



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

**Tipificación de betalactamasas en enterobacterias procedentes del
cepario del Laboratorio Regional de Salud Pública de Cajamarca,
periodo 2023 – 2024**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL
DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACH. FERNÁNDEZ CARRASCO KEVIN JHOY

ASESOR:

Dr. RIVERA JACINTO MARCO ANTONIO

CO-ASESOR:

Mtro. PAIRAZAMÁN QUIROZ OMAR DANIEL

CAJAMARCA – PERÚ

2025

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador: **Kevin Jhoy Fernández Carrasco**
DNI: **74949639**
Escuela Profesional/Unidad UNC: **ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**
2. Asesor:
Dr. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO
Facultad/Unidad UNC: **FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**
3. Grado académico o título profesional al que accede:
☐ Bachiller ☒ Título profesional ☐ Segunda especialidad
☐ Maestro ☐ Doctor
4. Tipo de Investigación:
☒ Tesis ☐ Trabajo de investigación ☐ Trabajo de suficiencia profesional
☐ Trabajo académico
5. Título de Trabajo de Investigación:
Tipificación de betalactamasas en enterobacterias procedentes del cepario del Laboratorio Regional de Salud Pública de Cajamarca, periodo 2023 - 2024
6. Fecha de evaluación del antiplagio: **17/10/2025**
7. Software antiplagio: ☒ **TURNITIN** ☐ **URKUND (OURIGINAL) (*)**
8. Porcentaje de Informe de Similitud: **11 %**
9. Código Documento: **oid:3117:514493166**
10. Resultado de la Evaluación de Similitud:
☒ **APROBADO** ☐ **PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO**

Cajamarca, 20 de octubre del 2025




Dra. SILVIA ISABEL SÁNCHEZ MERCADO
DIRECTORA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN FCS-UNC
DNI 26613805

* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023

COPYRIGHT©
Kevin Jhoy Fernández Carrasco
Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Fernández, K. 2025. **Tipificación de betalactamasas en enterobacterias procedentes del cepario del Laboratorio Regional de Salud Pública de Cajamarca, periodo 2023 – 2024/** Kevin Jhoy Fernández Carrasco

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-asesor: Mtro. Omar Daniel Pairazamán Quiroz

Disertación Académica para obtener el Título Profesional de Biólogo
Biotecnólogo – UNC 2024

Tipificación de betalactamasas en enterobacterias procedentes del cepario del
Laboratorio Regional de Salud Pública de Cajamarca, periodo 2023 – 2024

AUTOR: Bach. Kevin Jhoy Fernández Carrasco

ASESOR: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

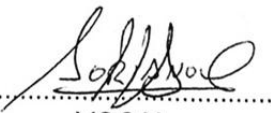
CO-ASESOR: Mtro. Omar Daniel Pairazamán Quiroz

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo –
Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR


.....
PRESIDENTE
Ronald Fernando Zelada Mojme


.....
SECRETARIO (A)
Arando Ulises Diaz Suisa


.....
VOCAL
WILLIAM EDGARDO SORIANO CASTILLO

Cajamarca, 2025 - Perú



Universidad Nacional de Cajamarca

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de Febrero de 1962

Facultad de Ciencias de la Salud

Av. Atahualpa 1050

Teléfono/ Fax 36-5845



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 8 am del 16 de octubre del 2025, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente II-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada:

Tipificación de betalactamasas en enterobacterias procedentes del cepario del Laboratorio Regional de Salud Pública de Cajamarca, periodo 2023-2024

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Kevin Jhoy Fernández Carrasco

Siendo las 9:14 am del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: muy bueno, con el calificativo de: 18, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra apto para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Miembros Jurado Evaluador Nombres y Apellidos		Firma
Presidente:	PhD. Ronal Fernando Zelada Mazmela	
Secretario(a):	M.Cs. Arturo Ulises Díaz Aliaga	
Vocal:	M.Cs. William Edgardo Soriano Castillo	
Accesitaria:		
Asesor (a):	Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto	
Co - Asesor (a):	Mtro. Omer Daniel Parizazu Quiróz	

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

MUY BUENO (17-18)

BUENO (14-16)

REGULAR (12-13)

REGULAR BAJO (11)

DESAPROBADO (10 a menos)

Dedicado a:

Mis padres, Bertha y Darío; a mis abuelos, Ernestina, Isolina y Segundo; a mis tíos:

Reconozco eternamente su entrega absoluta, su dedicación inquebrantable, su respaldo sin condiciones y su invaluable ejemplo. Su constancia y sabiduría transformaron cada sacrificio en semillas de oportunidad, sus lecciones hoy se revelan en logros, y este trabajo es el fruto de la confianza que depositaron en mí

Agradecimiento

Al Maestro Omar Pairazamán, mi co-asesor, por su paciencia infinita, sus enseñanzas y apoyo incondicional, además de mostrarme que el mejor aprendizaje se construye con generosidad y experiencias significativas.

Al Doctor Marco Rivera, mi asesor, por facilitarme el acceso a los equipos y reactivos de biología molecular, además de su experiencia invaluable para el desarrollo de este estudio.

Asimismo, al equipo técnico, tesistas e investigadores que desarrollan sus actividades en el Laboratorio de Microbiología de la UNC a cargo del Doctor Marco Rivera, por su apoyo técnico y procedimental.

A Jennifer, por ser testigo incondicional en cada una de las etapas del desarrollo de este estudio. Tu apoyo ha sido fundamental, este logro es tan tuyo como mío.

Al Laboratorio de Referencia Regional de Salud Pública (LRRSP) de la Dirección Regional de Salud (DIRESA) - Cajamarca, quienes me permitieron realizar este trabajo de investigación y facilitarme equipos y materiales de su institución para la ejecución de la primera fase del presente trabajo.

Al personal que labora en el área de microbiología del LRRSP – DIRESA, Indira, Luis y Soledad, dirigido por el Maestro Omar Pairazamán, cuya compañía hizo de cada jornada en el laboratorio una experiencia enriquecedora y amena.

CONTENIDO

CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
 CAPÍTULO II	 3
MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes de la Investigación	3
2.2. Bases Teóricas.....	8
2.2.1. Orden Enterobacterales.....	8
2.2.1.1. Taxonomía y características generales	8
2.2.1.2. Enterobacterales de importancia clínica.....	10
2.2.2. Antibióticos Betalactámicos	15
2.2.3. Mecanismos de RAM	18
2.2.4. Identificación de mecanismos de RAM.....	26
2.2.4.1. Fenotípico.....	26
2.2.4.2. Genotípico	28
 CAPÍTULO III.....	 30
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS	30
3.1. Nivel de Investigación.....	30
3.2. Tipo y Diseño de Investigación.....	30
3.3. Material Biológico	30
3.4.1. Reactivación e identificación microbiológica de Enterobacterales	31
3.4.2. Pruebas fenotípicas para la detección de β -lactamasas.....	33
3.4.3. Extracción de ADN por shock térmico.....	36
3.4.4. Detección molecular de genes de RAM	37
3.4.5. Electroforesis en gel de agarosa.....	38
3.4.6. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos.....	39
 CAPÍTULO IV	 40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. Resultados	40
4.1.1. Origen e identificación de las muestras bacterianas	40

4.1.2.	Susceptibilidad antimicrobiana.....	41
4.1.3.	Perfil de RAM de las especies bacterianas encontradas	43
4.1.4.	Evaluación fenotípica de β -lactamasas	44
4.1.5.	Evaluación molecular de β -lactamasas	45
4.2.	Discusión.....	50
CAPITULO V		68
5.1.	Conclusiones	68
5.2.	Recomendaciones.....	69
LISTA DE REFERENCIAS		70
APÉNDICES Y ANEXOS		88
APÉNDICES		88
ANEXOS		92

LISTA DE ILUSTRACIONES

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismos catalíticos de las SBLs (A) y MBLs (B)	21
Figura 2. Distribución de frecuencias de bacterias del orden Enterobacterales evaluadas en este estudio	40
Figura 3. Distribución de frecuencias de las bacterias del orden Enterobacterales según su respuesta a los antimicrobianos	42
Figura 4. Screening de producción de β -lactamasas de clase A mediante el método de Jarlier.....	44
Figura 5. Screening de producción de β -lactamasas de clase B, C y D.....	45
Figura 6. Distribución de frecuencias de las cepas resistentes según los genes de RAM que presentan	46
Figura 7. Frecuencia y distribución de genes de β -lactamasas en especies del orden Enterobacterales.....	47
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados mediante PCR de genes de clase A.....	48
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados mediante PCR de genes de clases B, C y D.....	48

Índice de Tablas

Tabla 1. Relaciones moleculares y funcionales entre β -lactamasas.....	26
Tabla 2. Perfil bioquímico en Enterobacterales	32
Tabla 3. Puntos de corte establecidos por el CLSI en prueba de disco difusión.....	34
Tabla 4. Interpretación de resultados en el test de Blue-Carba.....	35
Tabla 5. Primers utilizados para la amplificación de los genes de β -lactamasas por PCR convencional	37
Tabla 6. Susceptibilidad antimicrobiana de bacterias del orden Enterobacterales evaluadas con el método de disco difusión.....	42
Tabla 7. Perfiles de RAM de los aislamientos de Enterobacterales.....	43
Tabla 8. Frecuencia de perfiles genéticos de resistencia antimicrobiana.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

BLEE: Betalactamasa de espectro extendido.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

HGT: Transferencia horizontal de genes.

IAAS: Infecciones asociadas a la atención de la salud.

MBL: Metalobetalactamasa.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RAM: Resistencia a los antimicrobianos.

rpm: Revoluciones por minuto.

UCI: Unidad de cuidados intensivos.

GLOSARIO

***bla*_{CTX-M} (Cefotaximase):** Gen que codifica la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) de la clase A de Ambler, confiere resistencia a la cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y otras cefalosporinas de tercera generación (1).

***bla*_{DHA} (Dhahran Health Assembly):** Gen que codifica la producción de β -lactamasas de tipo AmpC (clase C de Ambler), una enzima que otorga a la bacteria resistencia a una amplia gama de antibióticos β -lactámicos, como penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos (2).

***bla*_{FOX} (Foxitinase):** Gen que codifica la producción de β -lactamasas de tipo AmpC plasmídica (clase C de Ambler), otorga la misma resistencia a antibióticos que la enzima codificada por el gen *bla*_{DHA} (2).

***bla*_{IMP} (Imipinemase):** Gen que codifica una metalo- β -lactamasa (MBL) de la clase B de Ambler. Esta enzima confiere a las bacterias la resistencia a casi todos los β -lactámicos excepto al aztreonam (3).

***bla*_{KPC}:** Codifica β -lactamasas tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), que son enzimas capaces de hidrolizar carbapenémicos, además de penicilinas, cefalosporinas y aztreonam. Pertenecen a la clase A de Ambler (1).

***bla*_{OXA-48}:** Gen que codifica la β -lactamasa de tipo OXA-48 (oxacilinase) de la clase D de Ambler. Confiere actividad hidrolítica a los carbapenémicos, pero en un menor grado comparado con otras carbapenemasas como la KPC (4).

bla_{SHV}: Gen que produce β -lactamasas tipo SHV (Sulphydryl Variable) de la clase molecular A de Ambler, otorgan resistencia a penicilinas y cefalosporinas (1).

bla_{TEM}: Gen de β -lactamasas tipo TEM (Temoneira) de la clase molecular A, común en *Escherichia coli*. Confiere resistencia a penicilinas y también a cefalosporinas (1).

***bla_{VIM}* (Verona Integron-Encoded Metallo- β -lactamase)**: Gen que codifica MBLs pertenecientes a la clase B de Ambler. Confiere resistencia frente a todos los β -lactámicos, excepto el aztreonam (3).

Disco de sensibilidad: Discos de papel filtro impregnados con una determinada concentración de una sustancia antimicrobiana (5).

Electroforesis: Técnica de laboratorio utilizada para separar biomoléculas como ADN, ARN y proteínas, basándose en su peso molecular y carga eléctrica (6).

Fenotipo: Es la manifestación externa de un conjunto de caracteres hereditarios que dependen tanto del material genético como del ambiente para su expresión (7).

Genotipo: Referido a la información genética de todo ser vivo, en este caso, bacteriano, se transmite por herencia y recombinación principalmente (7).

Halo fantasma: Es la manifestación fenotípica de la presencia de BLEE, son zonas de inhibición débiles, tenues o poco definidas que rodean un disco de antibiótico. Otras manifestaciones son, por ejemplo, la formación de protuberancias o aplanamiento de los

halos o alguna otra forma no simétrica de los mismos, algunos conocen a estos fenómenos como como colas de pez u ojos de cerradura (8).

Hidrólisis de un β -lactámico: Proceso bioquímico catalizado por una β -lactamasa que consiste en la ruptura irreversible del enlace amida del anillo β -lactámico (9).

Método de disco difusión: Técnica microbiológica utilizada para determinar la sensibilidad o resistencia de bacterias frente a diferentes antimicrobianos (10).

Método de Jarlier: Técnica microbiológica utilizada para detectar mecanismos de resistencia enzimáticos como las BLEE, utiliza antimicrobianos como las cefalosporinas junto a un inhibidor de β -lactamasas enfrentados a una especie bacteriana de interés (8).

Plásmido: Molécula de ADN circular pequeña ubicada en el citoplasma de las bacterias, es decir, están separadas físicamente del cromosoma y se replican de manera independiente (7).

Shock térmico: Es un proceso físico por el que la pared bacteriana se rompe debido al cambio brusco de temperaturas bajas a altas, esto permite la liberación del contenido citoplasmático de la bacteria, incluido el ADN (11).

“Tipificación de betalactamasas en enterobacterias procedentes del cepario del
Laboratorio Regional de Salud Pública de Cajamarca, periodo 2023 – 2024”

Resumen

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) en Enterobacterales, particularmente a los β -lactámicos, constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial, debido a la proliferación de genes productores de β -lactamasas que complican el tratamiento de infecciones. La presente investigación tuvo como objetivo tipificar las β -lactamasas en enterobacterias procedentes del cepario del Laboratorio Regional de Salud Pública de Cajamarca, durante el periodo 2023 – 2024. Se evaluaron 158 muestras de Enterobacterales mediante métodos fenotípicos como Jarlier, disco difusión y Blue-Carba, para detectar enzimas causantes de RAM. Posteriormente, se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar genes específicos de las cuatro clases moleculares de Ambler. Se detectó la presencia de genes de todas las clases moleculares de Ambler. La clase A fue la más frecuente, destacando el gen *bla*_{CTX-M} en el 30.4% de las especies evaluadas, seguido por *bla*_{TEM} (12.0%), *bla*_{SHV} (8.9%) y *bla*_{KPC} (3.2%). El único gen de la clase B detectado fue *bla*_{VIM} (1.3%). Los genes *bla*_{DHA} y *bla*_{FOX} de la clase C se identificaron en el 7.6% de las especies. Solo se detectó una especie portadora del gen *bla*_{OXA-48} de la clase D. La mayor diversidad de genes productores de β -lactamasas se observó en *E. coli* y *K. pneumoniae*. Se concluye, que la presencia de las cuatro clases moleculares de β -lactamasas en los Enterobacterales estudiados confieren resistencia a un amplio espectro de β -lactámicos. Se resalta la coocurrencia de genes, donde algunos de la clase A fueron acompañados por otros genes de la misma clase o de clases diferentes.

Palabras clave: Enterobacterales, genes de resistencia, β -lactamasas, resistencia a los antimicrobianos (RAM), BLEE, frecuencia.

Abstract

Antimicrobial resistance (AMR) in Enterobacterales, particularly to β -lactams, constitutes a severe global public health problem due to the proliferation of β -lactamase-producing genes that complicate infection treatment. This study aimed to typify β -lactamases in enterobacterias isolated from the strain collection of the Laboratorio Regional de Salud Pública de Cajamarca, during the period 2023–2024. A total of 158 Enterobacterales isolates were evaluated using phenotypic methods such as Jarlier, disk diffusion, and Blue-Carba tests to detect AMR-causing enzymes. Subsequently, polymerase chain reactions (PCR) were performed to identify specific genes from the four Ambler molecular classes. Genes from all Ambler molecular classes were detected. Class A was the most frequent, highlighting the *bla*_{CTX-M} gene in 30.4% of the evaluated species, followed by *bla*_{TEM} (12.0%), *bla*_{SHV} (8.9%), and *bla*_{KPC} (3.2%). The only Class B gene detected was *bla*_{VIM} (1.3%). Class C genes, *bla*_{DHA} and *bla*_{FOX}, were identified in 7.6% of the species. Only one species carrying a Class D gene was detected. The highest diversity of β -lactamase-producing genes was observed in *E. coli* and *K. pneumoniae*. It is concluded, that the presence of the four molecular classes of β -lactamases in the Enterobacterales studied confers resistance to a broad spectrum of β -lactams. The co-occurrence of genes is noteworthy, with some Class A genes accompanied by other genes of the same class or from different classes.

Key words: Enterobacterales, resistance genes, β -lactamases, antimicrobial resistance (AMR), ESBL, frequency

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es uno de los problemas de salud pública más graves a nivel mundial (12). La Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha declarado como una de las diez amenazas más importantes a las que se enfrenta la humanidad (13). Más de 700 mil muertes promedio al año se producen por infecciones causadas por bacterias resistentes; siendo el 2019 el año con mayor número de decesos, donde las infecciones por bacterias resistentes causaron más de 1.2 millones de muertes a nivel global (14,15). Se estima que, para antes del 2050, las cifras aumenten a más de 10 millones de decesos anuales y pérdidas económicas que superarían los 100 billones de dólares (16).

Los Enterobacterales actualmente son objeto de estudio debido a la plasticidad genética, facilidad y rapidez con que adquieren RAM, como por ejemplo *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* con numerosos genes de resistencia reportados. *Klebsiella* y *Enterobacter*, están actualmente incluidos dentro del grupo “ESKAPE”, que engloba a las bacterias más resistentes y con mayores reportes de producción de enzimas hidrolíticas como las β -lactamasas (17,18). Se han descrito reportes de la producción de carbapenemasas, β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), AmpC y oxacilinasas (OXA) a nivel mundial en Enterobacterales, confiriendo resistencia a todo tipo de β -lactámicos (19).

La reciente pandemia del SARS-CoV-2 ha agudizado esta crisis, impulsando un incremento en la frecuencia de reportes de RAM, específicamente aquella mediada por β -lactamasas. Este incremento se atribuye al uso masivo de antibióticos y a la mayor

presión selectiva en entornos hospitalarios durante ese periodo (20). La no identificación oportuna de las β -lactamasas conlleva a un retraso de la terapia con antibióticos adecuados, acelerando el desarrollo de la RAM (23). En nuestra región, si bien se reportan frecuentemente aislados de Enterobacterales productores de β -lactamasas, la gran variedad genética exige el empleo de técnicas moleculares para confirmar genes de resistencia. Esta limitación impide tanto nuestro conocimiento sobre la situación epidemiológica actual como la implementación de estrategias de tratamiento efectivas, adecuadas a los mecanismos de resistencia circulantes.

Abordar la identificación precisa de estos genes es un desafío relevante y crucial para comprender el panorama actual de las β -lactamasas en Cajamarca. Por lo tanto, la tipificación de β -lactamasas en Enterobacterales contribuirá a fortalecer la vigilancia laboratorial y epidemiológica local, facilitando el reporte oportuno de genes de RAM predominantes, como las BLEE, MBL, AmpC y OXA, estas tres últimas aún no estudiadas a profundidad en nuestra región. Con este fin, la investigación se propone realizar una tipificación de β -lactamasas en enterobacterias procedentes del cepario del Laboratorio Regional de Salud Pública de Cajamarca (LRSP) durante el periodo 2023 – 2024.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la Investigación

Jia *et al.* (21) en el 2021, realizaron un estudio en 809 muestras de pacientes adultos con infecciones del tracto urinario (ITU) atendidos en hospitales de China, con el propósito de determinar los niveles de prevalencia de BLEE en *E. coli*. Determinaron que los antibióticos con tasas de susceptibilidad más bajas fueron las cefalosporinas, variando entre el 58.6% y el 74.9%. Los antibióticos con tasas de susceptibilidad más alta, superior al 95%, fueron imipenem, colistina, ertapenem, entre otros. Concluyeron que, las BLEE de *E. coli*, son un problema importante en los pacientes chinos que padecen de ITU, con una prevalencia promedio del 38.0%.

Alemayehu *et al.* (22) en el 2020, realizaron la detección fenotípica de resistencia a carbapenémicos en bacilos gramnegativos a partir de muestras clínicas de orina, sangre, líquido cefalorraquídeo, entre otras, de pacientes atendidos en un hospital de Sidama-Etiopía. Obtuvieron 111 cultivos a partir de 103 pacientes. Del total, diez cultivos fueron productores de carbapenemasas con tasas globales del 9.0% en la técnica de inactivación de carbapenémicos modificados. Las bacterias productoras de carbapenemasas encontradas fueron, *Pseudomonas* spp. (30%), *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Acinetobacter* spp. (20.0%), y *Klebsiella oxytoca* (10%). Los fármacos con elevada tasa de resistencia fueron, ampicilina, cefuroxima, cefotaxima, entre otros. Concluyeron que los bacilos gramnegativos productores de carbapenemasas son del 9.0% en las muestras.

Abbasi *et al.* (17) en el 2020, determinaron la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE causantes de sepsis en pacientes con cáncer de un hospital de Ahvaz-Irán. Recolectaron 1700 hemocultivos de 610 pacientes con cáncer con posible bacteriemia. Utilizaron la prueba combinada disco-difusión de sensibilidad a antibióticos y PCR, 100/610 pacientes presentaron bacteriemia. El 21.0% de cepas fueron enterobacterias, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* sp., *Citrobacter freundii* y *Serratia marcescens*. Estos aislados fueron resistentes a más de tres antibióticos, incluyendo, cefepima, imipenem, meropenem, piperacilina/tazobactam, aztreonam, entre otros. Concluyeron que, de 21 aislados de enterobacterias, 9 eran productoras de BLEE, demostrando el predominio de gramnegativas causantes de bacteriemia en pacientes con cáncer del suroeste de Irán.

