positivo	13 (21.67)	6 (24)	4 (16)	3 (37.50)	0 (0)
<i>Polimixinas</i>					
Colistina	2 (3.33)	1 (4)	0 (0)	1 (12.50)	0 (0)
<i>Cloranfenicoles</i>					
Cloranfenicol	7 (11.67)	2 (8)	5 (20)	0 (0)	0 (0)
<i>Tetraciclinas</i>					
Tetraciclina	16 (26.67)	4 (16)	12 (48)	0 (0)	0 (0)
<i>Sulfonamidas</i>					
Sulfatrimetropin	15 (25)	5 (20)	10 (40)	0 (0)	0 (0)
<i>Aminogluocosidos</i>					
Gentamicina	6 (10)	3 (12)	3 (12)	0 (0)	0 (0)
<i>Macrolidos</i>					
Azitromicina	15 (25)	8 (32)	6 (24)	1 (12.50)	0 (0)
<i>Penicilinas</i>					
Amoxicilina	38 (63.33)	20 (80)	12 (48)	4 (50)	2 (100)
Amoxicilina con ácido clavulanico	20 (33.33)	7 (28)	6 (24)	5 (65.50)	2 (100)
Aztreonam	7 (11.67)	4 (16)	2 (8)	1 (12.50)	0 (0)

Cefalosporinas					
Cefalotina	23 (38.33)	10 (40)	6 (24)	5 (62.50)	2 (100)
Cefotaxima	9 (15)	5 (20)	3 (12)	1 (12.50)	0 (0)
Cefoxitina	17 (28.33)	6 (24)	3 (12)	6 (75)	2 (100)
Ceftazidima	10 (16.67)	6 (24)	4 (16)	0 (0)	0 (0)
Cefepime	8 (13.33)	4 (16)	3 (12)	1 (12.50)	0 (0)
Carbapenemicos					
Meropenem	3 (5)	2 (8)	0 (0)	1 (12.50)	0 (0)
Quinolonas					
Ácido nalidixico	18 (30)	8 (32)	9 (36)	1 (12.50)	0 (0)
Ciprofloxacino	13 (21.67)	8 (32)	4 (16)	1 (12.50)	0 (0)

Figura 1.

Porcentaje de enterobacterias por punto de muestreo

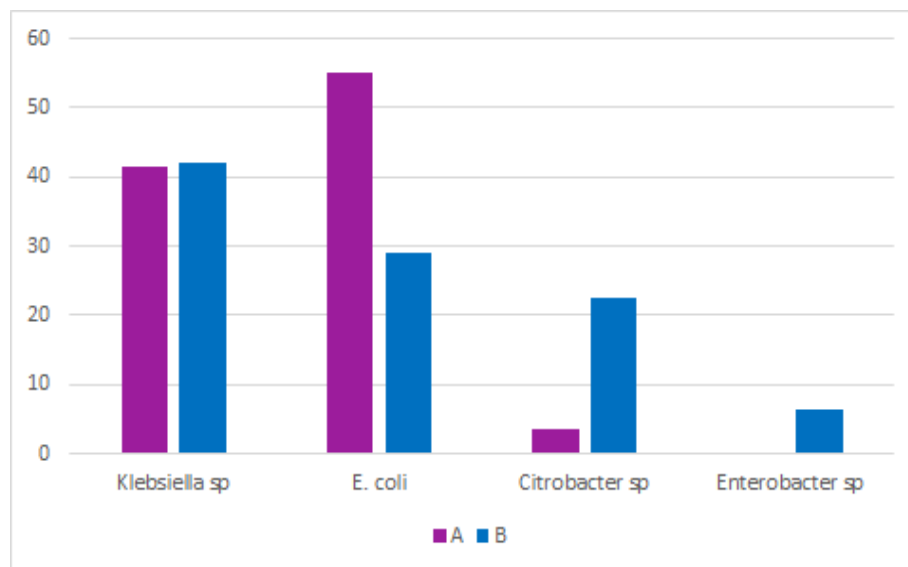
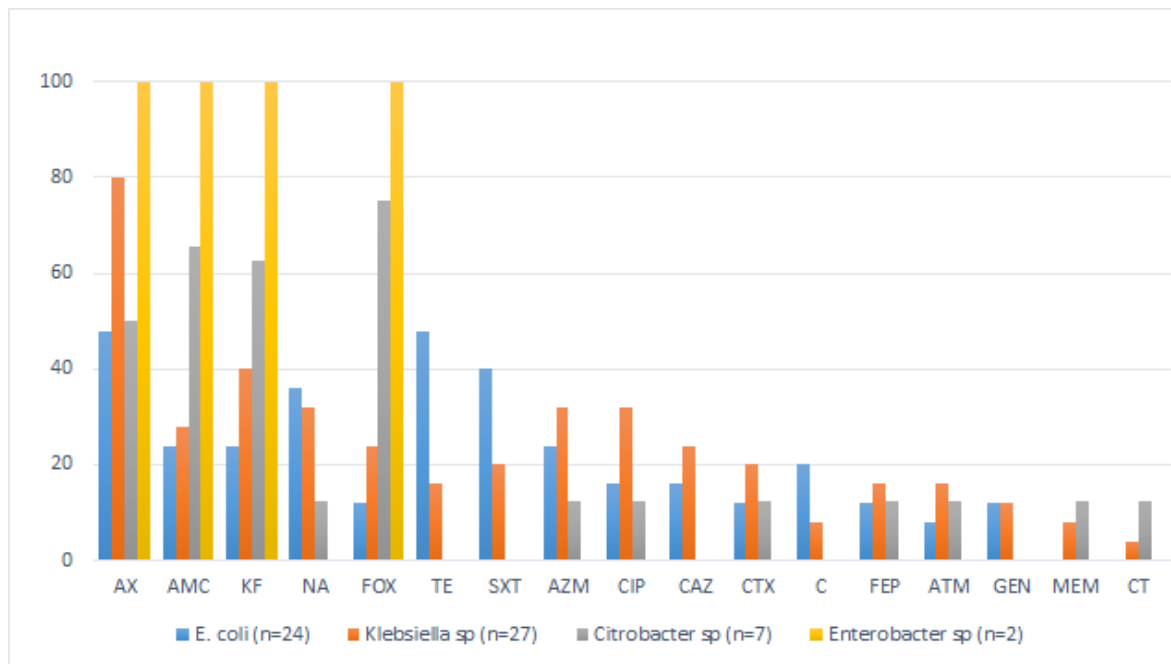


Figura 2.

Porcentaje en el perfil de resistencia en enterobacterias



Nota. AX=amoxicilina, AMC= amoxicilina con ácido clavulánico, KF=cefalotina, CAZ=ceftazidima, FEP=cefepime, CTX=cefotaxima, NA=ácido nalidíxico, CIP=ciprofloxacino, AZ= aztreonam, AZM= azitromicina, TE= tetraciclina, SXT= sulfatrimetropin, CN= gentamicina, MEM=meropenem.

El análisis molecular indicó que el gen blaCTX-M (35%) fue el más identificado en este estudio, seguido de blaOXA-1 (16.67%), blaTEM (13.33%) y blaSHV (3.33%). *Klebsiella* sp. fue portadora de cuatro genes BLEE, mientras que en *E. coli* y *Citrobacter* sp. solo hubo tres de ellos. En el caso de *Enterobacter* sp. no hubo presencia de ningún gen (Figura 4).

Resultados en aislados BLEE negativos (78.33%) según su perfil de susceptibilidad identificaron genes BLEE distribuidos en el siguiente orden de porcentajes: blaCTX-M (52.38%), blaOXA-1 (16.7%) y blaTEM (14.7%). La distribución por especies y perfil de susceptibilidad se muestran en la tabla 3.

Figura 4.