Rizi *et al.* (23) en el 2020, realizaron aislamientos clínicos de *E. coli* y *Klebsiella* spp., coproductoras AmpC. Obtuvieron un total de 602 muestras clínicas de tres hospitales de Mashhad-Irán. Sometieron las muestras a pruebas fenotípicas para BLEE. Para determinar la presencia de AmpC, realizaron la prueba de susceptibilidad a la cefoxitina entre los aislados productores de BLEE. De las 336 BLEE positivas, 64.8% (230) de aislamientos mostraron resistencia a la cefoxitina, 30% de estos producían BLEE tipo AmpC, 22% evidenciaron un fenotipo multirresistente. Además, por PCR se demostró que 16.7% (56) de los aislamientos fueron positivos para genes del grupo *ampC* plasmídico. Concluyeron que, la baja inhibición de *E. coli* y *Klebsiella* spp. por cefoxitina, es una alarma importante debido a la presencia de *AmpC* plasmídico.

Yaqoob *et al.* (24) en el 2019, determinaron la frecuencia del gen *bla*_{OXA-48} productor de carbapenemasas en enterobacterias provenientes de pacientes atendidos en un hospital de atención terciaria en Lahore-Pakistán. Aislaron un total de 188 cepas puras de enterobacterias fermentadoras de lactosa de diferentes muestras clínicas. Mediante PCR, encontraron que 60 de las cepas aisladas (31,9%) eran portadoras del gen *bla*_{OXA-48}, donde *Klebsiella* spp., fue la portadora más común del gen en estudio (44%). Afirmaron que, la presencia del gen *bla*_{OXA-48} en las cepas de pacientes pakistaníes es muy alta (31.9%) por lo que sugieren que es necesario dar un seguimiento continuo a estos genes.

García (25) en el 2023, determinó especies de Enterobacterales coproductoras de carbapenemasas tipo KPC, NMD y OXA-48, a partir de muestras biológicas de pacientes de las unidades de medicina, emergencia y cuidados intensivos del hospital Victor Lazarte Echegaray, Trujillo-Perú. Utilizó pruebas automatizadas de AutoScan-4 y pruebas inmunocromatográficas rápidas RESIST-3 OKN K-SeT para determinar los tipos de carbapenemasas. De 134 cultivos, *K. pneumoniae* es la que presentó la mayor resistencia al imipenem y meropenem, evidenciando la presencia de carbapenemasas tipo KPC. Concluyó que, de las bacterias aisladas de las muestras biológicas, ninguna tuvo la capacidad de producir dos o más carbapenemasas.

Cuicapuza (26) en el 2023, realizó la caracterización fenotípica y genotípica de cinco aislamientos clínicos de enterobacterias productoras de carbapenemasas de los establecimientos de salud en Lima-Perú. Los aislamientos se identificaron como *K. pneumoniae*, *Citrobacter portucalensis* y *E. coli*. Todas estas cepas mostraron fenotipos multirresistentes, revelando que la carbapenemasa OXA-181 estuvo

presente en todos los aislamientos. También determinó mecanismos de resistencia asociados a la tetraciclina, aminoglucósidos y trimetoprima. Además, la presencia del gen *qnrS1* downstream de *bla_{OXA-181}*, confirió resistencia a las fluoroquinolonas en todos los aislamientos. Concluyó que la carbapenemasa OXA-181 está adquiriendo gran relevancia, incluso tanto como la carbapenemasa OXA-48.

Angles *et al.* (27) en el 2023, determinaron el panorama de las carbapenemasas en Perú a través de una revisión de literatura del reporte de estas enzimas confirmadas genótipicamente, publicada desde los años 2000 a 2019. Encontraron 14 estudios en los que se realizó la caracterización genotípica de 313 carbapenemasas, 103 de los reportes pertenecieron a estudios en enterobacterias, entre los que destacan *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *E. cloacae*, entre otras. Según la estructura molecular, 64 fueron caracterizadas como MBLs y 39 como serín-β-lactamasas. Concluyeron que, las publicaciones con reportes de carbapenemasas en pacientes peruanos aún es muy escasa, y los reportes genotípicos provienen en su gran mayoría de la capital Lima.

Díaz *et al.* (28) en el 2021, estudiaron la etiología de infecciones y prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas en 201 pacientes con diagnóstico presuntivo de ITU, atendidos en los laboratorios clínicos privados Genmédica y Norlab de Chiclayo-Perú. Encontraron que las especies bacterianas más prevalentes fueron *E. coli* (57.71%), *Klebsiella* sp. (8.46%), *Proteus* sp. (6.97%) y *Enterobacter* sp. (5.47%). Estas cepas mostraron ser resistentes a la ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico y norfloxacino. Determinaron que el 67.2% de cepas de *E. coli* producían BLEE y el otro 31.2% eran productoras de carbapenemasas. *E.*

coli fue la bacteria aislada con mayor frecuencia en las ITU, mostrando una alta prevalencia de BLEE y carbapenemasas, especialmente en mujeres de 39 a 46 años.

Falconí *et al.* (29) en el 2018, determinaron la frecuencia y factores de riesgo para bacteriemias por enterobacterias productoras de BLEE, en pacientes de un hospital público de Lima-Perú. De los 85 casos de bacteriemias ocasionadas por enterobacterias, se encontró que el 50.5% y el 29.4% de infecciones fueron causadas por *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente. El 50.5% de las infecciones halladas fueron por cepas productoras de BLEE. También, determinaron que la mortalidad en la población con infecciones producidas por enterobacterias productoras de BLEE fue 16.2% y la mortalidad causada por bacterias no productoras de BLEE fue del 7.1%. Concluyeron que, la mitad de bacteriemias en pacientes hospitalizados de este estudio fueron productores de BLEE, siendo *E. coli* y *K. pneumoniae* las especies más frecuentes, y además que, de estas, el 40 % son adquiridas en la comunidad.

Rivera *et al.* (30) en el 2015, lograron determinar las BLEE tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella* spp., y *E. coli*, aisladas a partir de superficies de ambientes hospitalarios de Cajamarca. De 125 muestras obtenidas por hisopado de superficies de las distintas áreas del hospital, solo 15 del total de cepas aisladas de enterobacterias mostraron ser resistentes a los β -lactámicos mediante pruebas fenotípicas. Al realizarse la PCR, se encontró que 11 cepas fueron portadoras de los genes *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}* a la vez, y solo tres presentaron el gen *bla_{CTX-M}*. Concluyeron que la detección de estas bacterias con BLEE tipo TEM y CTX-M, deben realizarse tanto a nivel intra y extrahospitalario.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Orden Enterobacterales

2.2.1.1. Taxonomía y características generales

La taxonomía de la familia *Enterobacteriaceae* ha estado sujeta a constantes revisiones y actualizaciones (31). Entre 2016 y 2017, estudios filogenéticos revelaron que algunos de sus miembros tradicionales, como *Morganella*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, entre otros, estaban evolutivamente distantes del núcleo principal de la familia, por lo que se propuso dividir *Enterobacteriaceae* en distintas familias nuevas como *Yersiniaceae*, *Morganellaceae*, *Hafniaceae*, entre otras, reagrupando así a estos géneros tradicionales (31, 32). Sin embargo, debido a su relevancia clínica y para mantener la utilidad práctica en diagnósticos y estudios, se optó por agruparlos bajo el orden Enterobacterales, que conserva una clasificación más amplia e inclusiva.

Así mismo, otra actualización taxonómica relevante concierne a la especie *Enterobacter aerogenes*, que, basándose en estudios filogenéticos y moleculares, ha sido reubicada y ahora se conoce como *Klebsiella aerogenes* (33). Estas modificaciones en la nomenclatura y agrupación de especies, ya han sido oficialmente aceptadas por el LPSN (List of Prokaryotic Names With Standing in Nomenclature) (31); sin embargo, su implementación en la práctica clínica y en los informes de laboratorio aún se están dando de forma gradual.

La siguiente ubicación taxonómica del orden Enterobacterales, sigue vigente actualmente (7,34).

- Dominio: Bacteria
- Reino: Pseudomonadati
- Filo: Pseudomonadota
- Clase: Gammaproteobacteria
- Orden: Enterobacterales

Algunos miembros del orden Enterobacterales forman parte de la microbiota intestinal de muchos seres vivos; sin embargo, así como un grupo es comensal, otro muy pequeño abarca a los géneros más conocidos de patógenos y que más infecciones causan a nivel mundial (7,32). Los Enterobacterales tienen morfología bacilar o cocobacilar, son gramnegativos no formadores de esporas y una gran parte fermenta azúcares, lo que conlleva a la producción de ácido láctico o la formación de otros productos finales; su tamaño es muy variado entre los géneros que lo conforman, yendo de 1 a 5 μm de longitud (7).

En relación a su movilidad, a excepción de *Shigella* spp., *Klebsiella* spp. y especies de *Yersinia* spp., son móviles debido a la presencia de flagelos (35). Otras estructuras y características similares de esta familia, son la presencia de fimbrias que participan en la adhesión bacteriana a las células de su hospedero, actuando como importantes

factores de virulencia (7). El grupo patogénico de los Enterobacterales, se caracteriza por la gran facilidad de desarrollar mecanismos de RAM, tanto estructurales como enzimáticos, por ejemplo, la producción de β -lactamasas y todo su repertorio de variedades enzimáticas (36).

2.2.1.2. Enterobacterales de importancia clínica

A. Morfología y metabolismo

Género *Citrobacter*: Son bacilos con medidas que van hasta los 5 μm de longitud, además, son bacterias móviles debido a la presencia de flagelos peritricos, son catalasa, lactosa, citrato, ureasa y aerógenas positivas incluido para la prueba de Voges Proskauer y fermentación de la glucosa. Oxidasa, lisina descarboxilasa e indol negativos, producen H_2S visible en la prueba Triple Sugar Iron (TSI) y sus colonias se tornan de color rosa en agar MacConkey (7).

Género *Enterobacter*: Presentan un diámetro entre 0.3 y 0.6 μm y de 0.8 a 2 μm de longitud, tienen flagelos peritricos, son catalasa, citrato, aerógenas positivas incluido para la prueba de Voges Proskauer y fermentación de glucosa, lactosa positivas, oxidasa, ureasa e indol negativas, no productoras de H_2S , es positiva generalmente para la prueba de descarboxilación de lisina y sus colonias se tornan de color rojo o rosa brillante, ligeramente mucoides en el agar MacConkey (7).

Género *Escherichia*: Presentan morfología bacilar, miden entre 1 y 2 μm de largo, y hasta 1 μm de diámetro, presentan movilidad debido a la presencia de flagelos peritricos, son lactosa, catalasa e indol positivas, son oxidasa, ureasa y citrato negativas, en agar MacConkey, sus colonias crecen de color rosa o rojizo leve debido a la formación de ácido producto del metabolismo de la lactosa, en agar TSI, son fermentadoras y aerógenas, a partir de glucosa, no producen acetoina, lo que indica que es negativa para la prueba de Voges-Proskauer y en el medio de Lisina Iron Agar (LIA), *E. coli* forma cadaverina a partir de la lisina (7).

Género *Klebsiella*: Tienen un diámetro entre 0.3 a 1.5 μm y un largo de 0.5 a 5 μm , se caracterizan por ser bacterias que presentan cápsula en su estructura y por carecer de flagelos; son citrato, catalasa, aerógenas, ureasa y lactosa positivas, además de producir acetilmetilcarbinol a partir de la glucosa, no producen H_2S , son indol variables y oxidasa negativa. *K. pneumoniae* es positiva para la descarboxilación de la lisina y negativa para la desaminación de lisina, sus colonias son grandes de color rosa en agar MacConkey y se caracterizan por ser mucosas, húmedas y pegajosas debido a la producción de cápsulas de polisacáridos, esto influye en su capacidad de hipervirulencia (7).

Género *Proteus*: Miden entre 1 a 3 μm de largo y de 0.4 a 0.8 μm de ancho, presentan flagelos peritricos; este género es conocido por su

capacidad de enjambre, que les permiten crecer de manera coordinada sobre superficies sólidas, bioquímicamente, *Proteus* spp., son productoras de H_2S , catalasa, citrato, gas, ureasa, descarboxilasa y desaminasa de lisina positivas, no fermentan la lactosa, pero sí la glucosa con formación de gas, además, no producen acetilmetilcarbinol y son indol variables, en agar MacConkey forman colonias pálidas o incoloras, además de crecer en toda la placa realizando swarming y son relacionadas como causantes de ITU principalmente (7).

Género *Salmonella*: Son bacilos que miden de 2 a 5 μm de largo y entre 0.7 a 1.5 μm de diámetro, presentan flagelos peritricos, en su bioquímica muestran ser catalasa positivas y productoras de ácido sulfhídrico, no utilizan el citrato como fuente de carbono, y son negativas para las pruebas de gas, indol, oxidasa, Voges Proskauer y ornitina, presentan lisina desaminasa y lisina descarboxilasa, dependiendo de sus serotipos, son positivas para las pruebas de LIA. *Salmonella* forma colonias incoloras u opacas en el agar *Salmonella-Shigella* y muestran un centro negro por la formación de H_2S , en MacConkey sus colonias crecen incoloras o pálidas debido a la no fermentación de carbohidratos; son causantes de enfermedades diarreicas agudas (EDAs) (7).

Género *Serratia*: Son bacilos que miden entre 0.2 y 2 μm de ancho y un largo de más de 1 μm , además, también presentan flagelos

perítricos, se caracterizan por ser aerógenas, citrato, glucosa, manitol, sorbitol, Voges Proskauer y catalasa positivas, indol, oxidasa y producción de H_2S negativas, positivas además para la descarboxilación de lisina y formación de cadaverina; *S. marcescens* es una fermentadora lenta de lactosa, sus colonias en medios de cultivo suelen tener una coloración rojiza debido a la producción de un pigmento, la prodigiosina, las colonias de *Serratia* sp. en agar MacConkey son rosas pálidas o incoloras, con un tamaño medio (7).

Género *Shigella*: Miden de 1 a 3 μm de largo y entre 0.4 a 0.6 μm de diámetro, bioquímicamente son catalasa, aerógenas positivas y fermentan tanto el manitol como la manosa, citrato, ureasa y lactosa negativos, no descarboxilan la ornitina ni producen H_2S , no son móviles, algunas especies son indol variables, en lo que respecta a la descarboxilación y desaminación de la lisina, son negativas, en agar MacConkey, las colonias son incoloras o pálidas debido a que son bacterias no fermentadoras de lactosa, en agar *Salmonella-Shigella* son suaves, opacas e incoloras; causan EDAs principalmente (7).

B. Epidemiología

Los Enterobacterales son causa de preocupación debido a la amplia distribución de los géneros patogénicos que agrupa esta familia, esto ha permitido la rápida adquisición de nuevos mecanismos enzimáticos de RAM y causar infecciones tanto intra como extrahospitalarias (7). En una revisión de muertes infantiles

asociadas con *K. pneumoniae* en Asia y África, se determinó que, de 2352 fallecidos, esta bacteria estuvo asociada a 597 casos, además, se encontró que *K. pneumoniae* era la principal causante de muertes en niños de 1 a 23 meses con 207 defunciones, causando patologías como sepsis y neumonía, también, se encontró RAM en la mayoría de las cepas aisladas causantes de muerte (37).

S. marcescens es otra especie de preocupación, especialmente por causar bacteriemias y endocarditis (7). En una investigación de 43 casos de endocarditis infecciosa, nueve infecciones se relacionaron a *S. marcescens*, con una tasa global de mortalidad del 30% (38). Otra especie, aunque con una menor incidencia en humanos que *S. marcescens* es *C. freundii*, esta bacteria es un patógeno oportunista, en humanos ocasiona ITU, diarrea, neumonía, y en pocas ocasiones, tanto meningitis como abscesos; por su parte, *Citrobacter septicemia* en algunos casos es causante de encefalitis en ovejas produciendo elevadas tasas de mortalidad (39).

Otra bacteria relevante es *Proteus* sp., cuyas manifestaciones más importantes son como agente etiológico en ITU en mujeres. *Proteus* sp, representa hasta el 2% de casos de todas las infecciones urinarias, mientras que, en infecciones adquiridas en hospitales, la cifra aumenta al 5% (40). Por otro lado, *M. morganii* es causante de infecciones invasivas como sepsis e ITU, y en un gran porcentaje es mortal, *M. morganii* presenta mecanismos enzimáticos de RAM que

le confieren resistencia al ciprofloxacino, nitrofurantoína, trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina, amoxicilina y colistina, agravando aún más la situación (41).

En el 2018, el Instituto Nacional de Salud (INS) confirmó la presencia de bacterias con genes de resistencia *mcr-1* y *OXA-48* en siete regiones del Perú, estos genes confieren gran resistencia a la colistina y a la mayoría de β -lactámicos de amplio espectro; hasta el 2021, la aparición de nuevas enzimas y genes diferentes a *OXA-48* y *mcr-1* ha ido en aumento, encontrándose aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, capaces de ser doble productoras de carbapenemasas (42). Cabe destacar también que el 74.3% de brotes notificados por el INS durante el 2021, ocurrieron en las UCI COVID-19, donde el 61.5% fueron causados por microorganismos multirresistentes (43).

2.2.2. Antibióticos Betalactámicos

Son los fármacos más prescritos a nivel mundial, se caracterizan por poseer un anillo de tres carbonos y un nitrógeno, formando así un anillo β -lactámico muy reactivo (44). Los β -lactámicos actúan interfiriendo la síntesis de la pared celular de las bacterias, acilando la transpeptidasa encargada de la reticulación de péptidos para formar peptidoglucano. Actúan específicamente sobre las proteínas de unión a la penicilina (PBP), interrumpiendo el proceso de transpeptidación terminal, ocasionando lisis bacteriana (45).

Esta clase de antibióticos comprende:

Penicilinas: Se caracterizan por poseer un núcleo de ácido 6-aminopenicilánico (lactámico más tiazolidinediona), son usadas para el tratamiento de infecciones tanto de gramnegativas como grampositivas; este grupo incluye a las penicilinas naturales, aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, entre otros (46).

Cefalosporinas: Presentan un núcleo de ácido 7-aminocefalosporánico más una cadena lateral con anillos de 3,6-Dihydro-2H-1,3-thiazine; conforme aparecen mecanismos nuevos de RAM, estos antibióticos se van actualizando, así tenemos las cefalosporinas de primera, segunda, tercera, cuarta y quinta generación, además de grupos de cefalosporinas específicas antipseudomonales y contra *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (47).

Carbapenémicos: Se compone de un carbapenémico (doble enlace en el C2-C3 y un átomo de azufre) unido a un anillo β -lactámico, el cual le confiere protección y estabilidad frente a un amplio repertorio de β -lactamasas; consideradas como uno de los últimos recursos para tratar infecciones graves; dentro de esta clase tenemos al imipenem/cilastatina, meropenem, doripenem, ertapenem, entre otros (48).

Monobactámicos: Presentan un anillo β -lactámico sin ningún otro componente añadido, es usado en combinación con otros antibióticos para el tratamiento de infecciones causadas por cepas productoras de MBLs, ya que no puede ser hidrolizado por estas enzimas debido a una unión deficiente

entre las MBLs y el monobactámico (49). En este grupo solo encontramos al aztreonam, el cual es eficaz únicamente contra bacterias gramnegativas aerobias como las enterobacterias, sin mostrar efectividad contra grampositivas o bacterias anaerobias (50).

Existen otros compuestos que son usados en conjunto con los β -lactámicos, a estos se los conocen como inhibidores de β -lactamasas, estos fármacos se caracterizan por inactivar las serín- β -lactamasas, que son enzimas que hidrolizan el anillo de los β -lactámicos; en este grupo se incluyen a los inhibidores de β -lactamasas de primera línea como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, y los más actuales como el avibactam y vaborbactam que muestran efectividad contra las carbapenemasas y AmpC, incluidas las de *K. pneumoniae* (51).

El ácido clavulánico tiene una estructura de anillo β -lactámico, pero no tiene actividad antibiótica significativa por sí misma, su función principal es de actuar como un inhibidor suicida irreversible de las β -lactamasas, al ser administrado junto con un antibiótico β -lactámico como la amoxicilina, el clavulanato entra en la bacteria y se dirige al sitio activo de la enzima para inactivarlas permanentemente, incapacitándola para hidrolizar otros antibióticos, como consecuencia, el antibiótico acompañante queda protegido de la degradación, esto permite que el β -lactámico alcance y se una a las Penicillin Binding Proteins (PBP) interfiriendo con la síntesis de la pared celular bacteriana (52).

2.2.3. Mecanismos de RAM

La variedad de géneros patógenos de Enterobacterales, hace que existan distintos patrones y mecanismos enzimáticos de RAM, este repertorio se ve incrementado por la posibilidad de que las bacterias pueden adquirir genes de RAM, tanto entre bacterias de la misma especie y/o diferentes (30). Estos mecanismos pueden originarse por selección artificial, debido al uso desmedido de antibióticos, seleccionándose así solo las bacterias resistentes, o también pueden originarse por selección natural mediante la transferencia horizontal de genes (HGT), donde existe la incorporación de material genético y aumento de la frecuencia de bacterias resistentes (53).

A continuación, se describen algunos mecanismos de RAM conocidos en la actualidad.

A. Alteración del Sitio Diana

Las bacterias gramnegativas pueden desarrollar RAM mediante la modificación de los sitios diana u objetivo, esto permite que los fármacos no se unan a ciertas estructuras bacterianas y, por tanto, no puedan ejercer su efecto, para desarrollar esto, pueden por sí mismas generar mutaciones en genes específicos, produciéndose secuencias de aminoácidos diferentes que reduzcan la unión de los antibióticos; este mecanismo puede otorgar resistencia a quinolonas, macrólidos, tetraciclinas, aminoglucósidos, β -lactámicos (mutación en las PBP) y colistina (54).

B. Relacionado a la Permeabilidad

Se basa en la capacidad bacteriana de disminuir el número de canales proteicos conocidos como porinas, impidiendo el paso de moléculas como los antibióticos, en *K. pneumoniae*, por ejemplo, se da una represión en la expresión de *OmpK35*, confiriendo resistencia a cefalosporinas y carbapenémicos, también, se encuentran mecanismos como las bombas de eflujo, que actúan como sistemas de expulsión activa, eliminando antibióticos del citoplasma al espacio periplásmico; este mecanismo ha sido descrito en *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *K. pneumoniae* principalmente (55).