Detección de los genes blaCTX-M, blaOXA-1, blaTEM y blaSHV

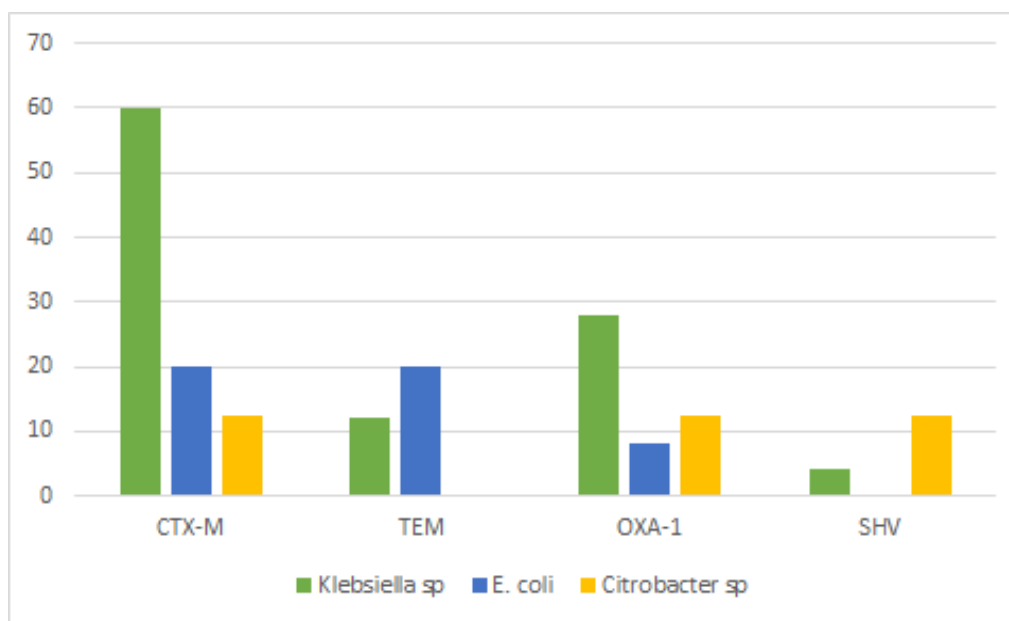


Tabla 3.

Presencia de genes BLEE según especie y perfil de susceptibilidad

	Fenotipo BLEE	CTX-M (%)	TEM (%)	OXA-1 (%)	SHV (%)
<i>E. coli</i>	Positivo	16	0	4	0
(n=25)	Negativo	4	20	4	0
<i>Klebsiella</i> sp.	Positivo	20	4	20	4
(n=25)	Negativo	40	8	8	0
<i>Citrobacter</i> sp.	Positivo	12,5	0	12,5	12,5
(n=8)	Negativo	0	0	0	0

Nota. No se reportó ninguno de los cuatro genes en especies de *Enterobacter* sp.

Un total de 30 aislados fueron secuenciados, determinando ocho especies diferentes, para el género *Klebsiella* se identificaron las especies *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae* y *Klebsiella grimontii*, en el género *Citrobacter* se identificaron las especies *Citrobacter freundii*, *Citrobacter braakii* y *Citrobacter amalonaticus*, y por último se determinó la especie *Escherichia coli*.

El análisis de MLST identificó para *Escherichia coli* BLEE positivo el secuenciotipo ST405, y para BLEE negativo los secuenciotipos ST10, ST394, ST1972 y ST5148. El ST10 y ST405 fueron los más representativos. El ST0 presentó asociación con los genes blaTEM-1B, mdf(A) y tet(A) y; en el ST405 se identificaron los genes blaCTX-M-14 y CMY-2. En *Klebsiella pneumoniae* BLEE positivo no se determinó ningún secuenciotipo y para BLEE negativo se identificó el secuenciotipo ST11. El ST11 porto los genes blaOXA-1, blaKPC-2, blaCTX-M-15 y blaSHV-182.

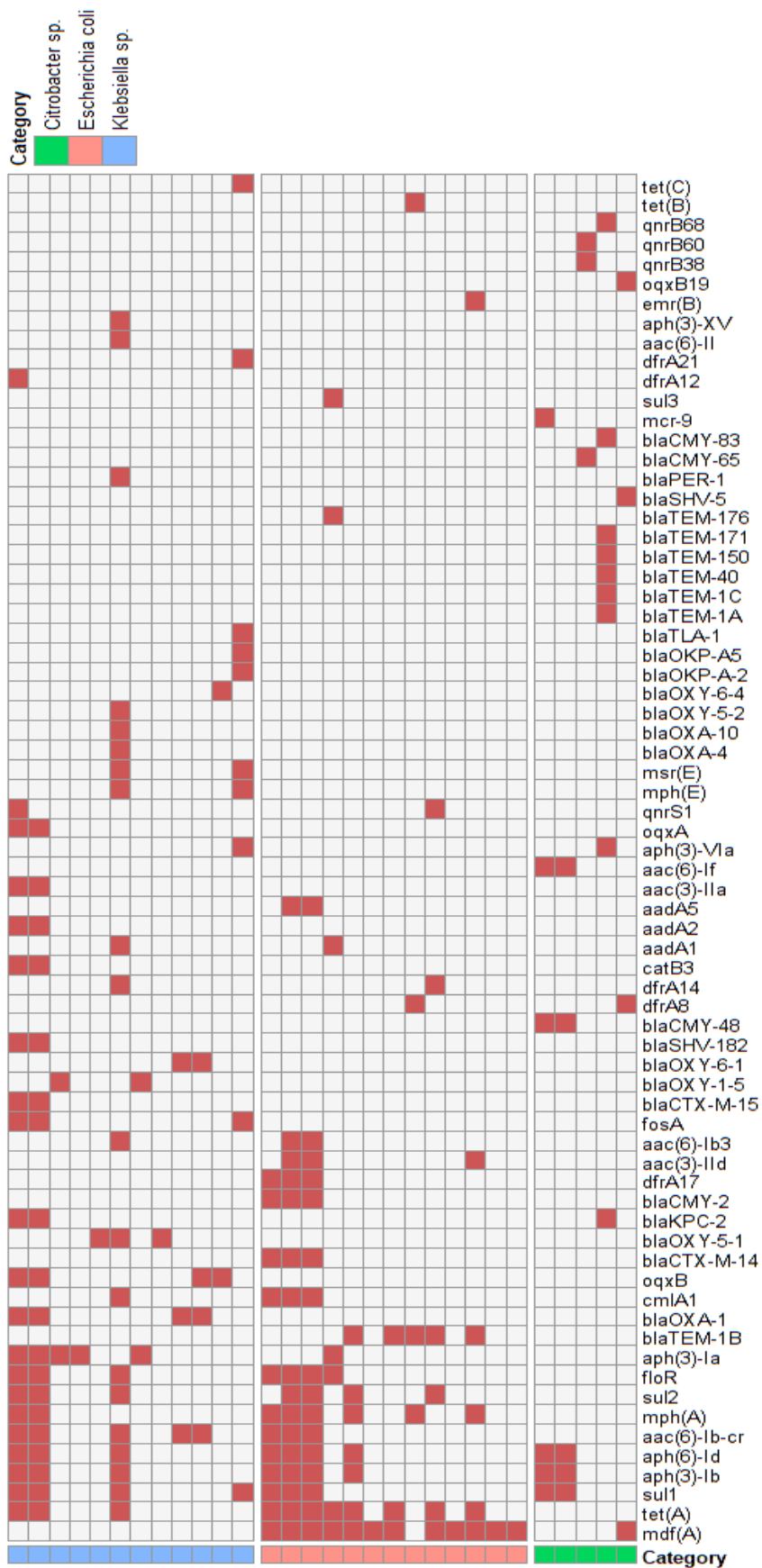
En *Klebsiella grimontii* BLEE positivo se identificó el secuenciotipo ST215 y para *Klebsiella michiganensis* BLEE positivo el ST95. En *Citrobacter freundii* BLEE positivo se

identificó el secuenciotipo ST185 y para BLEE negativo los secuenciotipos ST111 y ST185. No se detectaron secuenciotipos para las especies de *Klebsiella quasipneumoniae*, *Citrobacter braakii* y *Citrobacter amalonaticus*.

El análisis de secuenciamiento identificó 28 genes que confieren resistencia a antibióticos betalactámicos. Dentro de los cuales blaTEM-1B (16.67%) obtuvo el mayor porcentaje, seguido de blaOXA-1 (13.33%) y blaCTX-M-14 (10%). De la misma manera hubo presencia de genes de resistencia para diferentes grupos de antibióticos, entre ellos los más resaltantes fueron mdf(A), tet(A) y sul1. Se detectó también la presencia del gen de resistencia a carbapenémicos (blaKPC-2) en *Klebsiella pneumoniae* (n=2) y *Citrobacter braakii* (n=1) y; de la misma manera el gen resistente a colistina (mcr-9) fue identificado en un aislado de *Citrobacter freundii*. El total de genes de resistencia se pueden observar en la figura 5.

Figura 5

Distribución de genes de aislados secuenciados n=30.



V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se detectaron enterobacterias productoras de enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en aguas residuales provenientes de un hospital de Lima, indicando el riesgo en salud pública que implican los vertidos de un sistema hospitalario. En muchas ocasiones los efluentes de un hospital suelen ser vertidos al sistema de alcantarillado sin un tratamiento previo adecuado, por lo que la transmisión de estas bacterias y la recombinación entre ellas es muy fácil. La resistencia de bacterias hacia antimicrobianos ha sido descrita no solo en efluentes de agua, sino también en suelos, superficies inertes, lodos, entre otros (Afrah F. Abd Al-Kareem et al., 2015; Chagas et al., 2011; Galler et al., 2018; Hendriksen et al., 2019; Lien et al., 2017). En nuestro país el monitoreo de enterobacterias BLEE proveniente de aguas residuales hospitalarias no ha sido descrita, por ende, el enfoque de este estudio representa el primer reporte de importancia ambiental.

Se determinaron aislados productores de BLEE en ambos puntos de muestreo. El punto "B" obtuvo mayor porcentaje de aislados MDR en comparación con el "A", esto puede deberse a que los efluentes de este punto provienen de áreas de cuidados intensivos y se ubica cerca de la planta de tratamiento del hospital. Motivo por el cual creemos que el incremento de *Citrobacter* sp. en este punto fue mayor, debido a la relación con el incremento de infecciones causada por la especie en reportes anteriores (Khadka et al., 2011; Lavigne et al., 2007).

El análisis fenotípico identificó como productoras de BLEE a *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp., y *E. coli*, siendo reportadas en estudios previos (Korzeniewska & Harnisz, 2013; Parvez & Khan, 2018; Prasad .v & Baliyan, 2018). *E. coli* representa una de las especies más resaltantes de

nuestro estudio debido a que posee mayor porcentaje de aislados MDR; sin embargo *K. pneumoniae* y *C. freundii* presento aislados resistentes a meropenem; un antibiótico carbapenémico. La resistencia a carbapenémicos en nuestro país ha ido en aumento en los últimos años, principalmente en aislados de *Klebsiella pneumoniae* identificados en hospitales (Krapp et al., 2018). El total de aislados reportó altos porcentajes de resistencia en amoxicilina, cefalotina y amoxicilina con ácido clavulánico. Evidentemente el incremento de la resistencia está asociado al uso inadecuado de muchos antibióticos, siendo alguno de estos de prescripción médica común, inclusive en pacientes pediátricos (Duarte-Raya et al., 2015; Ecker et al., 2013; Llanos-Zavalaga et al., 2004) . En el caso de las cefalosporinas, muchos autores han demostrado que la resistencia hacia este grupo de antibióticos ha ido en aumento en las últimas décadas (Kim et al., 2017; Onuh & Timilehin, 2016; Park, 2014).

En las últimas décadas los genes BLEE reportados a nivel mundial fueron blaTEM y blaSHV, pero, en los últimos años el incremento de blaCTX-M se ha ido esparciendo (Bevan et al., 2017). Los resultados mediante PCR indicaron que el gen blaCTX-M obtuvo la mayor asociación con aislados BLEE en *E. coli*, *Klebsiella* sp. y *Citrobacter* sp. blaOXA-1 fue el segundo gen asociado al fenotipo BLEE, mientras blaTEM y blaSHV presentaron porcentajes mínimos en esta asociación. Por último, los aislados de *Enterobacter* sp. no presentaron ninguno de los cuatro genes de interés, por ende, el secuenciamiento de su genoma no fue prioridad para este estudio.

El análisis MLST presentó datos de la relación entre el secuenciotipo y las especies. Para *E. coli* el ST10 fue uno de los más comunes, el mismo reportado en humanos y animales (Manges et al., 2015; Seenama et al., 2019), brindando evidencia de la posible diseminación en ecosistemas acuáticos. ST10 está relacionado con varios genes de resistencia entre ellos los genes blaCTX-M-55, blaCTX-M-15, blaCTX-M-14 y blaTEM-1B, en su mayoría resistentes a ampicilina (Day

et al., 2019; Seenama et al., 2019). Los resultados de este estudio mostraron que ST10 es portador de blaTEM-1B y otros genes como mdf(A) y tet(A). En adición estos mismos aislados fueron resistentes a amoxicilina. Otro secuenciotipo frecuente fue el ST405; este ha sido reportado en blaCTX-M-15, blaCTX-M-14, resistente a múltiples fármacos (Hao et al., 2019). En este estudio el ST405 estuvo relacionado con los genes CTX-M-14 y CMY-2 y; fue resistente a la mayoría de los antimicrobianos testeados.

Para *Klebsiella pneumoniae* el ST11 fue el único reportado. El ST 11 está relacionado con los genes blaSHV, blaKPC-2, fosA, oqxA y oqxB (Dong et al., 2018). En este estudio identificamos que el ST11 en *K. pneumoniae* portaba los genes blaOXA-1, blaKPC-2, blaCTX-M-15 y blaSHV-182, concordando con estudio de Dong et al.

Un estudio reciente señala que los aislados encontrados en efluentes hospitalarios muchas veces coinciden con muestras extraídas de pacientes (Raven et al., 2019). Sin embargo, para poder realizar un estudio similar hacen falta otras variables.

Una limitación de nuestro estudio es que solo tomamos muestras de un sistema hospitalario, siendo el único evaluado, nuestros hallazgos pueden diferir en comparación con la ubicación y situación de toma de muestras provenientes de otros hospitales. Adicionalmente no tomamos muestras fecales de los pacientes hospitalizados, esto serviría para realizar un análisis filogenético y determinar la diseminación de genes de resistencia, mejorando el monitoreo de enterobacterias BLEE.

VI. CONCLUSIONES

- En este estudio se demostró que un hospital es fuente de enterobacterias portadoras de genes BLEE provenientes de aguas residuales de un hospital de Lima, teniendo el potencial de servir como medio de diseminación hacia las comunidades aledañas.
- *E.coli* y *Klebsiella* sp. fueron las especies que presentaron mayor porcentaje MDR y producción de BLEE, sugiriendo la transmisión de genes de resistencia hacia otras especies.
- Amoxicilina, amoxicilina con ácido clavulánico y cefalotina, fueron los antibióticos con mayor porcentaje de resistencia caracterizados en aislados de enterobacterias de este estudio.
- El gen blaCTX-M fue uno de los genes más frecuentes en las especies de *E.coli*, *Klebsiella* sp. y *Citrobacter* sp.