C. Producción de Enzimas

Es el principal mecanismo de RAM en bacterias. Son procesos enzimáticos que permiten neutralizar la acción de los antibióticos mediante la producción de enzimas. Algunas, pueden romper la estructura química de los antibióticos, como el caso de las β -lactamasas, las que hidrolizan el anillo β -lactámico de los β -lactámicos, otras, pueden modificar la naturaleza química del antibiótico añadiendo grupos funcionales que impiden su unión al objetivo bacteriano (9,56,57). Los Enterobacterales con más reportes de mecanismos enzimáticos son *K. pneumoniae* y *E. coli*, cuyas infecciones por cepas multirresistentes superan el 60% del total de aislamientos en diversas partes del mundo (58)

β -lactamasas

Son un grupo de enzimas codificadas por una gran variedad de genes capaces de romper el anillo β -lactámico, se han descrito más de 200 tipos de β -

lactamasas diferentes tanto en grampositivos como en gramnegativos, estas enzimas son muy específicas, pero un gran número muestra tener un espectro amplio de actividad (30). Son clasificadas según su sitio activo en serín- β -lactamasas (SBLs) y metalo- β -lactamasas (MBLs), o también según su grupo molecular y funcional, esta última, es la clasificación más extensa (Tabla 1) (36).

Las SBLs utilizan un residuo de serina para atacar al anillo β -lactámico del antibiótico, su mecanismo de acción se desarrolla en dos pasos, primero ocurre la acilación, donde un residuo de lisina y otro de glutamato actúan como activadores del residuo de serina, convirtiéndola en un nucleófilo fuerte, la serina activada ataca al carbono del grupo carbonilo del anillo β -lactámico, rompiendo el enlace amida, este proceso forma un intermediario covalente entre la enzima y el antibiótico, conocido como el complejo enzima-acil (59). Segundo, se da la desacilación, donde una molécula de agua entra en el sitio activo de la enzima y es activada por un residuo de lisina, el agua activada ataca el carbono del grupo carbonilo del complejo enzima-acil, rompiendo el enlace que une la enzima con el anillo β -lactámico modificado, esto libera el antibiótico hidrolizado (ya inactivo) y regenera la SBL, permitiendo que la enzima continúe su ciclo catalítico (Figura 1A) (60).

Por otro lado, las MBLs requieren uno o dos iones de zinc en su sitio activo para funcionar, y su mecanismo de inactivación del antibiótico ocurre en un solo paso, las MBLs usan estos iones de zinc para coordinar y activar una molécula de agua, que es la que ataca al anillo β -lactámico del antibiótico, un

ion de zinc activa el agua para que ataque el carbono del grupo carbonilo del anillo β -lactámico, mientras que el otro ion estabiliza la carga negativa que se forma en el átomo de oxígeno de dicho grupo (59). Tras el ataque del agua, el anillo β -lactámico se abre, inactivando el antibiótico que, a diferencia de las SBLs, en las MBLs no se forma un intermediario covalente con la enzima; es decir la enzima y el antibiótico hidrolizado se disocian una vez que se completa la reacción (Figura 1B) (60).

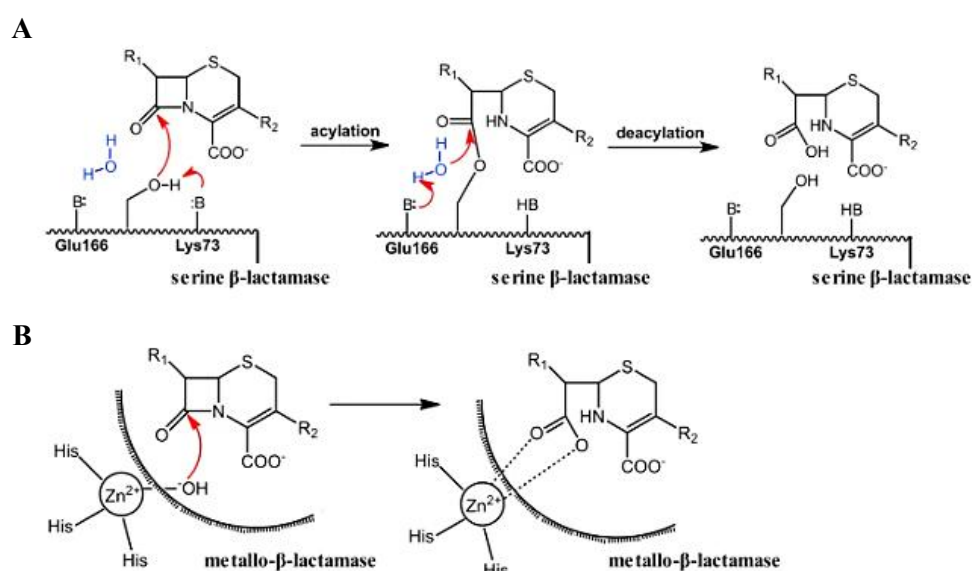


Figura 1. Mecanismos catalíticos de las SBLs (A) y MBLs (B) (59,60)

Según la clasificación estructural o molecular de Ambler, las β -lactamasas se agrupan en 4 clases:

Clase A

Comprende a las BLEE y KPC; aparecieron por el intenso e inadecuado uso de las oximino-cefalosporinas como la ceftazidima y la cefotaxima, estas enzimas son serín- β -lactamasas (SBLs), actúan hidrolizando los anillos β -lactámicos, específicamente los de espectro extendido (cefalosporinas y

penicilinas), son inhibidas por inhibidores de BLEE como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (61,62). Los tipos principales de BLEE de clase A son TEM, SHV y CTX-M, además, también se incluye la carbapenemasa tipo KPC, todos los genes que codifican estas enzimas tienen un origen cromosómico y diseminación plasmídica principalmente (9).

Se han descrito en la mayoría de Enterobacterales asociadas tanto a infecciones hospitalarias como adquiridas en la comunidad (61). Las enzimas tipo TEM derivan de mutaciones puntuales en el gen que codifica la TEM-1 o 2 (*bla_{TEM-1}*), e hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido, algunas variantes TEM como las resistentes a inhibidores tipo TEM (IRT), han desarrollado resistencia a los inhibidores de β -lactamasas (36). Fueron las primeras BLEE en ser identificadas y están distribuidas ampliamente, sin embargo, son superadas actualmente por las enzimas CTX-M (56).

La Cefotaximase-Munich (CTX-M) producida por el gen *bla_{CTX-M}*, se caracteriza por su gran afinidad a la cefotaxima y ceftriaxona, y es la BLEE más abundante a nivel mundial, la mayoría de *E. coli* aisladas de ambientes hospitalarios presentan esta enzima y algunas de sus otras variantes (63). Por otro lado, el gen *bla_{SHV}* originalmente encontradas en el cromosoma de *K. pneumoniae*, son variantes mutantes que han permitido la RAM frente a penicilinas, aztreonam y cefalosporinas de tercera generación, estos genes han sido reportados acompañados con otros genes de su misma clase o de otra, dentro de una misma bacteria (64).

Por último, las carbapenemasas tipo KPC, hidrolizan el anillo β -lactámico de carbapenémicos y otros β -lactámicos, son serín-carbapenemasas identificadas por primera vez en *K. pneumoniae* en 1996 (Estados Unidos) y hoy en día, es una de las mayores amenazas en la RAM (1,65). El éxito de la propagación de esta enzima a nivel mundial se debe principalmente al transposón Tn4401 y a una secuencia multilocus (MLST o ST) ST258 y sus variantes, solo en Israel y Estados Unidos, el ST258 es responsable de más del 77% y 90% de todas las infecciones de *K. pneumoniae* productora de KPC respectivamente (66).

El gen *bla_{KPC}* que codifica esta enzima, se encuentra localizado en plásmidos, lo que también facilita su diseminación en varios grupos bacterianos; sin embargo, la fuente original de este gen aún sigue siendo desconocida (67). Se sospecha que su adquisición fue a partir de un cromosoma ancestral de un microorganismo ambiental, las infecciones por Enterobacterales productores de KPC, son extremadamente difíciles de tratar debido a las limitaciones farmacológicas, en su mayoría requieren la combinación de antibióticos de último recurso (65).

Clase B:

A diferencia de la clase A, C y D que utilizan la serina en su sitio activo, las β -lactamasas de clase B usan el zinc como cofactor en su sitio activo para hidrolizar el anillo β -lactámico, por esto, son denominadas metalo- β -lactamasas (MBLs) (68). Se cree que su origen se dio en bacterias ambientales no relacionadas con infecciones intrahospitalarias, y su diseminación se da

principalmente a través de elementos genéticos móviles, esta clase brinda resistencia a los mismos antibióticos que la clase A, excepto al aztreonam; las bacterias que han desarrollado la producción de MBLs, son resistentes a todos los inhibidores de BLEE, penicilinas, carbapenémicos y cefalosporinas de todas las generaciones (69).

Las enzimas más importantes son las IMP y VIM, distribuidas a nivel mundial en *P. aeruginosa*, Enterobacterales y *Acinetobacter baumannii* (70). Las enzimas NDM son también muy preocupantes y de reciente aparición, estas enzimas se asocian con la resistencia extrema a los antibióticos, dejando muy pocas opciones terapéuticas (71). El aztreonam es una de las escasas opciones de tratamiento, ya que su estructura de ácido sulfónico en el átomo de nitrógeno del anillo β -lactámico, interfiere con la capacidad de las MBLs para hidrolizarlo (72).

Clase C:

Llamadas también AmpC β -lactamasas, están de manera natural en un gran número de Enterobacterales y bacilos gramnegativos no fermentadores como *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, se cree que se originaron de genes cromosómicos de *M. morganii* y *Aeromonas* sp. (2). Las bacterias productoras de AmpC muestran ser resistentes a la inhibición por tazobactam, ácido clavulánico y sulbactam/tazobactam (73). Las AmpC pueden ser cromosómicas, como el caso de *Enterobacter* sp., *C. freundii*, *S. marcescens*, *M. morganii*, *Providencia* spp., *P. aeruginosa*, entre otras; o plasmídicas, presentes en *E. coli*, *Salmonella* sp. y *K. pneumoniae* (74).

Las AmpC plasmídicas están asociadas a transposones ubicados en plásmidos del tipo conjugativos, estos se originan en las AmpC cromosómicas propias de enterobacterias (75). Las AmpC cromosómicas, pueden ser inducibles y constitutivas, las inducibles producen enzimas a bajos niveles naturalmente, pero pueden aumentar su síntesis en presencia de β -lactámicos que actúan como inductores (2). Las constitutivas o no inducibles, presentan una expresión reducida que no afecta a la eficacia de los β -lactámicos; sin embargo, si estas enzimas están hiperproducidas, suelen ser resistentes a todos los β -lactámicos excepto a cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos (76).

Clase D

Las β -lactamasas de clase D hidrolizadoras de carbapenémicos, también conocidas como OXA, son enzimas de más de 500 tipos que pertenecen a la clase D de Ambler (77). Tienen la capacidad de inactivar un gran número de β -lactámicos incluyendo carbapenémicos, mediante la ruptura del anillo β -lactámico realizado por un residuo de serina en el sitio activo de la enzima (78). Se ha reportado que algunas OXA tienen la capacidad de desplazarse por la membrana externa de las enterobacterias, lo que les permite resistir a los antibióticos incluso cuando estos están presentes en el exterior de las bacterias (77).

En el caso de *E. coli* y *K. pneumoniae*, se ha detectado la presencia de variantes OXA como las OXA-48, se cree que *bla*_{OXA-48} se originó en el cromosoma de bacterias precursoras de *Shewanella oneidensis*, hoy en día,

han sido reportadas principalmente en *E. coli*, *P. mirabilis*, *A. baumannii* y *K. pneumoniae*, hidrolizando cefalosporinas y carbapenémicos (77). Esta enzima tiene una actividad eficiente contra las penicilinas, pero una actividad más lenta contra los carbapenémicos (4). Es importante señalar que el ertapenem es el carbapenémico más afectado debido a su estructura molecular y su conformación espacial, lo que lo hace ideal para usarse en pruebas de screening de *bla_{OXA-48}* (77).

Tabla 1. Relación y clasificación molecular y funcional entre β -lactamasas

β-lactamasas				
Sitio Activo	Serine		Metallo (Zn)	
Clasificación molecular	A	C	D	B
Clasificación funcional	2	1	2d	3
	Penicilinasas	Ampicilinasas	Oxacilinasas	MBLs
Substratos	XSp-ceph	XSp-ceph	Carb	Carb, Xsp-ceph

Clasificación molecular o clasificación según Ambler, clasificación funcional o clasificación según Bush-Jacoby-Medeiros. **MBLs:** metalo- β -lactamasas. **XSp-ceph:** cefalosporinas de espectro ampliado; **Carb:** carbapenémicos.

2.2.4. Identificación de mecanismos de RAM

2.2.4.1. Fenotípico

La detección fenotípica de las BLEE se basa en la capacidad para hidrolizar los antibióticos β -lactámicos, las pruebas más utilizadas para su detección son el método de Jarlier, el disco difusión y el CHROM-agar (79). El método de Jarlier permite detectar BLEE a través de la sinergia de cefalosporinas y un inhibidor de β -lactamasas, es muy sensible y específico para las enzimas de la clase A (8). Por otro lado, el disco difusión permite determinar la

sensibilidad o resistencia a un grupo de antibióticos, y da indicios para realizar técnicas más específicas (5). Se considera bacteria productora de BLEE, cuando existe resistencia a los antibióticos β -lactámicos y esta resistencia puede ser inhibida por inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico u otro inhibidor (8).

Por otro lado, las pruebas rápidas para la detección de carbapenemasas, son realizadas por procedimientos bioquímicos colorimétricos, por ejemplo, las pruebas de Blue-Carba y Carba NP, estos son métodos rápidos (menor a 2 horas) y eficaces para la detección de estas enzimas (80,81). La prueba del Blue-Carba se basa en la detección *in vitro* de la hidrólisis del imipenem, produciendo acidez y siendo detectada por el azul de bromotimol, es utilizada en la evaluación de la presencia de carbapenemasas en gramnegativas, utilizando de manera directa (sin lisis) las colonias de los cultivos bacterianos no selectivos (82). El INS utiliza el Blue-Carba para la detección de carbapenemasas en Enterobacterales, debido a reportes que demuestran su 100% de sensibilidad y más de 90% de especificidad (81).

Para el caso de la detección fenotípica de enzimas AmpC, se puede utilizar cefoxitina/cloxacilina, la prueba se basa en el efecto inhibidor de la cloxacilina sobre la producción de AmpC, una diferencia ≥ 4 mm en los puntos de inhibición de los discos cefoxitina-cloxacilina y cefoxitina es un indicador de que la

enterobacteria en estudio es una productora de AmpC (83). La cefoxitina por sí sola puede ser utilizada en el screening para la detección de AmpC, estas enzimas tienen una alta afinidad y eficiencia para hidrolizar cefamicinas, cefoxitina al ser una cefamicina, puede ser hidrolizada o no, dependiendo si la bacteria tiene o no AmpC (84).

Por otro lado, la detección de OXA-48 por métodos fenotípicos aún no está establecida en el CLSI, debido a la complejidad y multitud de patrones que implica la hidrólisis de β -lactámicos; sin embargo, con los reportes de EUCAST e INS en el Perú, se puede establecer y conocer ciertos comportamientos de estas enzimas, por ejemplo, se ha reportado la gran capacidad de hidrólisis del ETP, por lo que determinar la sensibilidad o resistencia de este carbapenémico, puede ayudarnos a realizar un screening para estas enzimas (80). También se observa gran resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, además, en un fenotipo de OXA-48 no se observa sinergia entre el EDTA y ácido fenilborónico con carbapenémicos, así mismo, la ceftazidima/tazobactam generalmente resulta ser sensible (82,85).

2.2.4.2. Genotípico

Comprende al conjunto de pruebas moleculares confirmatorias para la detección de genes y mecanismos de resistencia, la técnica molecular “gold standard” es la Reacción en Cadena de la

Polimerasa (PCR) (61). Para realizarla, primero se seleccionan los genes que se deseen detectar, dependiendo de las pruebas fenotípicas realizadas, es necesario adquirir juegos de primers tanto forward como reverse, los cuales se unirán específicamente a la secuencia de interés a amplificar, posteriormente, las secuencias amplificadas mediante PCR son sometidos a una electroforesis, donde se evaluará si los genes amplificados corresponden a los marcadores de peso molecular de los genes en estudio (86).

La efectividad de una PCR depende de diferentes factores, por ejemplo, la calidad del ADN extraído de las muestras, el ADN debe ser íntegro y libre de nucleasas, se estima una relación A260/A280 óptima entre 1.8 y 2.0. Un valor inferior a 1.8 indica posible contaminación por fenoles y proteínas; un valor superior a 2.0, podría indicar contaminación por ARN (61). Por otro lado, las condiciones de la PCR son muy importantes, esto incluye una proporción adecuada de cada reactivo a utilizar; las temperaturas y números de ciclos dependerán en gran medida de la Taq polimerasa y el Kit que la contiene (86).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1. Nivel de Investigación

Descriptivo, ya que el objetivo del estudio fue la tipificación de las betalactamasas presentes en las muestras bacterianas con las que se trabajó.

3.2. Tipo y Diseño de Investigación

Tipo básico con diseño no experimental, ya que no hay manipulación ni alteración de la variable. Observacional-transversal, ya que se observaron las características de RAM en las muestras recolectadas durante el periodo 2023 y 2024.

3.3. Material Biológico

158 muestras de Enterobacterales provenientes del cepario de bacteriología del Laboratorio Regional de Salud Pública de Cajamarca (LRSP), de abril del 2023 a junio del 2024.

Marco Muestral

Todos las muestras registradas, identificadas y viables como Enterobacterales en el cepario de bacteriología del LRSP de Cajamarca, de abril del 2023 a junio del 2024.

Unidad de Análisis

Cada muestra registrada, identificada y viable del orden Enterobacterales en el cepario de bacteriología del LRSP de Cajamarca, de abril del 2023 a junio del 2024.

3.4. Diseño Metodológico

La primera fase del proyecto implicó la reactivación de las muestras de Enterobacterales, la evaluación de la pureza de los cultivos, la realización de pruebas bioquímicas para la identificación de cada aislamiento, y finalmente, la ejecución de pruebas fenotípicas para la evaluación de producción de enzimas de RAM. Esta fase se llevó a cabo en el LRSP de Cajamarca, específicamente en el Laboratorio de Bacteriología. La segunda fase del proyecto, consistió en la evaluación molecular de los genes responsables de la producción de β -lactamasas en los Enterobacterales estudiados, y se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca.

3.4.1. Reactivación e identificación microbiológica de Enterobacterales

Se verificó la viabilidad de cada muestra bacteriológica, para esto, a cada vial con Enterobacterales conservados en agar base sangre, se le adicionó 0.5 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion), luego, se incubó de 18 a 24 horas a 37°C. Posteriormente, de cada vial se tomó una asada y se procedió a realizar una siembra por estría en cuatro cuadrantes en agar MacConkey (apéndice 1A), las placas se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C (5).

Evaluación de la Pureza de los Aislamientos

De las colonias aisladas previamente, se tomó una asada y se realizó una suspensión con agua destilada estéril sobre un portaobjeto. Los extendidos se secaron a temperatura ambiente y se aplicaron los colorantes del set de Gram (anexo 1). Posteriormente, se observó a inmersión en microscopio óptico (apéndice 1B) (5).

Confirmación por pruebas bioquímicas

Luego de la verificación de pureza de las colonias seleccionadas usando la tinción Gram, se sembró en diferentes medios de cultivo para evaluar sus propiedades metabólicas (apéndice 1C). Estos medios y las características metabólicas de algunas especies bacterianas, son descritas en la Tabla 2. Cada especie bacteriana fue conservada usando la técnica de subcultivos, para ello se usaron viales con agar base sangre, conservándose a 4°C. Todas las pruebas anteriores fueron registradas en una ficha de recolección de datos (apéndice 2).

Tabla 2. Perfil bioquímico en Enterobacterales (7)

Especie	PERFILES BIOQUÍMICOS								
	TSI			LIA	SIM		Cit.	Ox.	Cat.
	Gas	H ₂ S	Ferm.		Indol	Mov.			
<i>C. freundii</i>	+	+	A/A	K/A	-	+	+	-	+
<i>E. coli</i>	+	-	A/A	K/K	+	+	-	-	+
<i>E. coli inactiva</i>	-	-	A/A	K/K	+	-	-	-	+
<i>E. cloacae</i>	+	-	A/A	K/A	-	+	+	-	+
<i>E. hormaechei</i>	+	-	A/A	K/A	-	+	+	-	+
<i>K. aerogenes</i>	+	-	A/A	K/K	-	+	+	-	+
<i>K. pneumoniae</i>	+	-	A/A	K/K	-	-	+	-	+
<i>K. oxytoca</i>	+	-	A/A	K/K	+	-	+	-	+
<i>M. morganii</i>	+	±	K/A	K/A	+	+	-	-	+
<i>P. mirabilis</i>	+	+	A/A	R/A	-	+	+	-	+
<i>P. alcalifacens</i>	+	-	K/A	R/A	+	+	+	-	+
<i>S. marcescens</i>	+	-	K/A	K/K	-	+	+	-	+
<i>S. flexneri</i>	-	-	K/A	K/A	±	-	-	-	+
<i>S. sonnei</i>	-	-	K/A	K/A	-	-	-	-	+
<i>S. enterica</i>	+	+	K/A	K/K	-	+	+	-	+

TSI: Triple Sugar Iron, **H₂S:** sulfuro de hidrógeno, **Ferm.:** Fermentación, **LIA:** Lisina Iron Agar, **SIM:** Sulfuro Indol Movilidad, **Mov.:** Movilidad, **Cit.:** Citrato, **Ox.:** Oxidasa, **Cat.:** Catalasa, **K:** Alcalino, **A:** Ácido, **R:** Superficie roja, **-:** Negativo, **+:** Positivo, **±:** Variable

3.4.2. Pruebas fenotípicas para la detección de β -lactamasas

Para determinar los perfiles de RAM, se realizó un enriquecimiento con 0.5 mL de BHI de cada bacteria y se incubó de 18 a 24 horas a 37°C. A continuación, se prepararon placas de Petri con agar Mueller Hinton, rotulados con el código del aislamiento a evaluar. Se tomaron tubos de solución salina estéril (0.85%) para realizar una dilución del aislamiento hasta alcanzar una turbidez de 0.5 en la escala McFarland (87). Con un hisopo estéril, se tomó una alícuota de la dilución. De manera uniforme, se realizó la siembra por agotamiento en Mueller Hinton. Realizada la siembra, se dejó reposar durante 10 minutos (88). La disposición de los discos de antibióticos se realizó según el mecanismo de resistencia a identificar descritos a continuación.

Detección fenotípica de BLEE

Para la detección de BLEE se utilizó el método de Jarlier. Se colocaron cuatro discos: ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO), aztreonam (ATM) y cefotaxima (CTX) alrededor de un inhibidor de β -lactamasas que en este caso fue la amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), manteniendo una distancia promedio de 2 mm entre ellos (8). Las placas se incubaron a 37°C de 18 a 24 horas. Posteriormente se midieron los diámetros de los halos de inhibición para compararlos con la normativa del CLSI. La presencia de BLEE se confirmó al observar la sinergia entre los discos circundantes con la AMC, la sensibilidad al disco de AMC y la presencia de zonas fantasmas (también denominadas cola de pez u ojo de cerradura) entre los halos (8,81). Los discos de antibióticos utilizados se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Puntos de corte establecidos por el CLSI 2025 en prueba de disco difusión (89)

Grupo	Antibiótico	Conc.	Categoría		
			R	I	S
Inhibidor de β-lactamasas	Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC)	10 μ g	≤ 13	14 – 17	≥ 18
Cefalosporinas	Ceftazidima (CAZ)	30 μ g	≤ 19	20 – 22	≥ 23
	Ceftriaxona (CRO)	30 μ g	≤ 19	20 – 22	≥ 23
	Cefotaxima (CTX)	30 μ g	≤ 22	23 – 25	≥ 26
	Cefoxitina (FOX)	30 μ g	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Monobactámico	Aztreonam (ATM)	30 μ g	≤ 17	18 – 20	≥ 21
Carbapenémico	Ertapenem (ETP)	10 μ g	≤ 18	19 – 21	≥ 22
	Imipenem (IPM)	10 μ g	≤ 19	20 – 22	≥ 23

Conc.: Concentración del antimicrobiano por disco, **R:** Resistente, **I:** Intermedio, **R:** Resistente, $\geq$: Diámetro de halo de inhibición mayor o igual, $\leq$: Diámetro de halo de inhibición menor o igual

Detección fenotípica de carbapenemasas por el test de Blue-Carba

La preparación de la solución A y B del Blue-Carba se describe en el anexo 2. En dos viales se añadió 100 μ L de la solución B, uno para el control positivo y otro para el negativo. Por cada muestra evaluada se utilizó un vial con 100 μ L de la solución B. Utilizando un asa de siembra descartable de 1 μ L, se tomó una colonia de *E. coli* (ATCC 25922) para el control negativo. Como control positivo, se tomó una colonia de *K. pneumoniae* (ATCC BAA-1705), la mezcla se homogenizó en un vórtex. (80–82). Para evaluar las especies bacterianas del estudio, se realizó el mismo procedimiento de la evaluación de los controles. Luego, se incubaron en una estufa a 37°C durante dos horas. Cada 15 minutos, se homogeneizó cada vial en un vórtex. La lectura de las reacciones se realizó cada 15 minutos (81,85). Finalmente, se interpretaron los resultados fenotípicos finales según la Tabla 4.

Tabla 4. Interpretación de resultados en el test de Blue-Carba luego de la incubación de dos horas que requiere la prueba (80).

Control negativo	Control positivo	Muestra	Resultado
Azul 	Amarillo/verde amarillento/ámbar 	Amarillo/verde amarillento/ámbar 	Positivo
Azul 	Amarillo/verde amarillento/ámbar 	Azul 	Negativo
Color distinto al azul 	(-)	(-)	Inválido

(-): no evaluado debido a la invalidez de la prueba

Detección fenotípica de AmpC

Se realizó un screening de las muestras bacterianas para evaluar su resistencia al disco de cefoxitina (FOX). Se utilizó la técnica de disco difusión con FOX (30 µg), cada disco fue dispuesto en el centro de una placa con agar Mueller Hinton, previamente inoculada con la especie bacteriana a evaluar (Figura 5C). Las placas se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C. Posteriormente, se realizó la medición de los halos de inhibición por cada especie bacteriana evaluada, se consideraron bacterias productoras de AmpC aquellas que formaron halos con diámetros ≤ 18 mm (Tabla 3) (83).

Detección fenotípica de oxacilinasas

Se realizó un screening de las muestras bacterianas para evaluar su resistencia al disco de ertapenem (ETP). Se utilizó la técnica de disco difusión con ETP

(10 µg), cada disco fue dispuesto en el centro de una placa con agar Mueller Hinton, previamente inoculada con la especie bacteriana a evaluar (Figura 5D). Las placas se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C. Posteriormente, se realizó la medición de los halos de inhibición por cada especie bacteriana evaluada, se consideraron bacterias productoras de OXA-48 aquellas que formaron halos con diámetros ≤ 19 mm (Tabla 3) (89,90).

Todas las pruebas fenotípicas fueron registradas en una ficha de recolección de datos (apéndice 3). Las especies bacterianas positivas para al menos una de las pruebas fenotípicas de detección de β -lactamasas, se sometieron a pruebas moleculares según el mecanismo enzimático que se observó. Para la prueba molecular de detección de genes de las 4 clases de β -lactamasas según la clasificación de Ambler, se necesitó la extracción de ADN bacteriano.

3.4.3. Extracción de ADN por shock térmico

Se suspendieron de 3 a 5 colonias bacterianas de un cultivo de 18 horas en 200 µL de agua grado molecular. La disolución se sometió a ebullición en un termobloque durante 20 minutos. Posteriormente, esta muestra se colocó rápidamente en congelación a -20 °C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugó la mezcla a 8,500 rpm durante 3 minutos, y se transfirió 100 µL del sobrenadante a un microtubo nuevo (11). Finalmente, se evaluó la concentración y calidad de ADN utilizando un NanodropTM Lite Thermo Scientific. Analizados estos parámetros, se conservaron las muestras de ADN a -20 °C hasta su uso.

3.4.4. Detección molecular de genes de RAM

A partir del ADN extraído de cada aislamiento, se utilizaron las muestras como plantillas para su amplificación por PCR utilizando primers específicos para cada gen evaluado (Tabla 5), estos primers fueron adquiridos de Macrogen, Korea. La estandarización para cada gen a amplificar por PCR se realizó siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante del Kit DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) de ThermoScientific y de las características de cada primers adquirido, como la temperatura de annealing y de melting. Dichas temperaturas fueron también evaluadas en la Tm Calculator de Thermo Fisher Scientific.

Tabla 5. Primers utilizados para la amplificación de los genes de β -lactamasas por PCR convencional

Clase molecular	Genes	Amplicón (pb)	Secuencia de primers (5' – 3')
A	<i>bla_{CTX-M}</i>	585	F: CGA TGT GCA GTA CCA GTA A R: TTA GTG ACC AGA ATC AGC GG
	<i>bla_{KPC}</i>	916	F: AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG R: AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA
	<i>bla_{SHV}</i>	865	F: ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG R: GTT AGC GTT GCC AGT GCT CG
	<i>bla_{TEM}</i>	1080	F: ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA R: GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC
B	<i>bla_{IMP}</i>	232	F: GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C R: GGT TTA AYA AAA CAA CCA CC
	<i>bla_{VIM}</i>	390	F: GAT GGT GTT TGG TCG CAT A R: CGA ATG CGC AGC ACC AG
C	<i>bla_{DHA}</i>	405	F: AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T R: CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC
	<i>bla_{FOX}</i>	190	F: AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G R: CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG
D	<i>bla_{OXA-48}</i>	438	F: GCG TGG TTA AGG ATG AAC AC R: CAT CAA GTT CAA CCC AAC CG

* **pb:** Pares de bases; **F:** primer forward; **R:** primer reverse

Luego de la estandarización, se estableció que las proporciones de cada componente para una reacción en la Master Mix, fue de: 5.55 μL de agua ultrapura, 6.25 μL del Kit DreamTaq Green PCR Master Mix, 0.25 μL de los primers Forward y Reverse y 0.7 μL del templado de ADN bacteriano, para un total de 13 μL del volumen final de reacción. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador S1000TM BioRad, utilizando las condiciones de los protocolos establecidos para cada gen (anexo 3).

3.4.5. Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon geles de agarosa a una concentración del 1%. En un matraz de vidrio se midieron 40 mL de Buffer TBE 0.5X, posteriormente se agregó 0.4 g de agarosa y se hirvió hasta disolverla por completo. Cuando esta mezcla estuvo a 50°C aproximadamente, se agregó 0.4 μL (1%) de SYBR Safe (InvitrogenTM) para poder visualizar las bandas del producto de PCR. La mezcla se colocó en un molde de electroforesis, delimitando 20 pocillos con un par de peines colocados sobre el molde, luego, se esperó que solidifique (91).

Solidificada la mezcla, se colocó el molde junto con el ahora gel, en una cubeta electroforética, se retiraron los peines del gel con mucho cuidado y se agregó Buffer TBE 0.5X en la cubeta hasta cubrir completamente todo el gel. En el primer carril de cada sección del gel (superior e inferior), se agregó 5 μL del marcador de peso molecular (ADN Ladder 1000 pb, Life Technologies – InvitrogenTM), luego se colocó 5 μL de cada uno de los productos de PCR en el carril correspondiente del gel. Se conectó la fuente de energía de

electroforesis (PowerEase® 90W Power Supply) y se corrió a 100 voltios durante 30 minutos. Finalmente se utilizó un transiluminador de luz UV (Cleaver Scientific) para observar y fotodocumentar las bandas presentes (91).

3.4.6. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

La información recolectada mediante las fichas de recolección de datos fue ingresada en una base de datos del programa Excel 2021, al finalizar las pruebas de laboratorio se analizaron todos los datos empleando el software SPSS versión 26. La información descriptiva fue presentada en tablas y figuras. La asociación entre los grupos formados (especie bacteriana, diagnóstico, sexo, establecimiento de salud, genes, RAM) fue establecida mediante la prueba de Chi cuadrado (significancia estadística: $p \leq 0.05$). Se consideró un nivel de confianza del 95% y error de $\pm 5\%$. También se utilizó la prueba de V de Cramer (C), siempre y cuando el p valor fuese significativo, esto se utilizó para ver el grado de asociación entre las variables analizadas ($C = 0.0 - 0.1$: no hay asociación; $C = 0.1 - 0.3$: baja asociación; $C = 0.3 - 0.5$: asociación moderada; $C = 0.5 - 1.0$: alto grado de asociación).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Origen e identificación de las muestras bacterianas

Se analizaron 158 bacterias pertenecientes al orden Enterobacterales provenientes de distintos establecimientos de Salud; según su procedencia fueron 55 (34.8%) del Hospital de Apoyo de Cajabamba, 44 (27.8%) del Centro de Salud Baños del Inca, 23 (14.6%) del Hospital de Apoyo de Celendín, 17 (10.8%) del Hospital Regional Docente de Cajamarca, y otros establecimientos contribuyeron con 19 (12.1%) aislamientos. Las especies de Enterobacterales identificadas fueron: 111 aislamientos (70.3%) de *E. coli*, 19 aislamientos (12.0%) de *K. pneumoniae*, seis aislamientos (3.8%) de *Enterobacter* sp., mientras que *Shigella* sp. y *Citrobacter freundii* sumaron cuatro aislamientos cada uno (5.0 %). Las especies menos frecuentes evaluadas se observan en la Figura 2.

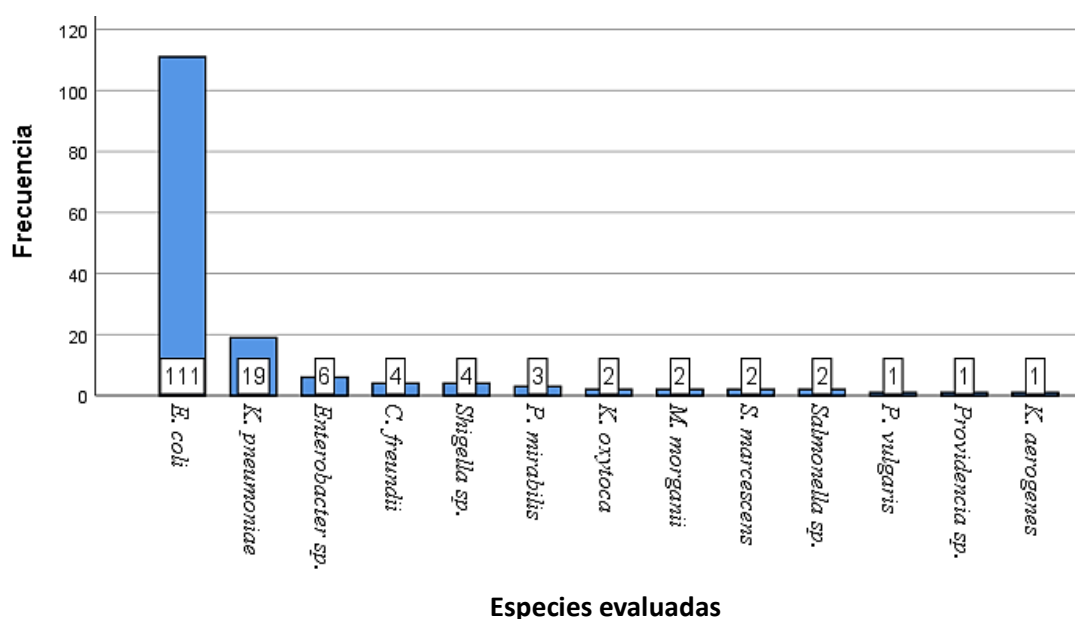


Figura 2. Distribución de frecuencias de bacterias del orden Enterobacterales evaluadas en este estudio

En cuanto a las infecciones implicadas por las especies en estudio, se encontró que 130 (82.3%) estuvieron implicadas en ITU, nueve (5.7%) fueron responsables de neumonía, ocho (5.0%) de enfermedades diarreicas agudas (EDA), cuatro (2.5%) de sepsis y siete (4.5%) fueron causantes de otras infecciones como vaginitis, apendicitis, insuficiencia renal e infección respiratoria aguda. Por otro lado, la edad media de los pacientes de quienes se obtuvieron los aislados fue de 43 años. La distribución por grupos etarios fue: 49 (31.0%) adultos mayores, 44 (27.8%) adultos, 17 (10.8%) jóvenes, 15 (9.5%) lactantes, 14 (8.9%) adolescentes y 6 (3.8%) de niños. Finalmente, la mayoría de los aislamientos (121, 76.6%) provinieron de pacientes mujeres, y 31 (19.6%) de pacientes varones.

4.1.2. Susceptibilidad antimicrobiana

En lo que respecta a la respuesta de las 158 especies bacterianas frente a los antimicrobianos, se observó que 100 (63.3%) presentaron resistencia al menos a un antimicrobiano. Las 58 (36.7%) especies restantes mostraron sensibilidad o sensibilidad intermedia a todos los antimicrobianos. Solo la cefotaxima tuvo una frecuencia más alta de resistencia que de sensibilidad (46.2% y 45.6% respectivamente). Otras frecuencias elevadas de RAM fueron 67 aislamientos (42.4%) a la ceftriaxona y 49 (31.0%) al aztreonam; así mismo, 16 (10.1%) mostraron ser resistentes a los carbapenémicos. Los antimicrobianos con frecuencias más altas de sensibilidad fueron el ertapenem (90.5%), imipenem (89.9%), cefoxitina (82.3%) y amoxicilina/clavulanato (64.6%). Frecuencias de RAM inferiores a 49, así como las frecuencias de sensibilidad son detalladas en la Tabla 6 y Figura 3.

Tabla 6. Susceptibilidad antimicrobiana de bacterias del orden Enterobacterales evaluada con el método de disco difusión

Grupo	Antimicrobiano	Categorías Interpretativas		
		Resistente	Intermedio	Sensible
		n (%)	n (%)	n (%)
Cefalosporinas	Ceftriaxona	67 (42.4)	10 (6.3)	81 (51.3)
	Ceftazidima	31 (19.6)	34 (21.5)	93 (58.9)
	Cefoxitina	25 (15.8)	3 (1.9)	130 (82.3)
	Cefotaxima	73 (46.2)	13 (8.2)	72 (45.6)
Inhibidor de β-lactamasas	Amoxicilina + ácido clavulánico	35 (22.2)	21 (13.3)	102 (64.5)
Monobactámico	Aztreonam	49 (31.0)	23 (14.6)	86 (54.4)
Carbapenémicos	Imipenem	16 (10.1)	0 (0.0)	142 (89.9)
	Ertapenem	13 (8.2)	2 (1.3)	143 (90.5)

Puntos de corte basados en el CLSI M100TM "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 35th Edition"; **n**: recuentos de aislamientos. **%**: porcentaje de los recuentos para cada categoría. **CRO, CAZ, CTX y AMC** (evaluación de sinergia), usadas en el método de Jarlier. **ATM, FOX, IMP y ETP** usadas en disco difusión.

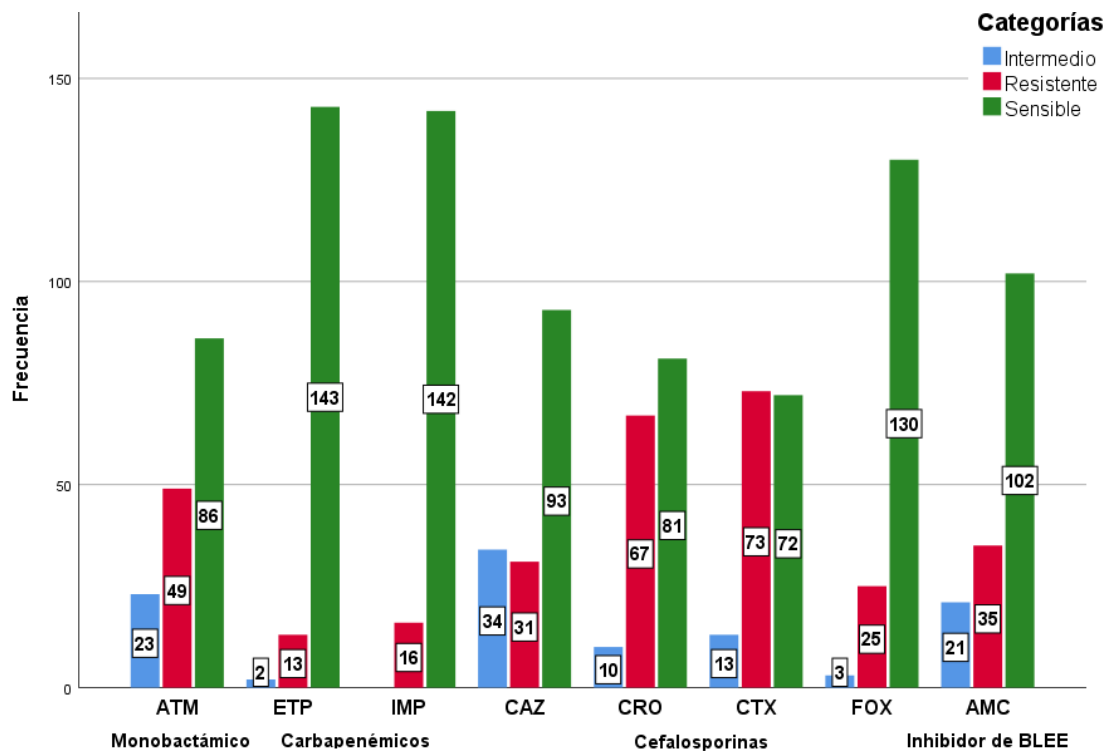


Figura 3. Distribución de frecuencias de las bacterias del orden Enterobacterales según su respuesta a los antimicrobianos

4.1.3. Perfil de RAM de las especies bacterianas encontradas

Se identificaron 30 perfiles de resistencia diferentes. De estos, los más frecuentes fueron el PR16 (resistencia múltiple a CRO-ATM-CTX) en 18 (11.4%) aislamientos, seguido del PR23 en 13 (8.2%) aislamientos, el PR9 en 10 (6.3%) aislamientos y el PR30 (resistencia a todos los antimicrobianos) en ocho aislamientos (5.1%). De las especies que resistieron a todos los antimicrobianos, 6 fueron *K. pneumoniae* y 2 *E. coli*. Los perfiles de resistencia con menor frecuencia pueden observarse en la Tabla 7.

Tabla 7. Frecuencia de perfiles de RAM en las bacterias del orden Enterobacterales

Cód.	Perfil de Resistencia	n	%	Cód.	Perfil de RAM	n	%
PR1	CRO	3	1.9	PR16	CRO-ATM-CTX	18	11.4
PR2	CAZ	1	0.6	PR17	CRO-CAZ-CTX	1	0.6
PR3	CTX	8	5.1	PR18	CAZ-CTX-AMC	1	0.6
PR4	AMC	5	3.2	PR19	ATM-CTX-AMC	1	0.6
PR5	FOX	4	2.5	PR20	CRO-ATM-AMC	1	0.6
PR6	ETP	0	0	PR21	CRO-CTX-AMC	4	2.5
PR7	IMP	0	0	PR22	CRO-ATM-CTX-FOX	1	0.6
PR8	ATM	2	1.3	PR23	CRO-CAZ-ATM-CTX	13	8.2
PR9	CRO-CTX	10	6.3	PR24	CRO-CAZ-CTX-AMC	1	0.6
PR10	CRO-CAZ	1	0.6	PR25	CRO-CAZ-CTX-AMC-ETP	1	0.6
PR11	AMC-FOX	6	3.8	PR26	CRO-ATM-CTX-AMC-IMP	1	0.6
PR12	ATM-AMC	1	0.6	PR27	CRO-CAZ-ATM-CTX-AMC-IMP	1	0.6
PR13	FOX-IMP	3	1.9	PR28	CRO-CAZ-ATM-CTX-AMC-ETP	1	0.6
PR14	FOX-ETP	1	0.6	PR29	CRO-CAZ-CTX-AMC-FOX-ETP-IMP	2	1.3
PR15	CTX-AMC	1	0.6				
Sensibles a todos los antibióticos		58	36.7	PR30	CRO-CAZ-CTX-AMC-FOX-ETP-IMP-ATM	8	5.1
				Resistencia a todos los antibióticos			

Cod.: código, **n:** frecuencia, **CRO:** ceftriaxona, **CAZ:** ceftazidima, **CTX:** cefotaxima, **AMC:** amoxicilina/clavulanato, **FOX:** cefoxitina, **ETP:** ertapenem, **IMP:** imipenem, **ATM:** aztreonam

4.1.4. Evaluación fenotípica de β -lactamasas

Evaluación de β -lactamasas de clase A

Al analizar la respuesta de las bacterias frente a la acción conjunta de las cefalosporinas con amoxicilina/ácido clavulánico como indicador de la producción de β -lactamasas de clase A, se encontró que 61 (38.6%) mostraron sinergia, indicativo de producción de BLEE (Figura 4A). De estos, 13 (21.3%) no presentaron halo o fueron muy pequeños, por tanto, no se pudo determinar la presencia de BLEE, así que fueron considerados positivos para realizar pruebas moleculares y detectar de genes de resistencia; 48 (78.7%) mostraron halos fantasmas u otra morfología (Figura 4B). Los 97 aislamientos restantes (61.4%) no produjeron β -lactamasas de clase A, ya que presentaron un halo regular sin deformaciones ni sinergia entre el AMC y el resto de antibióticos (Figura 4C). La frecuencia de bacterias productoras de BLEE por el método de Jarlier se muestra en el apéndice 4.