VII. RECOMENDACIONES

- Se necesitan realizar pruebas y medidas de control sanitario en la liberación de efluentes de agua hacia el sistema de alcantarillado.
- Extender los estudios sobre el monitoreo de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido provenientes de aguas residuales en hospitales del Perú.
- Es importante evaluar la diversidad microbiana en el entorno hospitalario y controlar al mismo tiempo la descarga de aislados patógenos, para evitar el ingreso de los mismos al medio ambiente.
- Trabajar en mejorar los métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias BLEE.
- Usar kits comerciales para la identificación de especies enterobacterianas.
- Ampliar la búsqueda de genes BLEE en los aislados identificados en este estudio.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afrah F. Abd Al-Kareem, Kadhum H. Al-Arajy, & Kifah A. Jassim. (2015). Prevalence of CTX-M Gene in Klebsiella Pneumonia Isolated from Surface Water of Tigris River within Baghdad Province. *Advances in Life Science and Technology*, 30, 15-19. <http://www.iiste.org/>
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 289(1036), 321-331. <http://rstb.royalsocietypublishing.org/>
- Bajpai, T., Pandey, M., Varma, M., & Bhatambare, G. S. (2017). Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Beta-Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna Journal of Medicine*, 7(1), 12-16. <https://doi.org/10.4103/2231-0770.197508>
- Band, V. I., & Weiss, D. S. (2015). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 4(1), 18-41. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4010018>
- Baraniak A., Fiett J., Hryniewicz W., Nordmann P., & Gniadkowski M. (2002). Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Poland. - PubMed—NCBI. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 393-396. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12205064>
- Barlow, M., & Hall, B. G. (2002). Origin and Evolution of the AmpC β -Lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), 1190-1198.

<https://doi.org/10.1128/AAC.46.5.1190-1198.2002>

- Bartoloni, A., Pallecchi, L., Benedetti, M., Fernandez, C., Vallejos, Y., Guzman, E., Villagran, A. L., Mantella, A., Lucchetti, C., Bartalesi, F., Strohmeyer, M., Bechini, A., Gamboa, H., Rodríguez, H., Falkenberg, T., Kronvall, G., Gotuzzo, E., Paradisi, F., & Rossolini, G. M. (2006). Multidrug-resistant Commensal *Escherichia coli* in Children, Peru and Bolivia. *Emerging Infectious Diseases*, *12*(6), 907-913. <https://doi.org/10.3201/eid1206.051258>
- Bauer AW., Kirby WM., Sherris JC., & Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal Clinical Pathology*, *45*(4), 493-496. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493
- Becker, K., Denis, O., Roisin, S., Mellmann, A., Idelevich, E. A., Knaack, D., van Alen, S., Kriegeskorte, A., Köck, R., Schaumburg, F., Peters, G., & Ballhausen, B. (2016). Detection of *mecA*- and *mecC*-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates by the New Xpert MRSA Gen 3 PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, *54*(1), 180-184. <https://doi.org/10.1128/JCM.02081-15>
- Belaouaj, A., Lapoumeroulie, C., Caniça, M. M., Vedel, G., Névot, P., Krishnamoorthy, R., & Paul, G. (1994). Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like beta-lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiology Letters*, *120*(1-2), 75-80. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07010.x>
- Bevan, E. R., Jones, A. M., & Hawkey, P. M. (2017). Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(8), 2145-2155. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx146>

- Biskri, L., & Mazel, D. (2003). Erythromycin esterase gene ere(A) is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(10), 3326-3331.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, *13*(1), 42-51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Boehmer, T., Vogler, A. J., Thomas, A., Sauer, S., Hergenroether, M., Straubinger, R. K., Birdsell, D., Keim, P., Sahl, J. W., Williamson, C. H. D., & Riehm, J. M. (2018). Phenotypic characterization and whole genome analysis of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from dogs in Germany. *PLOS ONE*, *13*(10), e0206252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206252>
- Bois, S. K. D., Marriott, M. S., & Amyes, S. G. B. (1995). TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases: Relationship between selection, structure and function. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *35*(1), 7-22. <https://doi.org/10.1093/jac/35.1.7>
- Bonnet, R. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: The CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004>
- Bonnet R., Sampaio JL., Labia R., De Champs C., Sirot D., Chanal C., & Sirot J. (2000). A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. - PubMed—NCBI. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(7), 1936-1942. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858358>

- 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, table of contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
- Brenner D, Krieg N, Staley J, & Garrity G. (2005). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* (Springer, Vol. 2nd).
- Bush, K. (1989). Characterization of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(3), 259-263. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC171476/>
- Bush, K., Jacoby, G., & Medeiros, A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), 1211-1233.
- Bush, Karen. (2010). Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Current Opinion in Microbiology*, 13(5), 558-564. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.006>
- Cantón, R., González-Alba, J. M., & Juan Carlos Galán. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>
- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., & Coque, T. M. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 Suppl 1, 144-153. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01850.x>

- Celenza, G., Pellegrini, C., Caccamo, M., Segatore, B., Amicosante, G., & Perilli, M. (2006). Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(5), 975-978. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl055>
- Chagas, T. P. G., Seki, L. M., Cury, J. C., Oliveira, J. a. L., Dávila, A. M. R., Silva, D. M., & Asensi, M. D. (2011). Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3), 572-581. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05072.x>
- Chang, F.Y., Siu, L. K., Fung, C.P., Huang, M.H., & Ho, M. (2001). Diversity of SHV and TEM β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: Gene Evolution in Northern Taiwan and Two Novel β -Lactamases, SHV-25 and SHV-26. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9), 2407-2413. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.9.2407-2413.2001>
- Chiu, S.K., Ma, L., Chan, M.C., Lin, Y.T., Fung, C.P., Wu, T.L., Chuang, Y.C., Lu, P.L., Wang, J.T., Lin, J.C., & Yeh, K.M. (2018). Carbapenem Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: Dissemination and Increasing Resistance of Carbapenemase Producers During 2012–2015. *Scientific Reports*, 8(1), 8468. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26691-z>
- Clausen, P. T. L. C., Zankari, E., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2016). Benchmarking of methods for identification of antimicrobial resistance genes in bacterial whole genome data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(9), 2484-2488. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw184>
- CLSI. (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th ed.
- Codjoe, F. S., & Donkor, E. S. (2017). Carbapenem Resistance: A Review. *Medical Sciences*, 6(1).

<https://doi.org/10.3390/medsci6010001>

Colquechagua Aliaga, F., Sevilla Andrade, C., & Gonzales Escalante, E. (2015). Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 32(1), 26-32.