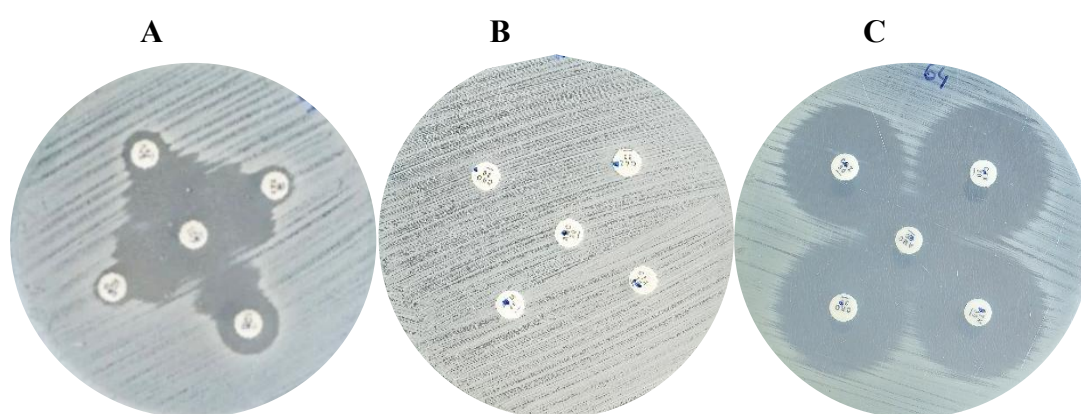


Figura 4. Screening de producción de β -lactamasas de clase A mediante el método de Jarlier. **(A)** Aislamiento productor de BLEE, sinergia entre el disco de AMC, las cefalosporinas y el ATM, presencia de halos fantasmas y/o irregulares. **(B)** Posible bacteria productora de BLEE, ausencia de halo debido a la presencia de otras enzimas. **(C)** Aislamiento negativo para la producción de BLEE, halos regulares, resistencia al AMC y falta de sinergia entre el AMC y los otros discos.

Evaluación de β -lactamasas de clases B, C y D

Al observar los resultados obtenidos a partir de realizar la prueba Blue-Carba, se encontró que 12 (7.6%) aislamientos fueron positivos; de estos, cuatro (33.3%) correspondieron a *E. coli* y ocho (66.7%) a *K. pneumoniae*. Por otro lado, se detectó que 28 (17.7%) aislamientos presentaron resistencia al disco de cefoxitina, y 13 (8.2%) mostraron resistencia al disco de ertapenem. La frecuencia de especies positivas para estas pruebas se muestra en el apéndice 4.

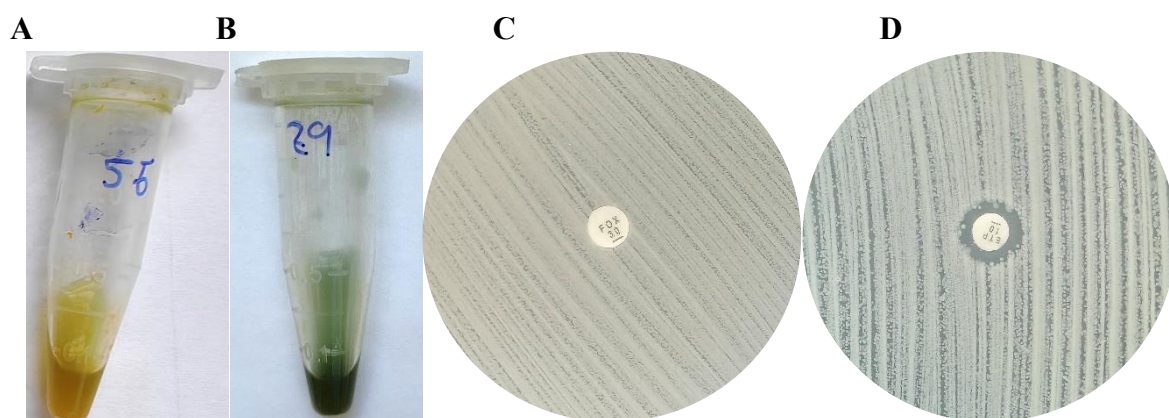


Figura 5. Screening de producción de β -lactamasas de clase B, C y D. **(A)** Prueba de Blue-Carba positivo para aislamiento productor de MBL y/o carbapenemasas. **(B)** Prueba de Blue-Carba negativa. **(C)** Screening de producción de β -lactamasas tipo AmpC con disco de FOX. **(D)** Screening de producción de β -lactamasas tipo OXA-48 con disco de ETP.

4.1.5. Evaluación molecular de β -lactamasas

Con respecto a la frecuencia de cepas bacterianas evaluadas con genes de resistencia, el análisis molecular reveló que 48 (30.4%) presentaron el gen *bla*_{CTX-M}, seguido por 19 (12%) con el gen *bla*_{TEM} y 14 (8.9%) con el gen *bla*_{SHV}. Además, se encontró seis cepas (3.8%) con el gen *bla*_{FOX} y seis (3.8%) con el gen *bla*_{DHA}. Otros genes como *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} y *bla*_{OXA-48},

fueron menos frecuentes entre los aislamientos. Así mismo, no se encontraron aislamientos con el gen *bla_{IMP}*. Sus frecuencias se muestran en la Figura 6.

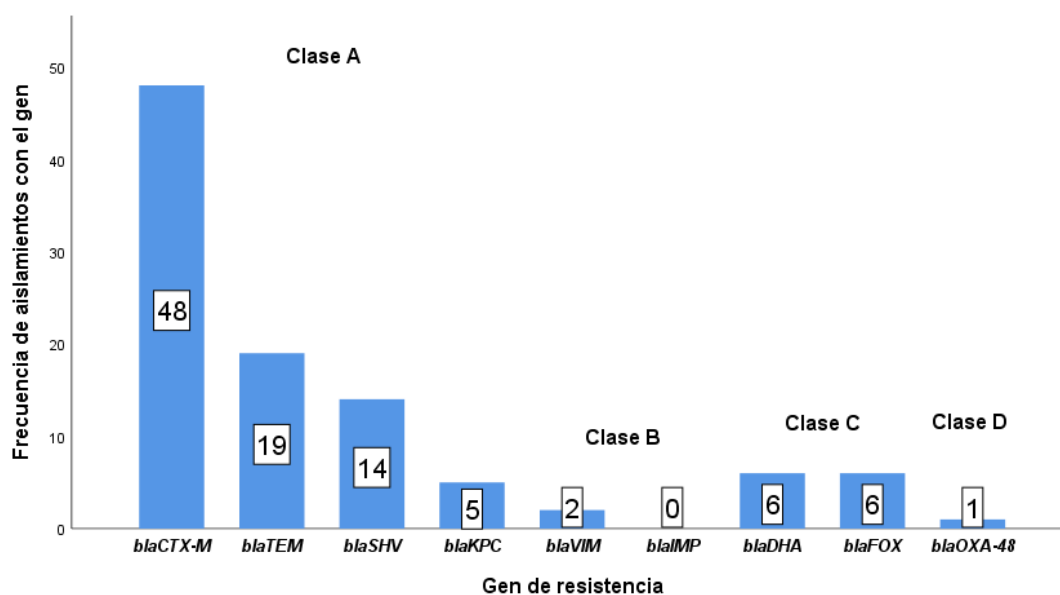


Figura 6. Distribución de frecuencias de las cepas resistentes según los genes de RAM que presentan

Genes de resistencia según especie bacteriana

En la evaluación de los genes de resistencia respecto a las especies bacterianas, el gen *bla_{CTX-M}* fue el más frecuentemente detectado. Este gen se identificó en 38 cepas de *E. coli* (34.2%), ocho cepas de *K. pneumoniae* (42.1%), y estuvo presente en *Shigella* sp. y *P. mirabilis*, entre otros. Así mismo, *E. coli* fue la especie que mostró la mayor diversidad de genes de resistencia, incluidos todos los de la clase A, B y C evaluados. Le siguió *K. pneumoniae* con la detección de seis genes distintos, todos los de la clase A y C evaluados. En ambas especies, la clase A de Ambler fue la más frecuente.

De las 158 muestras bacterianas, 65 (41.1%) presentaron al menos uno de los genes de resistencia evaluados. De las cepas de *E. coli*, 45 tuvieron al menos

un gen de RAM, el 100% de estas mostraron tener al menos un gen de resistencia de la clase A y tres cepas (6.7%) tuvieron genes de la clase A junto con genes de otras clases moleculares. Respecto a otros genes de relevancia, el gen *bla_{KPC}* predominó entre las cepas de *K. pneumoniae*, con cuatro cepas positivas (21.1%), mientras que en *E. coli*, este gen estuvo presente en un solo aislamiento. Así mismo, *K. pneumoniae* fue la especie con la mayor frecuencia de genes de la clase C de Ambler, sumando un total de 4 aislamientos positivos (21.1%). Otros genes como *bla_{OXA-48}* se detectó únicamente en un aislamiento de *Citrobacter freundii* (25%), mientras que *bla_{VIM}* solo se identificó en *E. coli*.

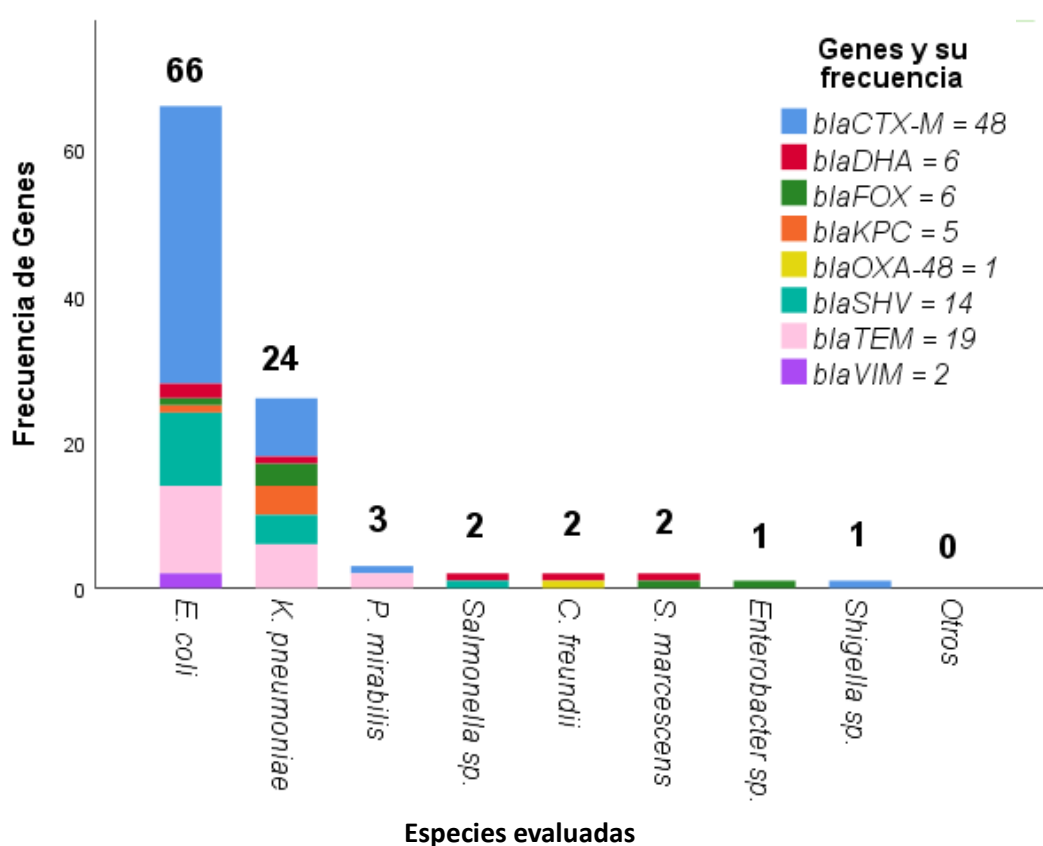


Figura 7. Frecuencia y distribución de genes de β -lactamasas en especies del orden Enterobacterales

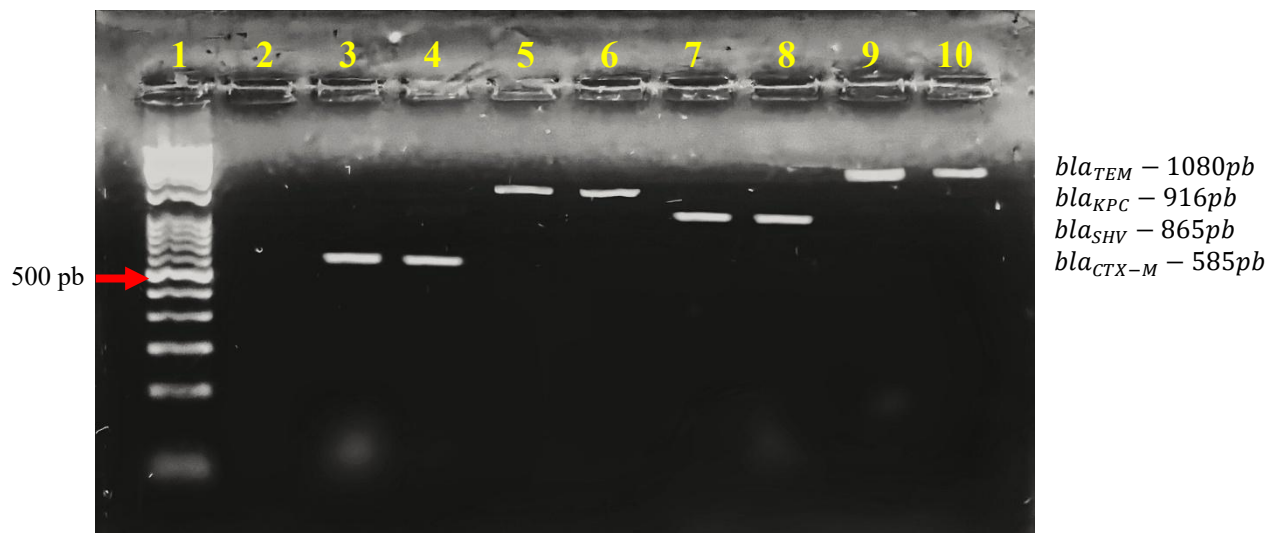


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados mediante PCR de genes de clase A. Carril 1: marcador de peso molecular 1000 pb; carril 2: control negativo; carriles 3 y 4: muestras positivas para *bla*_{CTX-M}; carriles 5 y 6: muestras positivas para *bla*_{KPC}; carriles 7 y 8: muestras positivas para *bla*_{SHV}; carriles 9 y 10: muestras positivas para *bla*_{TEM}.

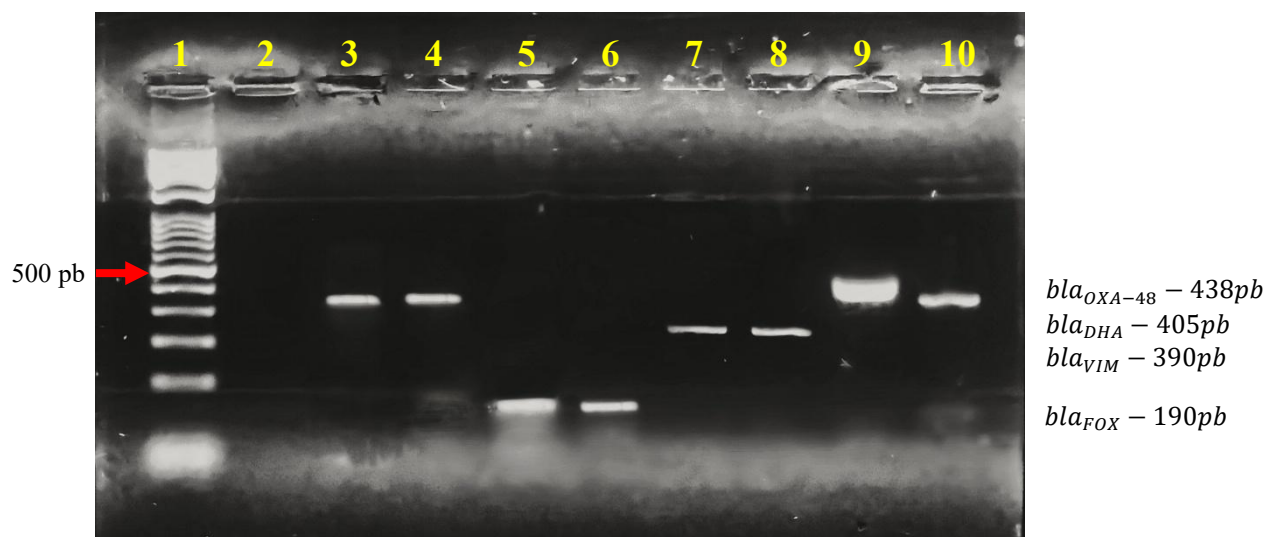


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados mediante PCR de genes de clases B, C y D. Carril 1: marcador de peso molecular 1000 pb; carril 2: control negativo; carriles 3 y 4: muestras positivas para *bla*_{DHA} (clase C); carriles 5 y 6: muestras positivas para *bla*_{FOX} (clase C); carriles 7 y 8: muestras positivas para *bla*_{VIM} (clase B); carriles 9 y 10: muestras positivas para *bla*_{OXA-48} (clase D).

Perfiles genéticos en bacterias del orden Enterobacterales

Al evaluar la frecuencia de los perfiles genéticos, se encontraron 19 perfiles distintos, entre los cuales el perfil con el gen *bla*_{CTX-M} fue el más frecuente, presente en 23 (14.6%) especies bacterianas, seguido del perfil *bla*_{CTX-M} – *bla*_{TEM} presente en 12 (7.6%) especies y el perfil *bla*_{CTX-M} – *bla*_{SHV} presente en 7 (4.4%) especies. Los perfiles genéticos menos frecuentes son descritos en la Tabla 8.

Tabla 8. Distribución de frecuencia de los perfiles genéticos de resistencia antimicrobiana encontrados

Código	Perfil Genético	n	%
PG1	<i>bla</i> _{SHV}	5	3.2
PG2	<i>bla</i> _{FOX}	1	0.6
PG3	<i>bla</i> _{TEM}	4	2.5
PG4	<i>bla</i> _{DHA}	1	0.6
PG5	<i>bla</i> _{CTX-M}	23	14.6
PG6	<i>bla</i> _{FOX} – <i>bla</i> _{DHA}	1	0.6
PG7	<i>bla</i> _{KPC} – <i>bla</i> _{DHA}	1	0.6
PG8	<i>bla</i> _{SHV} – <i>bla</i> _{FOX}	1	0.6
PG9	<i>bla</i> _{SHV} – <i>bla</i> _{TEM}	1	0.6
PG10	<i>bla</i> _{TEM} – <i>bla</i> _{KPC}	1	0.6
PG11	<i>bla</i> _{CTX-M} – <i>bla</i> _{VIM}	1	0.6
PG12	<i>bla</i> _{CTX-M} – <i>bla</i> _{TEM}	12	7.6
PG13	<i>bla</i> _{CTX-M} – <i>bla</i> _{SHV}	7	4.4
PG14	<i>bla</i> _{CTX-M} – <i>bla</i> _{KPC}	1	0.6
PG15	<i>bla</i> _{DHA} – <i>bla</i> _{OXA-48}	1	0.6
PG16	<i>bla</i> _{CTX-M} – <i>bla</i> _{DHA} – <i>bla</i> _{FOX}	1	0.6
PG17	<i>bla</i> _{CTX-M} – <i>bla</i> _{KPC} – <i>bla</i> _{FOX}	1	0.6
PG18	<i>bla</i> _{CTX-M} – <i>bla</i> _{VIM} – <i>bla</i> _{DHA}	1	0.6
PG19	<i>bla</i> _{CTX-M} – <i>bla</i> _{TEM} – <i>bla</i> _{KPC} – <i>bla</i> _{FOX}	1	0.6
Total		65	41.1

4.2. Discusión

La variedad de genes de RAM en Enterobacterales a nivel mundial es preocupante. En el Perú, los estudios que abordan la resistencia a diversos β -lactámicos y que, simultáneamente, tipifican los genes según las cuatro clases moleculares a las que estos pertenecen, son muy escasos. En ese contexto, este estudio representa uno de los pocos en el país y el primero en Cajamarca-Perú que buscó tipificar los genes de RAM abordando las 4 clases de β -lactamasas según la clasificación de Ambler en Enterobacterales. Para ello, se emplearon procedimientos microbiológicos convencionales y técnicas moleculares como PCR y electroforesis, con el propósito de identificar algunos de los genes más relevantes con importancia clínica y epidemiológica relacionados con la RAM en la región de Cajamarca.

Los resultados de este estudio revelan un perfil epidemiológico relevante de Enterobacterales en los establecimientos de salud de Cajamarca, destacando la versatilidad patogénica de este orden (Figura 2). Se observa una elevada frecuencia de *E. coli* (70.3%) seguida de *K. pneumoniae* (12.0%) como los principales agentes etiológicos en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS). Cabe resaltar que el 82.3% del total de especies bacterianas se asociaron a ITU. Estos hallazgos concuerdan con los reportes mundiales que señalan a las ITU como las infecciones más comunes y a *E. coli* como su principal causante (92). La marcada frecuencia de *K. pneumoniae* en estos resultados también es consistente con la literatura, que la asocia principalmente con infecciones respiratorias, bacteriemias e ITU (93).