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1726-46342015000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Day, M. J., Hopkins, K. L., Wareham, D. W., Toleman, M. A., Elviss, N., Randall, L., Teale, C., Cleary, P., Wiuff, C., Doumith, M., Ellington, M. J., Woodford, N., & Livermore, D. M. (2019). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in human-derived and foodchain-derived samples from England, Wales, and Scotland: An epidemiological surveillance and typing study. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(12), 1325-1335. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30273-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30273-7)

Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1794(5), 808-816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>

Deng, X., Sun, F., Ji, Q., Liang, H., Missiakas, D., Lan, L., & He, C. (2012). Expression of multidrug resistance efflux pump gene *norA* is iron responsive in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 194(7), 1753-1762. <https://doi.org/10.1128/JB.06582-11>

Díaz, C. A., Cabeza, J. G., Verau, E. A., Rojas, J. T., & Diestra, K. M. C. (2017). Detección y caracterización genotípica de betalactamasas de *Escherichia coli* uropatógenas del Hospital Belén de Trujillo durante enero-abril de 2015. *PUEBLO CONTINENTE*, 28(1), 57-66. <http://journal.upao.edu.pe/PuebloContinente/article/view/754>

- Dirección General de Salud Ambiental- Ministerio de Salud del Perú. (2007). *Protocolo de Monitoreo de la Calidad Sanitaria de los Recursos Hídricos Superficiales* (Recuperado de <http://www.digesa.minsa.gob.pe.>).
- Dong, N., Zhang, R., Liu, L., Li, R., Lin, D., Chan, E. W.-C., & Chen, S. (2018). Genome analysis of clinical multilocus sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* from China. *Microbial Genomics*, 4(2). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000149>
- Duarte-Raya, F., Rodríguez-Lechuga, M., Anda-Gómez, M. A. de, Granados-Ramírez, M. P., & Vargas-Rodríguez, A. G. (2015). Uso adecuado de antimicrobianos en pediatría en un hospital de tercer nivel. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(2), 150-157. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=56560>
- Dzyubak, E., & Yap, M.N. F. (2016). The Expression of Antibiotic Resistance Methyltransferase Correlates with mRNA Stability Independently of Ribosome Stalling. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(12), 7178-7188. <https://doi.org/10.1128/AAC.01806-16>
- Ecker, L., Ochoa, T. J., Vargas, M., Valle, L. J. D., & Ruiz, J. (2013). Preferencias de uso de antibióticos en niños menores de cinco años por médicos de centros de salud de primer nivel en zonas periurbanas de Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(2). <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2013.302.189>
- Edelstein, M., Pimkin M., Palagin I., Edelstein I., & Stratchounski I. (2003). Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 47(12), 3724-3732.

- Fakioglu, E., Queenan, A. M., Bush, K., Jenkins, S. G., & Herold, B. C. (2006). Amp C β - lactamase-producing *Escherichia coli* in neonatal meningitis: Diagnostic and therapeutic challenge. *Journal of Perinatology*, *26*(8), 515. <https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211550>
- Farajnia, S., Azhari, F., Alikhani, M. Y., Hosseini, M. K., Peymani, A., & Sohrabi, N. (2013). Prevalence of PER and VEB Type Extended Spectrum Betalactamases among Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates in North-West of Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *16*(6), 751-755. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3758029/>
- Favrot, L., Blanchard, J. S., & Vergnolle, O. (2016). Bacterial GCN5-Related N-Acetyltransferases: From Resistance to Regulation. *Biochemistry*, *55*(7), 989-1002. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01269>
- Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *25*(4), 661-681. <https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12>
- Floyd, J. L., Smith, K. P., Kumar, S. H., Floyd, J. T., & Varela, M. F. (2010). LmrS Is a Multidrug Efflux Pump of the Major Facilitator Superfamily from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(12), 5406-5412. <https://doi.org/10.1128/AAC.00580-10>
- Galler, H., Feierl, G., Petternel, C., Reinthaler, F. F., Haas, D., Habib, J., Kittinger, C., Luxner, J., & Zarfel, G. (2018). Multiresistant Bacteria Isolated from Activated Sludge in Austria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(3). <https://doi.org/10.3390/ijerph15030479>

- Galván, F., Agapito, J., Bravo, N., Lagos, J., & 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. <https://doi.org/10.20453/rmh.v27i1.2780>
- García, C., Astocondor, L., & Banda, C. (2012). Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y en el Perú. *Acta Médica Peruana*, 29(3), 163-169. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1728-59172012000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- García, C., Horna, G., Linares, E., Ramírez, R., Tapia, E., Velásquez, J., Medina, V., Guevara, J., Urbina, M., Zevallos, S., Espinoza, N., Samalvides, F., & Jacobs, J. (2012). Antimicrobial Drug Resistance in Peru. *Emerging Infectious Diseases*, 18(3), 520-521. <https://doi.org/10.3201/eid1803.100878>
- García-Mostajo, J. A., Alva-Díaz, C., & Rivera-Morón, P. (2015). Frecuencia de infección del tracto urinario intrahospitalaria por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido y factores asociados en un hospital nacional. *Rev. Soc. Peru. Med. Interna*, 28(3), 113-120. http://medicinainterna.net.pe/images/REVISTAS/2015/revista_28_3_2015/2_articulo_original.pdf
- Ghai, I., & Ghai, S. (2018). Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infection and Drug Resistance*, 11, 523-530. <https://doi.org/10.2147/IDR.S156995>
- Ghiglione B., Rodriguez M., Curto L., Brunetti F., Dropa M., Bonomo R., Power P., & Gutkind G. (2018). Defining Substrate Specificity in the CTX-M Family: The Role of Asp240 in

- Ceftazidime Hydrolysis. - PubMed—NCBI. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6), 116-118. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29632016>
- Grigorenko, V. G., Rubtsova, M. Y., Uporov, I. V., Ishtubaev, I. V., Andreeva, I. P., Shcherbinin, D. S., Veselovsky, A. V., & Egorov, A. M. (2017). [Bacterial TEM-type serine beta-lactamases: Structure and analysis of mutations]. *Biomeditsinskaia Khimiia*, 63(6), 499-507. <https://doi.org/10.18097/PBMC20176306499>
- Guillén, R., Velázquez, G., Lird, G., Espínola, C., Laconich, M., Carpinelli, L., Menacho, C., Ortellado, J., Fariña, N., Franco, L., Rodríguez, Á., & Russomando, G. (2016). Molecular detection of extended spectrum beta-lactamase (esbl) in enterobacteria isolated in Asunción. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 14(1), 8-16. [https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014\(01\)08-016](https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(01)08-016)
- Guérin, F., Isnard, C., Cattoir, V., & Giard, J. C. (2015). Complex Regulation Pathways of AmpC-Mediated β -Lactam Resistance in *Enterobacter cloacae* Complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(12), 7753-7761. <https://doi.org/10.1128/AAC.01729-15>
- Hall, L. M., Livermore, D. M., Gur, D., Akova, M., & Akalin, H. E. (1993). OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(8), 1637-1644. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC188033/>
- Hall, B., & Barlow, M. (2005). Revised Ambler classification of β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(6), 1050-1051. <https://doi.org/10.1093/jac/dki130>
- Hao, Y., Shao, C., Geng, X., Bai, Y., Jin, Y., & Lu, Z. (2019). Genotypic and Phenotypic

- Characterization of Clinical *Escherichia coli* Sequence Type 405 Carrying IncN2 Plasmid Harboring blaNDM-1. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00788>
- Hassen, B., Sghaier, S., Abbassi, M. S., Ferjani, M. A., Ben Said, M., Hassen, A., & Hammami, S. (2018). Multidrug Resistance and the Predominance of blaCTX-M in Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae of Animal and Water Origin. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 201-206. <https://doi.org/10.1159/000495409>
- Hellmich, U. A., Mönkemeyer, L., Velamakanni, S., van Veen, H. W., & Glaubitz, C. (2015). Effects of nucleotide binding to LmrA: A combined MAS-NMR and solution NMR study. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1848(12), 3158-3165. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.003>
- Hendriksen, R. S., Munk, P., Njage, P., Bunnik, B. van, McNally, L., Lukjancenko, O., Röder, T., Nieuwenhuijse, D., Pedersen, S. K., Kjeldgaard, J., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Vogt, J. K., Leekitcharoenphon, P., Schans, M. G. M. van de, Zuidema, T., Husman, A. M. de R., Rasmussen, S., Petersen, B., ... Aarestrup, F. M. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nature Communications*, 10(1), 1124. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3>
- Huizinga, P., Schrauwen, E., García-Cobos, S., Willemsen, I., Verhulst, C., Friedrich, A. W., Savelkoul, P. H. M., Rossen, J. W., & Kluytmans, J. (2018). Extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) isolated from bean sprouts in the Netherlands. *PLOS ONE*, 13(8), e0203338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203338>