La distribución por edad y sexo en este estudio también es congruente con la epidemiología global de estas infecciones. En este estudio, el 76.6% de las muestras

provinieron de mujeres, y el grupo más afectado por las infecciones fue el de los adultos mayores (31.0%). Estos hallazgos se alinean con lo reportado por Duffy *et al.* (94), quienes en el 2022 encontraron una elevada frecuencia de *E. coli* (89.4%) y *K. pneumoniae* (10.6%) en pacientes con ITU, neumonía y bacteriemia en hospitales de Estados Unidos. Dicho estudio también reveló que el 77.0% de las especies bacterianas fueron aisladas de pacientes mujeres y que la población más afectada fue la de los adultos mayores (54.0%), concordando con lo encontrado en el presente estudio. Esta coherencia refuerza la evidencia de un patrón bien establecido en la epidemiología de las ITU, donde la mayor frecuencia en mujeres se debe a factores anatómicos y fisiológicos, y la vulnerabilidad de los adultos mayores se atribuye a comorbilidades, inmunosenescencia y el uso constante de dispositivos médicos (7).

Los resultados de susceptibilidad a los antimicrobianos revelan un panorama de RAM significativo (Tabla 6), con una proporción elevada de aislamientos resistentes al menos a un antimicrobiano (63.3%), lo que subraya la preocupación por la RAM en la región. Específicamente, el 46.2% de las especies bacterianas mostraron resistencia a la cefotaxima (CTX) y el 42.4% a la ceftriaxona (CRO). Estos hallazgos están en consonancia con reportes globales que indican tasas variables, pero a menudo superiores al 30% de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación en *K. pneumoniae* y *E. coli* (95). A nivel nacional, la tendencia es similar, como lo demuestra un estudio realizado en hospitales de Lima entre 2011 y 2014, el cual ya reportaba resistencia a CRO del 32.5% para *E. coli* y 47.7% para *K. pneumoniae* (96).

La concordancia de los resultados del presente estudio con estas tendencias nacionales y mundiales sugiere una presión selectiva considerable para la aparición

de cepas productoras de enzimas que confieren RAM en los establecimientos de salud locales. Un hallazgo relevante de este estudio es la asociación entre la presencia del gen *bla_{CTX-M}* y la resistencia a CRO ($p = 0.007$). Esto es clínicamente importante, ya que la gran mayoría de las bacterias que portaban *bla_{CTX-M}* también mostraron resistencia a CRO, lo que refuerza la conexión directa entre la detección genética del fenotipo de resistencia a este antibiótico. Asimismo, los análisis estadísticos revelaron asociaciones entre la resistencia a ceftazidima (CAZ) y otras categorías sociodemográficas (apéndice 6).

En este estudio se observó que los pacientes masculinos presentaron una proporción significativamente mayor de resistencia a CAZ y carbapenémicos (45.2% y 25.8%) en comparación con las pacientes femeninas (13.2% y 4.1%). Esta disparidad de género podría atribuirse a varios factores. Se ha reportado que los hombres tienden a experimentar infecciones más severas o adquiridas en ambientes hospitalarios, y en muchos casos, buscan atención médica más tardíamente, cuando la infección ya está más avanzada (97). Adicionalmente, el contexto socioeconómico de Cajamarca, una región predominantemente agrícola y ganadera, podría influir en este patrón. Las actividades agrícolas y ganaderas son comúnmente desempeñadas por hombres, lo que podría exponerlos a ambientes con mayor carga bacteriana o una presencia elevada de bacterias resistentes. Por ejemplo, la exposición a residuos de antibióticos utilizados en la ganadería, a través del contacto con el suelo o agua, podría contribuir a una mayor presión selectiva para el desarrollo de RAM en la población masculina (98), y en nuestra región, aún no tenemos reportes de ese impacto en las personas, animales y el ambiente.

Se observó que las ITU mostraron una menor proporción de resistencia a los antibióticos (12.3%) en comparación con otros tipos de infecciones (53.6%). Esta diferencia puede atribuirse, en parte, al perfil de los patógenos prevalentes en cada tipo de infección y a la diversidad genética de resistencia que poseen. Aunque *E. coli* fue la especie con mayor diversidad de genes de RAM identificada en este estudio (Figura 7), y es el agente etiológico más frecuente en ITU, sus genes de clase A más frecuentes, confieren resistencia principalmente a cefalosporinas. En contraste, *K. pneumoniae* exhibe tasas de resistencia más elevadas, incluso en comparación con *E. coli*, debido a la presencia de genes de RAM que abarcan un espectro más amplio de antibióticos, incluyendo carbapenemasas, MBLs y AmpC (99).

Además, las ITU suelen ser causadas por microorganismos de origen comunitario o ambulatorio, mientras que otras infecciones, como la sepsis o la neumonía, son frecuentemente provocadas por especies con mayor resistencia adquirida o intrínseca, a menudo asociadas a IAAS. Si bien, tanto *E. coli* como *K. pneumoniae* pueden causar ITU, la mayor frecuencia de *E. coli* en estas infecciones y su perfil de resistencia más limitado en comparación con *K. pneumoniae* contribuye a la menor resistencia global observada en las ITU. A esto se suma que otras especies bacterianas asociadas a infecciones diferentes a las ITU, como *Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Citrobacter* sp. y *Serratia* sp., son productoras naturales de AmpC (92). Esta característica intrínseca sería causa de la RAM observada en los agentes de infecciones distintas a las ITU.

En este estudio, se encontró asociación entre el grupo etario y la resistencia a los antibióticos ($p < 0.05$). Las infecciones desarrolladas en lactantes y niños,

presentaron la frecuencia más alta de resistencia (63.6%). En contraste, los adolescentes y jóvenes mostraron la tasa más baja de resistencia (8.8%), mientras que las categorías de adultez y vejez exhibieron proporciones de resistencia del 17.4% y 7.0% respectivamente. Estos hallazgos son un indicio del nivel de RAM en la región Cajamarca, que podría estar modulada por factores intrínsecos del paciente y el tipo de infección, tal como se discutió previamente. La literatura es consistente en señalar que la población pediátrica es vulnerable a las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos, incluyendo carbapenémicos (100). Esto puede atribuirse a su vulnerabilidad inmunológica, dado que un sistema inmune inmaduro los hace más susceptibles a las infecciones severas. Frecuentemente, estas infecciones requieren hospitalizaciones y estancias prolongadas en unidades de cuidados intensivos (UCI), lo que incrementa su exposición a entornos hospitalarios donde las bacterias con RAM son más prevalentes (100,101).

Así mismo, la prescripción y el uso de antibióticos son comunes durante la infancia. La exposición temprana y repetida a estos fármacos puede seleccionar cepas con RAM en la microbiota de los niños, aumentando el riesgo de futuras infecciones. Se ha observado, por ejemplo, un aumento en la prevalencia de Enterobacterales productores de BLEE y carbapenemasas en infecciones pediátricas (102,103). Estas bacterias, además, pueden transmitirse con mayor facilidad en entornos comunitarios como jardines y escuelas. Por otro lado, la población de jóvenes y adultos, al poseer un sistema inmune más robusto, tiende a presentar menos comorbilidades y una frecuencia de hospitalizaciones o exposiciones crónicas a antibióticos, lo que podría explicar su menor proporción de RAM (104).

La resistencia observada tanto al aztreonam (ATM) (31.0%) como a las cefalosporinas de tercera generación, es indicativa de la presencia de BLEE y carbapenemasas (105). Este patrón se vincula con el perfil PR16 (CRO-ATM-CTX) presente en el 11.4% de especies bacterianas. Así mismo, el perfil PR30, que denota resistencia a todos los antibióticos evaluados y que se identificó en el 5.1% de las cepas, es particularmente preocupante (Tabla 7). Este perfil sugiere la producción de enzimas altamente hidrolíticas como KPC y/o metalo- β -lactamasas (MBLs), o la coproducción de BLEE con AmpC, las cuales inactivan a inhibidores como el clavulanato. La resistencia a la amoxicilina/clavulanato (AMC) encontrada en este estudio (22.2%) es superior a lo reportado por Oteo *et al.* (106) en España, en el 2010, y se atribuye a mecanismos de resistencia no inhibibles por AMC (como AmpC y carbapenemasas) y al uso excesivo de este antibiótico en la población. Esta diversidad de mecanismos de RAM en Enterobacterales de importancia clínica es un fenómeno impulsado por la presión selectiva de los antibióticos y la transferencia horizontal de genes (HGT) (107).

En términos generales, los hallazgos de este estudio respecto a los genes de BLEE están en consonancia con numerosos reportes a nivel mundial. En el presente estudio, se identificó un 38.6% de cepas productoras de BLEE. Este porcentaje es similar al 20.0% reportado por Tekele *et al.* (146) en el 2025, en Enterobacterales y gramnegativos no fermentadores en Etiopía. Así mismo, estudios realizados en España e India reportan frecuencias similares del 42.8% y 44.0% respectivamente (147). La presencia de genes de la clase A de Ambler también se detectó en *Shigella* sp., *P. mirabilis* y *Salmonella* sp., aunque en menor frecuencia (3.1%). Esta reducida

frecuencia en estas especies podría explicarse por el bajo número de muestras obtenidas para cada una de ellas en la presente investigación.

El caso de la resistencia a carbapenémicos en este estudio es notable, con una tasa del 10.1% (Tabla 6), lo cual presenta similitudes con reportes globales. Sader *et al.* (108) en el 2021, por ejemplo, señalaron tasas de resistencia a carbapenémicos en Enterobacterales de hasta 12.3% a nivel mundial. Resultados parecidos fueron descritos por la OMS (2021) (109), donde países como Uganda y Madagascar mostraron tasas de resistencia al ertapenem en *E. coli* del 10.0% y 6.2% respectivamente. En América latina, el panorama es análogo, con Brasil y Argentina reportando resistencia a carbapenémicos entre 12.3% a 35.3% en Enterobacterales (110). Esta resistencia se debe principalmente a la presencia de carbapenemasas y MBLs que degradan a estos antibióticos. Sin embargo, mecanismos intrínsecos como la reducción de la expresión de porinas (como OmpC en *E. coli* y OmpF en *K. pneumoniae*) también desempeñan un papel importante en la resistencia a carbapenémicos y en la multirresistencia (55).

A pesar de la resistencia detectada, los carbapenémicos aún mantienen una elevada tasa de sensibilidad ($\geq 89.9\%$) en las especies bacterianas de este estudio. Esta observación puede explicarse por tres razones. Primero, el uso de estos antibióticos está estrictamente regulado y optimizado en los hospitales peruanos. Por ejemplo, un estudio realizado en un Hospital de Lima reportó una tendencia decreciente en el consumo de meropenem durante el 2016, correlacionada con una disminución en la frecuencia de cultivos positivos de *P. aeruginosa* multirresistente (111). Este uso restringido y optimizado de los carbapenémicos reduce la exposición bacteriana a

estos fármacos, lo que resulta en una menor presión selectiva para el desarrollo de RAM. Segundo, los mecanismos de resistencia a carbapenémicos aún no están ampliamente diseminados en la región de Cajamarca, tal como se evidenció en este estudio, donde las cepas productoras de carbapenemasas fueron solo el 5.0% de los mecanismos de resistencia detectados. La elevada estabilidad de los carbapenémicos frente a la hidrólisis de β -lactamasas de amplia distribución global como TEM, SHV y CTX-M, e incluso las de tipo AmpC, que tampoco degradan carbapenémicos, contribuye a su eficacia (83) .

Como se muestra en la Tabla 8, los perfiles genéticos más abundantes (80.0%) en este estudio correspondieron a genes productores de BLEE de tipo CTX-M, SHV y TEM, este hallazgo explica directamente la marcada resistencia observada a las cefalosporinas de tercera generación y, a su vez, la elevada sensibilidad de las especies estudiadas frente al disco de cefoxitina (FOX). Las BLEE, si bien hidrolizan y confieren resistencia a las cefalosporinas y al aztreonam, no hidrolizan la FOX (112). La alta sensibilidad a FOX encontrada en este estudio (82.3%) concuerda con lo descrito por Guet *et al.* (113) en el 2014, donde el 97.9% de cepas fueron sensibles a este antibiótico. Aunque FOX es una cefalosporina de segunda generación y, por ende, podría ser un sustrato para las BLEE, su estructura molecular (grupo metoxi en posición C7 β) bloquea la unión de las BLEE al anillo β -lactámico, impidiendo su hidrólisis (83,84).

La presencia de genes *bla_{DHA}* y *bla_{FOX}* (6.3%) en las cepas bacterianas analizadas en este estudio fue uno de los principales actores causantes de la resistencia a FOX (15.8%). Las enzimas FOX y DHA, debido a su centro activo más amplio, tienen la

capacidad de degradar el aztreonam y diversas cefalosporinas, incluyendo las cefamicinas como FOX. Tamma *et al.* (114) en el 2019, describen que estas enzimas están presentes en cepas de *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp., *E. coli*, *Serratia* sp., *Enterobacter* sp., entre otras, de manera adquirida o constitutiva. Ello se alinea con los resultados de este estudio, donde se identificaron especies similares productoras de AmpC (6.3%) (114). Es importante señalar que otras enzimas, como las carbapenemasas y las propias MBLs también reportadas, pueden contribuir a la resistencia a FOX, dado que su espectro de actividad incluye al grupo de las cefamicinas (115).

Entre las 28 cepas resistentes a FOX indicadas en este estudio, 10 (35.7%) presentaron al menos un gen de la clase C. Específicamente, *bla*_{FOX} se encontró en *K. pneumoniae* (50.0%), *E. coli* (16.7%), *Enterobacter* sp. (16.7%) y *S. marcescens* (16.7%). Por su parte, *bla*_{DHA} estuvo presente en *E. coli* (33.4%), *K. pneumoniae* (16.7%), *C. freundii* (16.7%), *Salmonella* sp. (16.7%) y *S. marcescens* (16.7%). Estos hallazgos coinciden con la literatura, pues Cheong *et al.* (116) en el 2016 reportaron la presencia de los genes *bla*_{FOX} y *bla*_{DHA} en *K. pneumoniae*, y Bandyopadhyay *et al.* (117) en el 2021 describieron ambos genes en *E. coli* y *K. pneumoniae*. La adquisición de estos genes se atribuye, posiblemente, a la HGT mediada por plásmidos de otros patógenos como *Enterobacter cloacae* y *Morganella morganii*.

En el caso de la presencia de *bla*_{FOX} en *Enterobacter* sp., un género naturalmente productor de AmpC cromosómica, la presencia de este gen plasmídico indica un mecanismo de resistencia dual: uno inducido (AmpC cromosómica de baja expresión) y otro constitutivo o de expresión constante (*bla*_{FOX} plasmídica). Esta

combinación podría explicar la resistencia a los discos de AMC y FOX (halo 6 mm) encontrada en este estudio. De manera similar, en la producción de DHA en *C. freundii*, la adquisición de un gen de AmpC de expresión constante confiere una resistencia significativa a las cefalosporinas, incluyendo las cefamicinas. La presencia de *bla_{DHA}* en cepas de *C. freundii* ha sido reportada previamente por Yim *et al.* (118) en el 2013, quienes indicaron que la transferencia de este gen se asocia con transposones IS *CR1*.

Una cepa de *S. marcescens* productora de FOX y DHA también fue identificada en este estudio. Si bien existen escasos reportes sobre la coproducción de enzimas tipo AmpC en esta especie, la presencia de *bla_{FOX}* y *bla_{DHA}* ha sido observada en genomas secuenciados de *S. marcescens* en bases de datos del NCBI (anexo 4). Un caso relevante es el de Mata *et al.* (119) en el 2010, quienes detectaron simultáneamente *E. coli* y *S. marcescens* coinfectando a un mismo paciente, ambas portadoras del gen *bla_{DHA-1}* en un plásmido del tipo IncL/M-MOBP13. El secuenciamiento génico de este estudio demostró que se trataba del mismo elemento genético en ambas bacterias, evidenciando un proceso de HGT *in vivo*. Esto subraya la facilidad y la rapidez con la que los genes de AmpC pueden ser adquiridos y transmitidos entre *S. marcescens* y otros Enterobacterales. Aunque *S. marcescens* es un productor natural de AmpC, la adquisición de otros genes de esta misma clase molecular (*bla_{FOX}* o *bla_{DHA}*) no es un fenómeno redundante (114). Poiriel *et al.* (120) en el 2005 y Lartigue *et al.* (121) en el 2006, señalan que existen diversos elementos genéticos, como la secuencia de inserción IS *Ecp1*, que son responsables de la movilización de genes de enzimas tipo AmpC, pudiendo transponer genes adyacentes o movilizar un gen *bla* cromosómico a un plásmido.

Como señala Lazarus *et al.* (122) en el 2024, *S. marcescens* se caracteriza por ser una productora lenta de AmpC en comparación con otros Enterobacterales, debido al número de mutaciones necesarias para su producción y a la escasa cantidad de enzima resultante. Esto podría explicar dos aspectos fundamentales observados en este estudio. Primero, la baja cantidad de AmpC producida por *S. marcescens* generalmente resulta en su sensibilidad a las cefalosporinas, en particular a la ceftriaxona, lo cual concuerda con la sensibilidad encontrada en la cepa de *S. marcescens* del presente estudio. Segundo, dada la ineficiencia de esta AmpC y al ser una cepa aislada de un paciente clínico, es probable que la bacteria necesitara adquirir genes como *bla_{FOX}* y *bla_{DHA}* para mantener una ventaja selectiva. Esta necesidad se evidenció en la resistencia observada a FOX, CRO, CAZ, AMC y ATM. Además, como se describió en el estudio de Mata *et al.* (119), la transmisión de genes plasmídicos de AmpC entre especies puede ser rápida y facilitada en ciertos casos.

En lo que respecta a las pruebas fenotípicas para la detección de BLEE, este estudio demostró que el método de Jarlier posee una alta especificidad (100%) para este grupo de enzimas (apéndice 5), lo que se correlaciona con la evidencia de al menos un gen de la clase A por PCR. Este hallazgo es consistente con lo reportado por Cortez *et al.* (123) en el 2022 y Lezameta *et al.* (124) en el 2010, quienes también obtuvieron un 100% de especificidad para BLEE utilizando el método de Jarlier. Esta alta especificidad se debe principalmente a la acción del clavulanato, un inhibidor de BLEE, que bloquea la producción de estas enzimas en cepas productoras. Al inhibirse la actividad de las BLEE, los otros β -lactámicos de la prueba y el propio AMC pueden ejercer su efecto bactericida, confirmando la presencia de estas enzimas (52).

La morfología de los halos observados en esta prueba fenotípica se explica por la interacción o sinergia entre el AMC y las cefalosporinas. El clavulanato se difunde desde el disco central hacia el agar, así mismo, los discos de cefalosporinas también se difunden de manera similar. Al interactuar el clavulanato con las cepas productoras de BLEE, este bloquea la actividad hidrolítica de estas enzimas. Con las BLEE inhibidas, las cefalosporinas ya difundidas, no son hidrolizadas y pueden ejercer su efecto, manifestándose en una expansión característica del halo (cola de pez o efecto ojo de cerradura) entre el inhibidor y la cefalosporina. Esta morfología se observó en el 78.7% de los casos y se reconoce como un signo de sinergia, una característica clave en cepas productoras de CTX-M, TEM y SHV (8), lo que se confirma en el presente estudio. Sin embargo, el 21.3% de las cepas productoras de BLEE no presentaron las morfologías típicas de sinergia, lo que impidió la observación de este efecto entre los antibióticos mencionados.

Lo anterior mencionado puede explicarse por la presencia de otras enzimas que interfieren con el ensayo. Entre ellas se incluyen las AmpC, que hidrolizan cefalosporinas y aztreonam sin ser inhibidas por el AMC, o la presencia de carbapenemasas como KPC, OXA-48 y las MBLs, cuyo espectro de hidrólisis es amplio. Adicionalmente, la coproducción enzimática encontrada en este estudio es un factor relevante. Al revisar el perfil genético, se encontró que un 8.2% de las cepas eran portadoras de al menos uno de estos genes (AmpC, carbapenemasas y/o MBLs) y el 7.0% fueron coproductoras de BLEE con las enzimas antes mencionadas (Tabla 8). Estos hallazgos son semejantes a los de Ahmad *et al.* (125) en el 2025, quienes reportaron un 5% de cepas coproductoras de MBLs y BLEE en *E. coli* y *K. pneumoniae*. Así mismo, Mirza *et al.* (126) en el 2019, describieron la coproducción

de AmpC y MBLs en 5 (1.1%) aislados de *E. coli*. Por su parte, Salvia *et al.* (127) en el 2022 encontraron una concurrencia entre BLEE + AmpC, BLEE + MBL y AmpC + MBL del 5.2%, 11.5% y 1.3% respectivamente, lo que guarda gran similitud con los resultados obtenidos en el presente estudio.

La coexistencia de enzimas AmpC y BLEE puede complicar el diagnóstico y el tratamiento de las infecciones bacterianas. Como se ha observado, las AmpC pueden enmascarar la detección de BLEE, y el AMC, un inhibidor común, puede inducir la producción de enzimas AmpC. Esto último conduce a posibles falsos negativos en la detección de BLEE al mejorar la resistencia a las cefalosporinas (128). Por lo tanto, la detección simultánea de ambas enzimas es imperativa para asegurar la identificación precisa de BLEE y la hiperproducción de AmpC. Además, la coexistencia de BLEE y MBLs exacerba aún más la RAM, debido a la capacidad combinada de estas enzimas para hidrolizar un amplio espectro de β -lactámicos. En el presente estudio, se reportó un 21.1% de cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC, un resultado similar al encontrado por Guerra *et al.* (129) en el 2020, quienes detectaron KPC en el 24.0% de los cultivos de *K. pneumoniae*.