- Jacoby, G. A., Medeiros, A. A., O'Brien, T. F., Pinto, M. E., & Jiang, H. (1988). Broad-spectrum, transmissible beta-lactamases. *The New England Journal of Medicine*, 319(11), 723-724. <https://doi.org/10.1056/NEJM198809153191114>
- Jacoby, George A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161-182, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
- Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(4), 867-878. <https://doi.org/10.1093/clinids/10.4.867>
- Jin, Y., Nair, A., & van Veen, H. W. (2014). Multidrug transport protein norM from vibrio cholerae simultaneously couples to sodium- and proton-motive force. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(21), 14624-14632. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.546770>
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 3. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Jorgensen J., Pfaller M., Carroll K., Landry M., Funke G., Richter S., & Warnock D. (2015). *Manual of Clinical Microbiology* (11 th, Vol. 1).
- Katayama, Y., Ito, T., & Hiramatsu, K. (2000). A New Class of Genetic Element, Staphylococcus Cassette Chromosome mec, Encodes Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1549-1555. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89911/>

- Khadka, S., Thapa, B., & Mahat, K. (2011). Nosocomial *Citrobacter* Infection in Neonatal Intensive Care Unit in a Hospital of Nepal. *Journal of Nepal Paediatric Society*, *31*.
<https://doi.org/10.3126/jnps.v31i2.4094>
- Khari, F. I. M., Karunakaran, R., Rosli, R., & Tay, S. T. (2016). Genotypic and Phenotypic Detection of AmpC β -lactamases in *Enterobacter* spp. Isolated from a Teaching Hospital in Malaysia. *PLOS ONE*, *11*(3), e0150643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150643>
- Kim, D., Ahn, J. Y., Lee, C. H., Jang, S. J., Lee, H., Yong, D., Jeong, S. H., & Lee, K. (2017). Increasing Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins, Fluoroquinolone, and Carbapenem in Gram-Negative Bacilli and the Emergence of Carbapenem Non-Susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*: Analysis of Korean Antimicrobial Resistance Monitoring System (KARMS) Data From 2013 to 2015. *Annals of Laboratory Medicine*, *37*(3), 231-239. <https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.3.231>
- Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., Goossens, H., & Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(15), E3463-E3470.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>
- Korzeniewska, E., & Harnisz, M. (2013). Beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospital effluents. *Journal of Environmental Management*, *123*, 1-7.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.03.024>
- Lapuebla, A., Abdallah, M., Olafisoye, O., Cortes, C., Urban, C., Landman, D., & Quale, J. (2015). Activity of Imipenem with Relebactam against Gram-Negative Pathogens from New York

- City. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8), 5029-5031.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00830-15>
- Lavigne, J.P., Defez, C., Bouziges, N., Mahamat, A., & Sotto, A. (2007). Clinical and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Citrobacter* spp. Infections in a French university hospital. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 26(6), 439-441.
<https://doi.org/10.1007/s10096-007-0315-3>
- 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>
- Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 34-44.
<https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
- Lien, L. T. Q., Lan, P. T., Chuc, N. T. K., Hoa, N. Q., Nhung, P. H., Thoa, N. T. M., Diwan, V., Tamhankar, A. J., & Stålsby Lundborg, C. (2017). Antibiotic Resistance and Antibiotic Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Hospital Wastewater in Vietnam. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(7).
<https://doi.org/10.3390/ijerph14070699>
- Lin, W.P., Wang, J.T., Chang, S.C., Chang, F.Y., Fung, C.P., Chuang, Y.C., Chen, Y.S., Shiau, Y.R., Tan, M.C., Wang, H.Y., Lai, J.F., Huang, I.W., & Lauderdale, T.L. (2016). The Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* from Community Settings in Taiwan, a Trend Analysis. *Scientific Reports*, 6, 36280. <https://doi.org/10.1038/srep36280>

- Lisa, M.N., Palacios, A. R., Aitha, M., González, M. M., Moreno, D. M., Crowder, M. W., Bonomo, R. A., Spencer, J., Tierney, D. L., Llarrull, L. I., & Vila, A. J. (2017). A general reaction mechanism for carbapenem hydrolysis by mononuclear and binuclear metallo- β -lactamases. *Nature Communications*, 8(1), 538. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00601-9>
- Llanos-Zavalaga, F., Silva T, E., Velásquez H, J., Reyes L, R., & Mayca P, J. (2004). Prescripción de antibióticos en consulta externa pediátrica de un hospital de Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 20(1), 28-36. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1726-46342004000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Ma, J., Liu, J.-H., Lv, L., Zong, Z., Sun, Y., Zheng, H., Chen, Z., & Zeng, Z.-L. (2012). Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase Genes Found among *Escherichia coli* Isolates from Duck and Environmental Samples Obtained on a Duck Farm. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10), 3668-3673. <https://doi.org/10.1128/AEM.07507-11>
- 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), e02453-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02453-17>
- Manges, A. R., Harel, J., Masson, L., Edens, T. J., Portt, A., Reid-Smith, R. J., Zhanel, G. G., Kropinski, A. M., & Boerlin, P. (2015). Multilocus sequence typing and virulence gene profiles associated with *Escherichia coli* from human and animal sources. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(4), 302-310. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1860>
- Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., & Frère, J. M. (1998). Catalytic properties of class A beta-

- lactamases: Efficiency and diversity. *Biochemical Journal*, 330(Pt 2), 581-598.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1219177/>
- Meletis, G. (2016). Carbapenem resistance: Overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 3(1), 15-21.
<https://doi.org/10.1177/2049936115621709>
- Melgarejo, J. L., Cardoso, M. H., Pinto, I. B., Faria-Junior, C., Mendo, S., de Oliveira, C. E., & Franco, O. L. (2019). Identification, molecular characterization, and structural analysis of the blaNDM-1 gene/enzyme from NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *The Journal of Antibiotics*, 72(3), 155-163. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0126-z>
- Morar, M., Pengelly, K., Koteva, K., & Wright, G. D. (2012). Mechanism and diversity of the erythromycin esterase family of enzymes. *Biochemistry*, 51(8), 1740-1751.
<https://doi.org/10.1021/bi201790u>
- 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
- Morones-Esquivel, I., Salgado-Muñoz, T. G., Gonzaga-López, T. I., Matamoros-Mejía, A. P., Terán-González, J. O., Arteaga-Vázquez, S., Castro-D'Franchis, L. J., Reyes-Jiménez, A. E., López-González, D. S., & Meza-Oviedo, D. (2016). Enterobacterias con betalactamasas de espectro extendido en hemocultivos y urocultivos. *Medicina Interna de México*, 32(4), 381-387. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=66808>
- Naas, T., Poirel, L., & Nordmann, P. (2008). Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clinical*

- Microbiology and Infection*, 14, 42-52. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01861.x>
- Nakashima, R., Sakurai, K., Yamasaki, S., Nishino, K., & Yamaguchi, A. (2011). Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature*, 480(7378), 565-569. <https://doi.org/10.1038/nature10641>
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 67(4), 593-656.
- Nikaido, H., & Takatsuka, Y. (2009). Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1794(5), 769-781. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.10.004>
- Nogueira, K. da S., Conte, D., Maia, F. V., Dalla-Costa, L. M., Nogueira, K. da S., Conte, D., Maia, F. V., & Dalla-Costa, L. M. (2015). Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(2), 162-169. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0009-2015>
- Nordmann, P., Ronco, E., Naas, T., Duport, C., Michel-Briand, Y., & Labia, R. (1993). Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(5), 962-969. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC187863/>
- Onuh, J., & Timilehin, A. (2016). *Bacteria Resistance to Cephalosporins and its Implication to public health*. 3(1), 1-6. <http://www.austinpublishinggroup.com/>
- Ovalle, M. V., Saavedra, S. Y., González, M. N., Hidalgo, A. M., Duarte, C., Beltrán, M., Ovalle, M. V., Saavedra, S. Y., González, M. N., Hidalgo, A. M., Duarte, C., & Beltrán, M. (2017). Results of the national surveillance of antimicrobial resistance of Enterobacteriaceae and