Las carbapenemasas lograron ser detectadas mediante la prueba de Blue-Carba en este estudio (apéndice 4). De las especies evaluadas, 12 cepas (7.6%) resultaron positivas en esta prueba. Sin embargo, de estas solo 8 (66.7%) presentaron al menos un gen de carbapenemasas mediante PCR. Estos resultados son parcialmente similares a los reportados por Muñoz *et al.* (130) en el 2017, quienes observaron una sensibilidad (84.6%) y especificidad (87.5%) intermedias para la prueba de Blue-Carba. No obstante, los hallazgos del presente estudio difieren notablemente de los

de Pasteran *et al.* (131), donde esta prueba detectó el 100% de las carbapenemasas de la clase A y B en bacilos gramnegativos. Es probable que esta diferencia en la sensibilidad se deba a que este estudio no evaluó las MBLs del tipo NDM, cuya frecuencia ha mostrado un crecimiento significativo entre los gramnegativos (125). La presencia de este tipo de enzimas altamente hidrolíticas, también pudo interferir con el screening de OXA-48 evidenciado con la resistencia al ertapenem.

Cuatro cepas que fueron positivas en la prueba de Blue-Carba, pero que no mostraron ninguno de los genes productores de carbapenemasas evaluados, dos presentaron un fenotipo concordante con MBLs. Esto se evidenció por su resistencia a todos los antibióticos utilizados en este estudio y una sensibilidad al ATM. Cabe recordar que, en un fenotipo de MBL, el aztreonam no es hidrolizado debido a la estructura de ácido sulfónico en el átomo de nitrógeno del anillo β -lactámico, lo que interfiere con la capacidad de las MBLs para hidrolizarlo (49). Las dos cepas restantes no exhibieron un fenotipo de MBL, ya que fueron sensibles a CAZ, AMC y ATM. Además, la colorimetría de la prueba de Blue-Carba para estas cepas no fue un viraje a amarillo intenso, característico de los productores positivos en este estudio, sino un viraje a un color verdusco (Figura 5A y 5B).

En cuanto a las cepas con genes para carbapenemasas (*bla_{VIM}*, *bla_{KPC}* y *bla_{OXA-48}*) que resultaron positivas en las pruebas de Blue-Carba, la distribución por especie fueron *K. pneumoniae* (50.0%), *E. coli* (37.5%) y *C. freundii* (12.5%). Estos datos concuerdan con lo reportado por García *et al.* (132) en el 2023 y De Laveleye *et al.* (133) en el 2017, donde *K. pneumoniae* es consistentemente la especie con mayor frecuencia de carbapenemasas (> 60%) y *E. coli* ocupa el segundo lugar (> 30%). Sin

embargo, en el caso de las carbapenemasas tipo OXA-48, aunque suelen reportarse principalmente en *K. pneumoniae* y *E. coli*, en este estudio, la única cepa productora de OXA-48 fue *C. freundii*. Si bien *C. freundii* no fue inicialmente considerada un patógeno nosocomial clásico, los reportes actuales de *C. freundii* productora de carbapenemasas son cada vez más frecuentes (134). Yao *et al.* (135) en el 2021, reportaron RAM en *C. freundii* asociada a NDM y OXA-48 en el 14.3% y 8.4% de las cepas respectivamente. Este estudio también mostró la coproducción de *bla_{DHA}*, un gen que produce una enzima tipo AmpC, lo cual es similar a lo encontrado en el presente estudio, donde la especie de *C. freundii* identificada presentó el gen *bla_{DHA}* acompañado del gen *bla_{OXA-48}*.

E. coli fue la especie que exhibió la mayor diversidad de genes de RAM en este estudio, con presencia de todos los genes evaluados de las clases A, B y C, a excepción del gen *bla_{OXA-48}* de la clase D. La amplia capacidad de *E. coli* y otros Enterobacterales para adquirir genes de resistencia se atribuye principalmente a la presencia de elementos genéticos móviles como integrones y plásmidos, que favorecen la HGT (136). Los integrones, en particular, tienen la capacidad de extraer genes de resistencia de su entorno y ensamblarlos en sus casetes genéticos. Además, el ambiente intestinal se considera un foco crítico para la adquisición y transferencia de genes de RAM. Según Poirel *et al.* (137), es en el intestino donde se encuentra la mayor densidad poblacional bacteriana, creando un espacio propicio para que bacterias como *E. coli* adquieran genes del RAM y los transfieran a otras cepas, tanto comensales como patógenas.

K. pneumoniae ocupó el segundo lugar en diversidad de genes en este estudio, con un total de seis genes identificados, siendo los genes de las clases A y C los más prevalentes. Dentro de la clase A, el 42.1% de cepas de *K. pneumoniae* presentaron el gen *bla*_{CTX-M}, seguido por el *bla*_{TEM} (26.3%), *bla*_{KPC} (21.0%) y *bla*_{SHV} (15.7%). Estos hallazgos difieren con los encontrados por Sánchez *et al.* (138) en el 2020, cuyo estudio reportó una mayor frecuencia de *bla*_{TEM} (94%), seguido de *bla*_{CTX-M} (13.0%) y *bla*_{SHV} (8.0%). Por su parte, los resultados de Ghenea *et al.* (105) en el 2022, mostraron una prevalencia diferente, con *bla*_{SHV} (100.0%), *bla*_{CTX-M} (71.8%) y *bla*_{TEM} (43.7%). A nivel nacional, Florián, S. (139), en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas del Perú, reportó una frecuencia de *bla*_{KPC} del 11.4% en 2019 y del 48.0% en 2020. Estas variaciones resaltan la dinámica epidemiológica regional y global de resistencia en *K. pneumoniae*.

La presencia de genes de la clase A fue la más frecuente en este estudio, superando a otros genes de resistencia. De la frecuencia total de genes reportados, el 85.4% pertenecieron a la clase A. Dentro de esta clase, el gen *bla*_{CTX-M} fue el más prevalente (46.0%), un resultado concordante con el estudio de Gonzales *et al.* (140) en el 2020, donde se reportó una frecuencia de *bla*_{CTX-M} en más del 90% de las cepas de *E. coli* analizadas. Esta afinidad de los genes de clase A por ciertos grupos de Enterobacterales se debe a múltiples factores. Uno de los mecanismos clave de movilización de estos genes, similar a lo observado en otros grupos genéticos mencionados, es a través de plásmidos. Los plásmidos *IncF/IncII* en *E. coli* y el plásmido *IncFII* en *K. pneumoniae* son particularmente notables por su alta movilidad y estabilidad. Además, la secuencia de inserción IS *EcpI*, que flanquea los

genes *bla*_{CTX-M}, facilita su transposición a otros plásmidos o su integración en el cromosoma bacteriano (141).

La frecuencia de enzimas tipo BLEE y KPC en Enterobacterales está influenciada por múltiples factores. En entornos con alta densidad poblacional, por ejemplo, la diseminación de plásmidos conjugativos que reportan estos genes es notablemente más rápida y eficiente. Hendrickx *et al.* (142) en el 2020, reportaron que los plásmidos que transportan *bla*_{KPC} tienden a poseer una elevada capacidad de recombinación. Además, ciertos clones de Enterobacterales, como el clon ST258 de *K. pneumoniae*, demuestran una mayor aptitud para adquirir genes de resistencia debido a su considerable plasticidad genética (99). Estos factores podrían explicar los genotipos con múltiples genes de RAM hallados en *E. coli* y *K. pneumoniae* dentro de una misma cepa en este estudio. La coproducción de múltiples genes de resistencia es un fenómeno documentado; Zaniani *et al.* (143) en el 2012, encontraron genes de TEM y SHV dentro de una misma cepa (29.8%) de pacientes hospitalizados y ambulatorios. Así mismo, la coproducción de dobles carbapenemasas en cepas de *K. pneumoniae* ha sido reportada tanto en Perú como a nivel global (144,145).

La coocurrencia de genes como *bla*_{CTX-M} y *bla*_{KPC} ha sido reportada en Enterobacterales, tal como se observó en el estudio de Piekar *et al.* (146) en el 2023, quienes detectaron ambos genes en una cepa de *E. coli*. Un caso ilustrativo es el descrito por Li *et al.* (107) en el 2022, quienes secuenciaron una cepa de *K. pneumoniae* aislada de una muestra de orina de un paciente. En dicha cepa, se identificó la presencia de *bla*_{CTX-M-167}, *bla*_{TEM-1B}, *bla*_{SHV-1}, *aadA16*, *fosA*, *sull*, *mph(A)*, entre otros genes de resistencia. Adicionalmente, esta cepa presentaba genes

intrínsecos mutados que permitían la supresión de porinas como la OmpK36. Estos hallazgos demuestran la considerable plasticidad genética que posee *K. pneumoniae* para adquirir genes de RAM. Li *et al.* (107), también demostraron, mediante experimentos de conjugación, la asociación del gran número de genes de RAM con la presencia de plásmidos, como el incFII(K), capaz de transferir *bla*_{CTX-M-167}, y *bla*_{SHV-1} simultáneamente. Cabe destacar que el tratamiento antibiótico recibido por el paciente pudo haber influido significativamente en la RAM observada en esta cepa, ya que la presión selectiva ejercida por los antibióticos favorece la supervivencia de cepas multirresistentes (107).

Otro factor crucial, relacionado con el nicho ecológico y la presión selectiva, es la amplia diseminación de estas especies bacterianas, especialmente en ambientes hospitalarios. En estos entornos, las bacterias tienen la capacidad de formar biopelículas, lo que facilita la propagación de plásmidos de resistencia entre diferentes especies. Madsen *et al.* (147), señalan que las biopelículas promueven significativamente la conjugación de plásmidos portadores de genes de RAM, como los de clase A, gracias a la proximidad celular y la disponibilidad de nutrientes. Este mismo estudio documenta tasas de transferencia horizontal de genes 1000 veces mayores para genes *bla*_{NDM} en biopelículas de *K. pneumoniae* en comparación con bacterias sin biopelículas. Un fenómeno similar ocurre a nivel intestinal, donde múltiples reportes indican HGT entre Enterobacterales incluso sin la presencia de presión antibiótica (148).

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Al tipificar las β -lactamasas de Enterobacterales provenientes del cepario del LRSP, según la clasificación molecular de Ambler, se identificaron enzimas de las clases A, B, C y D. Entre ellas, la clase A fue la más frecuente, predominante en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

En cuanto a los genes codificantes de β -lactamasas, los genes de clase A fueron los más frecuentes, destacando el gen *bla*_{CTX-M} (30.4%), seguido de *bla*_{TEM} (12.0%), *bla*_{SHV} (8.9%) y *bla*_{KPC} (3.2%). En menor proporción, pero clínicamente relevantes, se identificaron los genes *bla*_{VIM} de la clase B, *bla*_{FOX} y *bla*_{DHA} de la clase C y *bla*_{OXA-48} de la clase D.

Entre los perfiles de resistencia (PR) más relevantes se identificó el PR CRO-ATM-CTX (ceftriaxona, aztreonam y cefotaxima), en el 11.4% de las especies. En cuanto a los perfiles genéticos, el más frecuente fue *bla*_{CTX-M} detectado en el 14.6% de los Enterobacterales evaluados.

Se encontró coocurrencia de genes, algunos de la clase A coocurrieron con otros genes de la misma clase o de clases diferentes, confiriendo mayor resistencia a los β -lactámicos.

5.2. Recomendaciones

Se sugiere ampliar el panorama de investigación sobre la RAM enzimática en el orden Enterobacterales. Es crucial investigar en Cajamarca un espectro más amplio de mecanismos de resistencia incluyendo de carbapenemasas como NDM, OXA-48, así como de AmpC tipo MOX, CIT, ACC, entre otras. Esto permitirá generar reportes actualizados y oportunos, que sirvan como base para estudios que atiendan oportunamente la emergencia de genes aún no reportados en la región.

Finalmente, se sugiere la implementación de pruebas fenotípicas más sensibles y específicas para la detección de enzimas AmpC y OXA-48. Esto incluye técnicas como la prueba de disco difusión con ácido fenilborónico para AmpC, y el uso de discos de temocilina para OXA-48. Adicionalmente, se recomienda considerar el uso de pruebas rápidas de inmunocromatografía, idealmente combinadas con otras metodologías confirmatorias, para una identificación ágil y precisa de estos mecanismos de resistencia en el entorno clínico.

LISTA DE REFERENCIAS

1. Philippon A, Slama P, Dény P, Labia R. A structure-based classification of class A β -Lactamases, a broadly diverse family of enzymes. Vol. 29, Clinical Microbiology Reviews. 2016.
2. Jacoby G. AmpC β -Lactamases. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2009 Jan [cited 2024 Jun 2]; Available from: <https://doi.org/10.1128/cmr.00036-08>
3. Osawa K, Shigemura K, Kitagawa K, Fukuda T, Takasaka A, Wakabayashi S, *et al.* Molecular characteristics of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urine in Hyogo, Japan. International Journal of Urology. 2019;26(1).
4. Galan-Sanchez F, Ruiz Del Castillo B, Marin-Casanova P, Rodriguez-Iglesias M. Caracterización de *blaOXA-48* detectada en cepas clínicas de *Enterobacter cloacae* aisladas en el sur de España. Vol. 30, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2012.
5. Instituto Nacional de salud. Manual de Procedimientos Para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. Pesquisa Amazônia, Brazil. 2002;858(1).
6. Austin C. Electroforesis | NHGRI. National Human Genome Research Institute. 2020.
7. Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Scherckenberger P, *et al.* Koneman Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. 2020;(July).
8. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. Clinical Infectious Diseases. 1988;10(4).
9. Bonomo RA. β -Lactamases: A focus on current challenges [Internet]. Vol. 7, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2017 [cited 2024 Jun 7]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a025239>

10. Hudzicki J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. Kirby Bauer, Disk-Diffusion, Susceptibility, Test Protocol. 2009;(December 2009).
11. Dashti AA, Jadaon MM, Abdulsamad AM, Dashti HM. Heat treatment of bacteria: A simple method of DNA extraction for molecular techniques. Kuwait Medical Journal [Internet]. 2009 [cited 2024 Jun 7];41(2). Available from: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:22344475>
12. Chen L, Kumar S, Wu H. A review of current antibiotic resistance and promising antibiotics with novel modes of action to combat antibiotic resistance [Internet]. Vol. 205, Archives of Microbiology. 2023 [cited 2024 Jun 7]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-023-03699-2>
13. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos. Datos y cifras. Organización Mundial de la Salud [Internet]. 2021 [cited 2024 Jun 7]; Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
14. Organización Panamericana de la Salud. La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial [Internet]. 2021 [cited 2024 Jun 7]. Available from: <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>
15. Cox J. Antimicrobial resistance now causes more deaths than HIV/AIDS and malaria worldwide – new study [Internet]. 2022 [cited 2024 Jun 7]. Available from: <https://www.gavi.org/vaccineswork/antimicrobial-resistance-now-causes-more-deaths-hiv-aids-and-malaria-worldwide-new>
16. World Health Organization. Report signals increasing resistance to antibiotics in bacterial infections in humans and need for better data. World Health Organization [Internet]. 2022 [cited 2024 Jun 7]; Available from: <https://www.who.int/news/item/09-12-2022-report-signals-increasing-resistance-to-antibiotics-in-bacterial-infections-in-humans-and-need-for-better-data>
17. Montazeri EA, Khosravi AD, Saki M, Sirous M, Keikhaei B, Seyed-Mohammadi S. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* causing bloodstream infections in cancer patients from southwest of Iran. Infect

- Drug Resist [Internet]. 2020 [cited 2024 Jun 7];13. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/idr.s254357>
18. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, *et al.* Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. Clin Microbiol Rev. 2020;33(3).
 19. Lepe JA, Martínez-Martínez L. Resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. Medicina Intensiva (English Edition). 2022;46(7).
 20. Aguilar-Gamboa FR. Impacto del uso irracional de antimicrobianos durante la pandemia por COVID-19. Revista Experiencia en Medicina del Hospital Regional Lambayeque. 2022;8(2).
 21. Jia P, Zhu Y, Li X, Kudinha T, Yang Y, Zhang G, *et al.* High Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* Strains Collected From Strictly Defined Community-Acquired Urinary Tract Infections in Adults in China: A Multicenter Prospective Clinical Microbiological and Molecular Study. Front Microbiol [Internet]. 2021 [cited 2024 Jun 7];12. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.663033>
 22. Alemayehu T, Asnake S, Tadesse B, Azerefegn E, Mitiku E, Agegnehu A, *et al.* Phenotypic detection of carbapenem-resistant gram-negative bacilli from a clinical specimen in sidama, ethiopia: A cross-sectional study. Infect Drug Resist [Internet]. 2021 [cited 2024 Jun 7];14. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/idr.s289763>
 23. Rizi KS, Mosavat A, Youssefi M, Jamehdar SA, Ghazvini K, Safdari H, *et al.* High prevalence of blaCMY AmpC beta-lactamase in ESBL co-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates in the northeast of Iran. J Glob Antimicrob Resist [Internet]. 2020 [cited 2024 Jun 7]; 22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2020.03.011>
 24. Yaqoob A, Yunus N, Bint Ali S, Ghaffar H, Aslam A, Nasir S. Frequency of OXA-48 Gene in the *Enterobacteriaceae* in a Tertiary Care Hospital in Lahore. [cited 2024 May 31]; Available from: <https://www.jsmdc.pk/wp-content/uploads/2019/06/Frequency-of-OXA-48-Gene-in-the-Enterobacteriaceae-in-a-Tertiary-Care-Hospital-in-Lahore.pdf>

25. García D. Enterobacterias productoras de Carbapenemasas tipo KPC, NDM y OXA-48, en pacientes atendidos durante la pandemia de COVID-19, Trujillo - Perú [Internet]. 2023 [cited 2024 May 31]. Available from: <https://dspace.unitru.edu.pe/items/8937f28e-7947-47c4-bf38-6592dba3a529>
26. Cuicapuza D. Primer informe de aislados de Enterobacteriales productores de OXA-181 en América Latina [Internet]. [Lima]; 2023 [cited 2024 May 31]. Available from: <https://hdl.handle.net/20.500.12866/13577>
27. Angles E, Huaranga J, Sacsquispe R, Pampa L. Panorama de las carbapenemasas en Perú. Institutional Repository for Information Sharing [Internet]. 2020 [cited 2024 May 31]; Available from: <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.61>
28. Díaz S, Castañeda K, Santa Cruz C, Carrasco F, Moreno M. Etiology of Urinary Infections and Prevalence of *Escherichia coli*, Producer of Extended spectrum Betalactamases and Carbapenemases. REBIOL [Internet]. 2021 [cited 2024 Jun 7];41(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.17268/rebiol.2021.41.02.03>
29. Falconí Sarmiento A, Nolasco Mejia M, Bedoya Rozas A, Amaro Giraldo C, Málaga G. Frecuencia y factores de riesgo para bacteriemia por enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido en pacientes de un hospital público de Lima, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet]. 2018 [cited 2024 Jun 7];35(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3601>
30. Rivera M, Rodríguez C, Flores R, Serquén L, Arce Z. Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella* spp y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet]. 2015 [cited 2024 Jun 7];32(4). Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000400018
31. Janda JM, Abbott SL. The changing face of the family *Enterobacteriaceae* (Order: Enterobacterales): New members, taxonomic issues, geographic expansion, and new diseases and disease syndromes. Clin Microbiol Rev. 2021;34(2).

32. Janda JM. Proposed nomenclature or classification changes for bacteria of medical importance: taxonomic update 5. Vol. 97, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2020.
33. Wesevich A, Sutton G, Ruffin F, Park LP, Fouts DE, Fowler VG, *et al.* Newly named *Klebsiella aerogenes* (formerly enterobacter aerogenes) is associated with poor clinical outcomes relative to other enterobacter species in patients with bloodstream infection. J Clin Microbiol. 2020;58(9).
34. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. [cited 2025 Aug 5]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>
35. Rock C, Donnenberg MS. Human Pathogenic *Enterobacteriaceae*. In: Reference Module in Biomedical Sciences. 2014.
36. Pana ZD, Zaoutis T. Treatment of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBLs) infections: What have we learned until now? [Internet]. Vol. 7, F1000Research. 2018 [cited 2024 Jun 7]. Available from: <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.14822.1>
37. Verani JR, Blau DM, Gurley ES, Akelo V, Assefa N, Baillie V, *et al.* Child deaths caused by *Klebsiella pneumoniae* in sub-Saharan Africa and south Asia: a secondary analysis of Child Health and Mortality Prevention Surveillance (CHAMPS) data. Lancet Microbe [Internet]. 2024 [cited 2024 Jun 7];5(2). Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s2666-5247\(23\)00290-2](http://dx.doi.org/10.1016/s2666-5247(23)00290-2)
38. Ioannou P, Alexakis K, Spentzouri D, Kofteridis DP. Infective endocarditis by *Serratia* species: a systematic review [Internet]. Vol. 34, Journal of Chemotherapy. 2022 [cited 2024 Jun 7]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/1120009x.2022.2043513>
39. Liu H, Zhao Z, Xue Y, Ding K, Xue Q. Fatal cases of *Citrobacter freundii* septicemia and encephalitis in sheep. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation [Internet]. 2018 [cited 2024 Jun 7];30(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/1040638717731090>
40. Jamil R, Foris L, Snowden J. StatPearls Content Is King. 2024; 2023.