- Gram negative bacilli in health care-associated infections in Colombia, 2012-2014. *Biomédica*, 37(4), 473-485. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3432>
- Padilla, E., Llobet, E., Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Bengoechea, J. A., & Albertí, S. (2010). Klebsiella pneumoniae AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 177-183. <https://doi.org/10.1128/AAC.00715-09>
- Park, S. H. (2014). Third-generation cephalosporin resistance in gram-negative bacteria in the community: A growing public health concern. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 29(1), 27-30. <https://doi.org/10.3904/kjim.2014.29.1.27>
- Parvez, S., & Khan, A. U. (2018). Hospital sewage water: A reservoir for variants of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)- and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(1), 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.08.032>
- Pavez, M., Troncoso, C., Osses, I., Salazar, R., Illesca, V., Reydet, P., Rodríguez, C., Chahin, C., Concha, C., & Barrientos, L. (2019). High prevalence of CTX-M-1 group in ESBL-producing enterobacteriaceae infection in intensive care units in southern Chile. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 23(2), 102-110. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2019.03.002>
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657-686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>

- Pell, P. A., & Sneath, P. H. (1984). A note on the survival of bacteria in cryoprotectant medium at temperatures above 0 degrees C. *The Journal of Applied Bacteriology*, 57(1), 165-167.
- Pfeifer, Y., Cullik, A., & Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 300(6), 371-379. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.005>
- Philippon, A., Labia, R., & Jacoby, G. (1989). Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(8), 1131-1136. <https://doi.org/10.1128/aac.33.8.1131>
- Philippon, Alain, Arlet, G., & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-Determined AmpC-Type β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1), 1-11. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.1.1-11.2002>
- Piddock, L. J. V. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), 382-402. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006>
- Poehlsgaard, J., & Douthwaite, S. (2005). The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(11), 870-881. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1265>
- Poirel, L., Le Thomas, I., Naas, T., Karim, A., & Nordmann, P. (2000). Biochemical Sequence Analyses of GES-1, a Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase, and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 622-632. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89737/>
- Potron, A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology.

- International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(6), 568-585.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>
- Prasad, G., & Baliyan, S. (2018). Prevalence of Antibiotic Resistance among Bacterial Isolates from Hospital Environments and Effluents. *Journal of Bacteriology*, 5(7):1082.
<http://www.austinpublishinggroup.com/>
- Pulido, I. Y., Mantilla, J. R., Valenzuela, E. M., Reguero, M. T., & Gonzalez, E. B. (2011). Distribution of extended spectrum & beta-lactamases-codifying genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitals of Bogota, D.C., Colombia. *Biomédica*, 31(1), 15-20.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-41572011000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Qin, S., Wang, Y., Zhang, Q., Chen, X., Shen, Z., Deng, F., Wu, C., & Shen, J. (2012). Identification of a novel genomic island conferring resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(10), 5332-5339. <https://doi.org/10.1128/AAC.00809-12>
- Quinteros, M., Radice, M., Gardella, N., Rodriguez, M. M., Costa, N., Korbenfeld, D., Couto, E., & Gutkind, G. (2003). Extended-Spectrum β -Lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), 2864-2867. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2864-2867.2003>
- Raven, K. E., Ludden, C., Gouliouris, T., Blane, B., Naydenova, P., Brown, N. M., Parkhill, J., & Peacock, S. J. (2019). Genomic surveillance of *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plants as an indicator of clinically relevant pathogens and their resistance genes. *Microbial Genomics*, 5(5), e000267. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000267>

- Rivera, A., Larrosa, N., Mirelis, B., & Navarro, F. (2014). Importancia de los controles de calidad para la detección de la resistencia a antibióticos β -lactámicos en enterobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32, 30-36. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70147-8](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70147-8)
- Roy, C., Foz, A., Segura, C., Tirado, M., Fuster, C., & Reig, R. (1983). Plasmid-determined beta-lactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant Enterobacteriaceae. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 12(5), 507-510. <https://doi.org/10.1093/jac/12.5.507>
- Ruggerone, P., Murakami, S., Pos, K. M., & Vargiu, A. V. (2013). RND efflux pumps: Structural information translated into function and inhibition mechanisms. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(24), 3079-3100.
- Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., & Torres, C. (2004). Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant Escherichia coli Strains of Human, Animal, and Food Origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3996. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3996-4001.2004>
- Sampaio, J. L. M., & Gales, A. C. (2016). Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: Focus on β -lactams and polymyxins. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(Suppl 1), 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.002>
- Seenama, C., Thamlikitkul, V., & Rattawongjirakul, P. (2019). Multilocus sequence typing and blaESBL characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli isolated from healthy humans and swine in Northern Thailand. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2201-2214. <https://doi.org/10.2147/IDR.S209545>

- Sennati, S., Santella, G., Di Conza, J., Pallecchi, L., Pino, M., Ghiglione, B., Rossolini, G. M., Radice, M., & Gutkind, G. (2012). Changing Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamases in Argentina: Emergence of CTX-M-15. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11), 6003-6005. <https://doi.org/10.1128/AAC.00745-12>
- Seral, C., Gude, J., & Castillo, J. (2012). Emergencia de b-lactamasas AmpC plasmídica (pAmpC ó cefamicinas): Origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Rev Esp Quimioter*, 25(2), 89-99.
- Shore, A. C., & Coleman, D. C. (2013). Staphylococcal cassette chromosome mec: Recent advances and new insights. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 303(6-7), 350-359. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.002>
- Spanogiannopoulos, P., Wagglechner, N., Koteva, K. P., & Wright, G. D. (2014). A rifamycin inactivating phosphotransferase family shared by environmental and pathogenic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(19), 7102-7107. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402358111>
- Stec, B., Holtz, K. M., Wojciechowski, C. L., & Kantrowitz, E. R. (2005). Structure of the wild-type TEM-1 beta-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(Pt 8), 1072-1079. <https://doi.org/10.1107/S0907444905014356>
- Steward, C. D., Rasheed, J. K., Hubert, S. K., Biddle, J. W., Raney, P. M., Anderson, G. J., Williams, P. P., Brittain, K. L., Oliver, A., McGowan, J. E., & Tenover, F. C. (2001). Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using

- the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum beta-lactamase detection methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8), 2864-2872. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2864-2872.2001>
- Sugumar, M., Kumar, K. M., Manoharan, A., Anbarasu, A., & Ramaiah, S. (2014). Detection of OXA-1 β -Lactamase Gene of *Klebsiella pneumoniae* from Blood Stream Infections (BSI) by Conventional PCR and In-Silico Analysis to Understand the Mechanism of OXA Mediated Resistance. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091800>
- Sun, T., Nukaga, M., Mayama, K., Braswell, E. H., & Knox, J. R. (2003). Comparison of β -lactamases of classes A and D: 1.5-Å crystallographic structure of the class D OXA-1 oxacillinase. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 12(1), 82-91. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2312410/>
- Sykes, R. B., & Matthew, M. (1976). The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their rôle in resistance to β -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2(2), 115-157. <https://doi.org/10.1093/jac/2.2.115>
- Tada, T., Shrestha, S., Shimada, K., Ohara, H., Sherchand, J. B., Pokhrel, B. M., & Kirikae, T. (2017). PER-8, a Novel Extended-Spectrum β -Lactamase PER Variant, from an *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolate in Nepal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(3), e02300-16, [/aac/61/3/e02300-16.atom.](https://doi.org/10.1128/AAC.02300-16) <https://doi.org/10.1128/AAC.02300-16>
- Tanner, W. D., VanDerslice, J. A., Goel, R. K., Leecaster, M. K., Fisher, M. A., Olstadt, J., Gurley, C. M., Morris, A. G., Seely, K. A., Chapman, L., Korando, M., Shabazz, K.-A., Stadsholt, A., VanDeVelde, J., Braun-Howland, E., Minihane, C., Higgins, P. J., Deras, M., Jaber,

- O., Gundlapalli, A. V. (2019). Multi-state study of Enterobacteriaceae harboring extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase genes in U.S. drinking water. *Scientific Reports*, 9(1), 3938. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40420-0>
- Ur Rahman, S., Ali, T., Ali, I., Khan, N. A., Han, B., & Gao, J. (2018). *The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases* [Review Article]. BioMed Research International. <https://doi.org/10.1155/2018/9519718>
- Van Duin, D., & Paterson, D. (2016). Multidrug Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infectious disease clinics of North America*, 30(2), 377-390. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.004>
- Winokur, P. L., Canton, R., Casellas, J.-M., & Legakis, N. (2001). Variations in the Prevalence of Strains Expressing an Extended-Spectrum β -Lactamase Phenotype and Characterization of Isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *Clinical Infectious Diseases*, 32(Supplement_2), S94-S103. <https://doi.org/10.1086/320182>
- Woerther, P.-L., Burdet, C., Chachaty, E., & Andremont, A. (2013). Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: Toward the globalization of CTX-M. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 744-758. <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-13>
- World Health Organization. (2017). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification.

Advanced Drug Delivery Reviews, 57(10), 1451-1470.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002>

Ye, Q., Wu, Q., Zhang, S., Zhang, J., Yang, G., Wang, J., Xue, L., & Chen, M. (2018).

Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae From Retail Food in China. *Frontiers in Microbiology*, 9.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01709>

Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, S., Ubukata, K., & Konno, M. (1990). Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confers resistance to quinolones. *Journal of Bacteriology*, 172(12), 6942-6949.

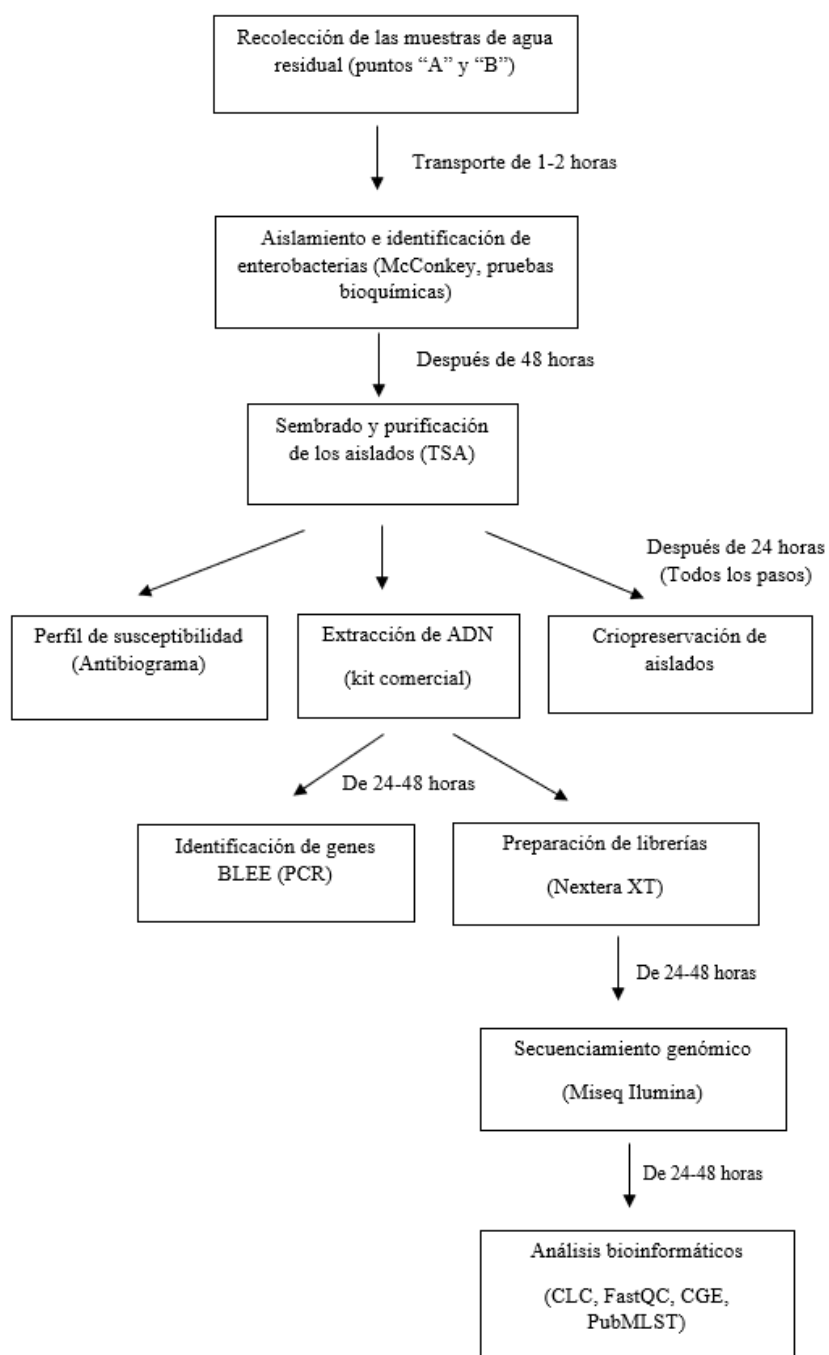
Zaniani, F. R., Meshkat, Z., Naderi Nasab, M., Khaje-Karamadini, M., Ghazvini, K., Rezaee, A., Esmaily, H., Nabavinia, M. S., & Darban Hoseini, M. (2012). The Prevalence of TEM and SHV Genes among Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(1), 654-660.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3586863/>

IX. ANEXOS

Anexo A.

Flujograma de trabajo utilizado para este estudio



Anexo B.

Resultados del perfil de susceptibilidad por punto de muestreo.

Resultados	A n=29 (%)	B n=31 (%)
<i>Multidrogorresistencia</i>		
MDR (3)	10 (27)	27 (73)
<i>BLEE</i>		
Positivo	9 (69.2)	4 (30.8)
<i>Polimixinas</i>		
Colistina	1 (50)	1 (50)
<i>Cloranfenicoles</i>		
Cloranfenicol	6 (85.7)	1 (14.3)
<i>Tetraciclinas</i>		
Tetraciclina	12 (75)	4 (25)
<i>Sulfonamidas</i>		
Sulfatrimetropin	12 (80)	3 (20)
<i>Aminogluocosidos</i>		
Gentamicina	6 (100)	0 (0)
<i>Macrolidos</i>		
Azitromicina	11 (73.4)	4 (26.7)
<i>Penicilinas</i>		
Amoxicilina	23 (60.5)	15 (39.5)
Amoxicilina con ácido clavulanico	10 (50)	10 (50)
Aztreonam	6 (85.7)	1 (14.3)
<i>Cefalosporinas</i>		
Cefalotina	13 (56.5)	10 (43.5)
Cefotaxima	8 (89)	1 (11)
Cefoxitina	8 (47)	9 (53)
Ceftazidima	9 (90)	1 (10)
Cefepime	7 (87.5)	1 (12.5)
<i>Carbapenemicos</i>		
Meropenem	3 (100)	0 (0)
<i>Quinolonas</i>		
Acido nalidixico	16 (89)	2 (11)
Ciprofloxacino	12 (92.3)	1 (7.7)