49. Drawz SM, Papp-Wallace KM, Bonomo RA. New β -lactamase inhibitors: A therapeutic renaissance in an MDR world. Vol. 58, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014.
50. Werth B. Monobactámicos [Internet]. 2022 [cited 2024 Jun 2]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-pe/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-y-fármacos-antibacterianos/monobactámicos>
51. Khanna NR, Gerriets V. Beta-Lactamase Inhibitors [Internet]. 2022 [cited 2024 Jun 2]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32491524/>
52. Carcione D, Siracusa C, Sulejmani A, Leoni V, Intra J. Old and new beta-lactamase inhibitors: Molecular structure, mechanism of action and clinical use. Vol. 10, Antibiotics. 2021.
53. The Review on Antimicrobial Resistance. The Review on Antimicrobial Resistance. <https://Amr-ReviewOrg/> [Internet]. 2016 [cited 2024 Jun 7]; (May). Available from: https://www.wipo.int/edocs/mdocs/mdocs/en/wipo_who_wto_ip_ge_16/wipo_who_wto_ip_ge_16_www_356156.pdf
54. Lambert PA. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. Vol. 57, Advanced Drug Delivery Reviews. 2005.
55. Sugawara E, Kojima S, Nikaido H. *Klebsiella pneumoniae* major porins OmpK35 and OmpK36 Allow more efficient diffusion of β -lactams than their *Escherichia coli* homologs OmpF and OmpC. J Bacteriol. 2016;198(23).
56. Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases [Internet]. Vol. 62, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2018 [cited 2024 Jun 7]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01076-18>
57. Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, Zidan BRM, Mitra S, Emran T Bin, *et al.* Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects [Internet]. Vol. 14, Journal of Infection and Public Health. 2021 [cited 2024 Jun 7]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>

58. Iredell J, Brown J, Tagg K. Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*: Mechanisms and clinical implications [Internet]. Vol. 352, BMJ (Online). 2016 [cited 2024 Jun 7]. Available from: <https://www.bmj.com/content/352/bmj.h6420>
59. Fisher J, Mobashery S. Three Decades of the Class A Betalactamase Acyl-Enzyme. *Curr Protein Pept Sci*. 2009;10(5).
60. He Y, Lei J, Pan X, Huang X, Zhao Y. The hydrolytic water molecule of Class A β -lactamase relies on the acyl-enzyme intermediate ES* for proper coordination and catalysis. *Sci Rep*. 2020;10(1).
61. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance [Internet]. Vol. 8, Journal of Intensive Care. 2020 [cited 2024 Jun 7]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>
62. Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria [Internet]. Vol. 65, Annual Review of Microbiology. 2011 [cited 2024 Jun 7]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102911>
63. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. Vol. 3, *Frontiers in Microbiology*. 2012.
64. Zhu M, Yang G, Li A, Zong L, Dong Z, Lu J, *et al*. Identification and molecular characterization of *Escherichia coli blaSHV* genes in a Chinese teaching hospital. *Gene*. 2017;600.
65. Ghasemnejad A, Doudi M, Amirmozafari N. The role of the *blaKPC* gene in antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Microbiol*. 2019;11(4).
66. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Molecular and genetic decoding. Vol. 22, *Trends in Microbiology*. 2014.
67. Schwaber MJ, Lev B, Israeli A, Solter E, Smollan G, Rubinovitch B, *et al*. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a Nationally Implemented Intervention. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;52(7).

68. Garau G, Di Guilmi AM, Hall BG. Structure-based phylogeny of the metallo- β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(7).
69. Lisa MN, Palacios AR, Aitha M, González MM, Moreno DiM, Crowder MW, *et al*. A general reaction mechanism for carbapenem hydrolysis by mononuclear and binuclear metallo- β -lactamases. *Nat Commun* [Internet]. 2017 [cited 2024 Jun 7];8(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00601-9>
70. Urmi UL, Nahar S, Rana M, Sultana F, Jahan N, Hossain B, *et al*. Genotypic to phenotypic resistance discrepancies identified involving β -lactamase genes, *blaPC*, *blaIMP*, *blaNDM-1*, and *blaVIM* in uropathogenic *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Drug Resist*. 2020;13.
71. KK S, Ekedahl E, Hoang NTB, Sewunet T, Berglund B, Lundberg L, *et al*. High diversity of blaNDM-1-encoding plasmids in *Klebsiella pneumoniae* isolated from neonates in a Vietnamese hospital. *Int J Antimicrob Agents*. 2022;59(2).
72. Mauri C, Maraolo AE, Di Bella S, Luzzaro F, Principe L. The revival of aztreonam in combination with avibactam against metallo- β -lactamase-producing gram-negatives: A systematic review of in vitro studies and clinical cases. Vol. 10, *Antibiotics*. 2021.
73. D'Angelo R, Johnson J, Bork J, Heil E. Treatment options for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC-producing bacteria [Internet]. Vol. 17, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2016 [cited 2024 Jun 7]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1517/14656566.2016.1154538>
74. Coskun S, Altanlar N. AmpC Beta-lactamases. *Ankem Dergisi*. 2012;26(4).
75. Martínez D. Artículo de revisión Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedade Venezolana de Microbiología* [Internet]. 2009 [cited 2024 Jun 7]; Available from: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000200003&lng=es
76. Coolen JPM, Den Drijver EPM, Kluytmans JAJW, Verweij JJ, Lamberts BA, Soer JACJ, *et al*. Development of an algorithm to discriminate between plasmid- and chromosomal-mediated AmpC β -lactamase production in *Escherichia coli* by elaborate phenotypic and genotypic characterization. *Journal of Antimicrobial*

- Chemotherapy [Internet]. 2019 [cited 2024 Jun 7];74(12). Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkz362>
77. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases. Vol. 33, Clinical Microbiology Reviews. 2020.
 78. Treviño N, Molina NB. Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana. Material de cátedra correspondiente a la clase: Generalidades de Bacteriología [Internet]. 2022 [cited 2024 Jun 7]. Available from: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/136280/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1
 79. El Aila NA, Al Laham NA, Ayesb BM. Prevalence of extended spectrum beta lactamase and molecular detection of *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*CTX-M genotypes among Gram negative bacilli isolates from pediatric patient population in Gaza strip. BMC Infect Dis [Internet]. 2023 [cited 2024 Jun 7];23(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-023-08017-1>
 80. Ramírez J. Métodos Fenotípicos Para la Detección de Mecanismos de Resistencia en *Enterobacterales*. Instituto Nacional de Salud. Lima;
 81. INS Perú. Protocolo del Test Bioquímico de Blue-Carba para la detección rápida de carbapenemasas [Internet]. 2021 [cited 2024 Jun 3]. Available from: <https://youtu.be/ajY9okEjPuU>
 82. Jia L, Han L, Cai HX, Cui ZH, Yang RS, Zhang RM, *et al.* AI-Blue-Carba: A Rapid and Improved Carbapenemase Producer Detection Assay Using Blue-Carba With Deep Learning. Front Microbiol [Internet]. 2020 [cited 2024 Jun 7];11. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.585417>
 83. Polsfuss S, Bloemberg G V., Giger J, Meyer V, Böttger EC, Hombach M. Practical approach for reliable detection of AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol [Internet]. 2011 [cited 2024 Jun 7];49(8). Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00404-11>
 84. Ratna AK, Menon I, Kapur I, Kulkarni R, Kurahatti RA. Occurrence & detection of AmpC β -lactamases at a referral hospital in Karnataka. Indian Journal of Medical Research. 2003;117(JULY).

85. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse Carbapenemase producers directly from bacterial cultures [Internet]. Vol. 51, Journal of Clinical Microbiology. 2013 [cited 2024 Jun 7]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01634-13>
86. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. Vol. 69, BioTechniques. 2020.
87. Sacsquispe R, Ventura G. Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias. Instituto Nacional de Salud. 2002;5–109.
88. García E, Gómez L, Rodríguez F. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. 2017 [cited 2024 Jun 7]; Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
89. Lewis JS, Mathers AJ, Bobenchik AM, Bryson AL, Campeau S, Cullen SK, *et al.* M100Ed34 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 34th Edition. A CLSI supplement for global application. 2024;
90. Lutgring JD, Zhu W, De Man TJB, Avillan JJ, Anderson KF, Lonsway DR, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of enterobacteriaceae producing oxacillinase-48-like carbapenemases, United States. Emerg Infect Dis. 2018;24(4).
91. Green, R M, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012;33(1).
92. Salazar Garcés DK, Quintero Montaña HP, Loza Sánchez EH, Betancourt Karina I. Infección del tracto urinario y manejo antibiótico en Latinoamérica. Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria PENTACIENCIAS. 2023;5(3).
93. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defenses. Vol. 43, FEMS Microbiology Reviews. 2019.
94. Duffy N, Karlsson M, Reses HE, Campbell D, Daniels J, Stanton RA, *et al.* Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacterales* in

- five US sites participating in the Emerging Infections Program, 2017. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2022;43(11).
95. Cabrera R, Día R, Carrasco M, Ortiz G. Multirresistencia de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes con infección del tracto urinario adquirida en la comunidad. *Revista Cubana de Medicina General Integral.* 2019;35(1).
 96. García C. Resistencia antimicrobiana [Internet]. Lima; 2018 Apr [cited 2025 Jul 28]. Available from: <https://doi.org/10.33734/diagnostico.v57i2.81>
 97. Bertakis KD, Azari R, Helms LJ, Callahan EJ, Robbins JA. Gender Differences in the Utilization of Health Care Services. *Journal of Family Practice.* 2000;49(2).
 98. Tang KL, Caffrey NP, N  brega DB, Cork SC, Ronksley PE, Barkema HW, *et al.* Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Planet Health.* 2017;1(8).
 99. Wyres K, Holt K. Regional differences in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Vol. 22, *The Lancet Infectious Diseases.* 2022.
 100. Giuffr   M, Geraci DM, Bonura C, Saporito L, Graziano G, Insinga V, *et al.* The increasing challenge of multidrug-resistant gram-negative bacilli: results of a 5-year active surveillance program in a neonatal intensive care unit. *Medicine (United States).* 2016;95(10).
 101. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. Vol. 10, *Expert Review of Clinical Immunology.* 2014.
 102. Gibson MK, Wang B, Ahmadi S, Burnham CAD, Tarr PI, Warner BB, *et al.* Developmental dynamics of the preterm infant gut microbiota and antibiotic resistome. *Nat Microbiol.* 2016;1(4).
 103. Chiotos K, Hayes M, Gerber JS, Tamma PD. Treatment of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections in Children. Vol. 9, *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society.* 2019.

104. Bonten MJM, Austin DJ, Lipsitch M. Understanding the spread of antibiotic resistant pathogens in hospitals: Mathematical models as tools for control. Vol. 33, Clinical Infectious Diseases. 2001.
105. Ghenea AE, Zlatian OM, Cristea OM, Ungureanu A, Mititelu RR, Balasoiu AT, *et al.* TEM, CTX-M, SHV Genes in ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Samples in a County Clinical Emergency Hospital Romania-Predominance of CTX-M-15. Antibiotics. 2022;11(4).
106. Oteo J, Campos J, Lázaro E, Cuevas Ó, García-Cobos S, Pérez-Vázquez M, *et al.* Increased amoxicillin-clavulanic acid resistance in *Escherichia coli* blood isolates, Spain. Emerg Infect Dis [Internet]. 2008 [cited 2024 Jun 7];14(8). Available from: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1408.071059>
107. Li S, Shen S, Ding L, Han R, Guo Y, Yin D, *et al.* First Report of *bla*CTX-M-167, *bla*SHV-1, and *bla*TEM-1B Carrying *Klebsiella pneumonia* Showing High-Level Resistance to Carbapenems. Front Microbiol. 2022;13.
108. Sader HS, Carvalhaes CG, Arends SJR, Castanheira M, Mendes RE. Aztreonam/avibactam activity against clinical isolates of Enterobacterales collected in Europe, Asia and Latin America in 2019. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2021;76(3).
109. World Health Organization. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022. Vol. 33, Braz Dent J. 2022.
110. García-Betancur JC, Appel TM, Esparza G, Gales AC, Levy-Hara G, Cornistein W, *et al.* Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. Vol. 19, Expert Review of Anti-Infective Therapy. 2021.
111. Otoyá Durand E, García-Mostajo JA, Rivera-Morón P. Tendencia en el consumo de carbapenems en un hospital de asociación público privada. Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo. 2021;14(2).
112. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: A clinical update. Vol. 18, Clinical Microbiology Reviews. 2005.
113. Guet-Revillet H, Emirian A, Groh M, Nebbad-Lechani B, Weiss E, Join-Lambert O, *et al.* Pharmacological study of cefoxitin as an alternative antibiotic therapy to

- carbapenems in treatment of urinary tract infections due to extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(8).
114. Tamma PD, Doi Y, Bonomo RA, Johnson JK, Simner PJ. A Primer on AmpC β -Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-resistant World. Vol. 69, *Clinical Infectious Diseases*. 2019.
 115. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. Vol. 59, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015.
 116. Cheong HS, Chung DR, Lee C, Kim SH, Kang CI, Peck KR, *et al*. Emergence of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains co-producing the plasmid-mediated AmpC beta-lactamase DHA-1 and an extended-spectrum beta-lactamase in Korea. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2016;5(1).
 117. Bandyopadhyay S, Bhattacharyya D, Samanta I, Banerjee J, Habib M, Dutta TK, *et al*. Characterization of Multidrug-Resistant Biofilm-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Healthy Cattle and Cattle with Diarrhea. *Microbial Drug Resistance*. 2021;27(11).
 118. Yim G, Kwong W, Davies J, Miao V. Complex integrons containing qnrB4-ampC (blaDHA-1) in plasmids of multidrug-resistant *Citrobacter freundii* from wastewater. *Can J Microbiol*. 2013 Mar;59(2):110–6.
 119. Mata C, Miró E, Mirelis B, Garcillán-Barcia MP, De La Cruz F, Coll P, *et al*. *In vivo* transmission of a plasmid coharbouring blaDHA-1 and qnrB genes between *Escherichia coli* and *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;308(1):24–8.
 120. Poirel L, Lartigue MF, Decousser JW, Nordmann P. ISEcp1B-mediated transposition of blaCTX-M in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(1).
 121. Lartigue MF, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring β -lactamase gene blaCTX-M of *Kluyvema ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(4).

122. Lazarus JE, Wang Y, Waldor MK, Hooper DC. Divergent genetic landscapes drive lower levels of AmpC induction and stable de-repression in *Serratia marcescens* compared to *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2024;68(1).
123. Cortez-Sandoval V, González R, Ramos D. Detección de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas en carne de pollo de mercados de abasto de un distrito de Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2022;33(3).
124. Lezameta L, Gonzáles-Escalante E, Tamariz JH. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2010;27(3).
125. Ahmad Zahra M, Tasnim Toma T, Nasreen S, Zarin ZTR, Khan ZTSE, Haque FKM. Characterizing the co-existence of metallo- β -lactamase-producing and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in community wastewater samples of Dhaka, Bangladesh. *J Water Health*. 2025 Apr 1;23(4):461–76.
126. Mirza S, Jadhav S, Misra RN, Das NK. Coexistence of β -Lactamases in Community-Acquired Infections in a Tertiary Care Hospital in India. *Int J Microbiol*. 2019;2019.
127. Salvia T, Dolma KG, Dhakal OP, Khandelwal B, Singh LS. Phenotypic Detection of ESBL, AmpC, MBL, and Their Co-occurrence among MDR *Enterobacteriaceae* Isolates. *J Lab Physicians*. 2022;14(03).
128. Mohanty S, Gaiind R, Ranjan R, Deb M. Use of the cefepime-clavulanate ESBL Etest for detection of extended-spectrum beta-lactamases in AmpC co-producing bacteria. *J Infect Dev Ctries*. 2010;4(1).
129. Guerra Carías EI, Valenzuela Acevedo L, Velásquez Porta T. Caracterización de carbapenemasas en enterobacterias de muestras de pacientes que acudieron al Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala durante 2014 y 2015. *Revista Científica*. 2020;29(2).
130. Muñoz C, Zumarán C, González T, Wozniak A, Castillo C, García P. Artículo Original Test evaluation and strategy proposal to detect and to characterize

- carbapenemase-producing gram negative bacilli [Internet]. Santiago; 2017. Available from: www.sochinf.cl
131. Pasteran F, Veliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, Albornoz E, *et al.* Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative Bacilli [Internet]. Vol. 53, Journal of Clinical Microbiology. 2015 [cited 2024 Jun 7]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.03026-14>
 132. García YP, González Y, Filott M, Osorio E, Patiño J, Bettin A, *et al.* *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* coliproductoras de carbapenemasas en instituciones de salud del Caribe colombiano. 2023; 18:15–25. Available from: <https://doi.org/10.18041/2390->
 133. De Laveleye M, Huang TD, Bogaerts P, Berhin C, Bauraing C, Sacré P, *et al.* Increasing incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Belgian hospitals. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2017;36(1).
 134. Ullauri C, Freire S. *Citrobacter freundii* multirresistente como agente etiológico de infección de vías urinarias. Kasma. 2019;47(1).
 135. Yao Y, Falgenhauer L, Falgenhauer J, Hauri AM, Heinmüller P, Domann E, *et al.* Carbapenem-Resistant *Citrobacter* spp. as an Emerging Concern in the Hospital-Setting: Results From a Genome-Based Regional Surveillance Study. Front Cell Infect Microbiol. 2021;11.
 136. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. Vol. 53, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009.
 137. Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, *et al.* Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. Microbiol Spectr. 2018;6(4).
 138. Sánchez Neira Y, Ferrebuz Cardozo AJ, Gonzáles Torres FJ, Urbano Cáceres EX. Genes de resistencia en cepas bacterianas asociadas a infecciones en una institución prestadora de servicios de salud del departamento de Boyacá. Revista Salud Uninorte. 2020;36(2).

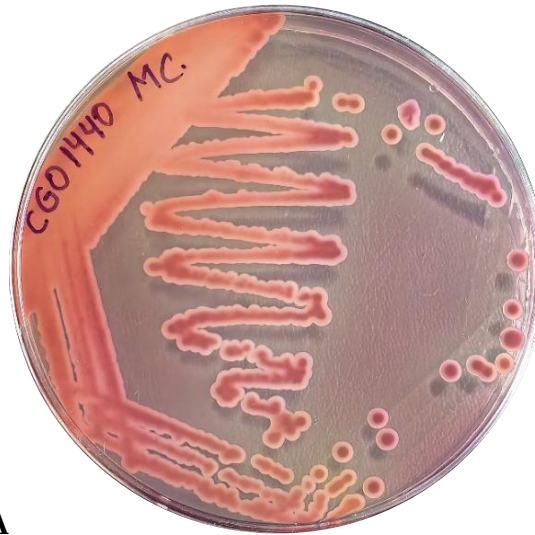
139. Florian S. Frecuencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* con enzimas Ndm, Kpc y/o Oxa-48, en el INEN - Perú, 2019 - 2021 [Internet]. 2024 [cited 2025 Jul 23]. Available from: <https://hdl.handle.net/20.500.14414/21111>
140. Gonzales E, Patiño L, Ore E, Martínez V, Moreno S, Cruzado NB, *et al.* β -lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en el Instituto Nacional de Salud del Niño-Breña, Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*. 2020;30(4).
141. Tian SF, Chu YZ, Chen BY, Nian H, Shang H. ISEcp1 element in association with bla CTX-M genes of *E. coli* that produce extended-spectrum β -lactamase among the elderly in community settings. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011 Dec;29(10):731–4.
142. Hendrickx APA, Landman F, de Haan A, Borst D, Witteveen S, van Santen-Verheuve MG, *et al.* Plasmid diversity among genetically related *Klebsiella pneumoniae* blaKPC-2 and blaKPC-3 isolates collected in the Dutch national surveillance. *Sci Rep*. 2020;10(1).
143. Zaniani FR, Meshkat Z, Nasab MN, Khaje-Karamadini M, Ghazvini K, Rezaee A, *et al.* The prevalence of *tem* and *shv* genes among extended-spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Basic Med Sci*. 2012;15(1).
144. Champi-Merino R, Hurtado-Vilcatoma J, Sierra-Chavez E. Primer Reporte de Aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* Con Doble Carbapenemasa y Resistencia a Colistina en Paciente con COVID-19, Lima-Perú [Internet]. Lima; 2021. Available from: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2021/05/Alerta->
145. Sun S, Cai M, Wang Q, Wang S, Zhang L, Wang H. Emergency of the plasmid co-carrying blaKPC-2 and blaNDM-1 genes in carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2024;36.
146. Piekar M, Álvarez VE, Knecht C, Leguina C, García Allende N, Carrera Páez L, *et al.* Genomic data reveals the emergence of the co-occurrence of blaKPC-2 and blaCTX-M-15 in an *Escherichia coli* ST648 strain isolated from rectal swab within the framework of hospital surveillance. Vol. 32, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2023.

147. Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, Sørensen SJ. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. Vol. 65, FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2012.
148. Tawfick MM, Elshamy AA, Mohamed KT, El Menofy NG. Gut Commensal *Escherichia coli*, a High-Risk Reservoir of Transferable Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance Traits. Infect Drug Resist. 2022;15.
149. Clinical Microbiology Procedures Handbook [Internet]. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2016 [cited 2024 Jun 7]. Available from: <https://doi.org/10.1128/9781555818814.ch3.2.1>
150. Labster. Pasos para realizar la tinción de Gram [Internet]. [cited 2024 Jun 7]. Available from: <https://theory.labster.com/es/steps-gramstain/>

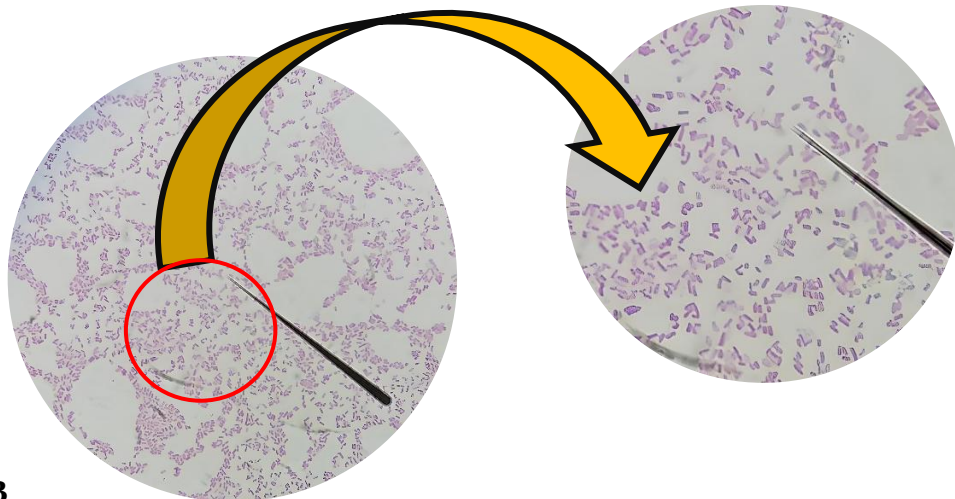
APÉNDICES Y ANEXOS

APÉNDICES

Apéndice 1. Siembra por estría en agar MacConkey (A), coloración Gram (B), algunas pruebas bioquímicas (C)



A



B



C

Apéndice 2. Ficha de recolección de datos para la reactivación, evaluación de pureza y bioquímica de los aislamientos

Nº	Código	Colonias	TSI		Citrato y SIM	LIA	Especie
...	BactCaj-	Gram (...)	TSI (...)	Glucosa (...)	Citrato (...) Movilidad (...) Indol (...)	DcL (...) DaL (...) LIA (...)	
		Pureza (...)	Sacarosa (...)	H_2S (...)			
		Otros (.....)	Gas (...)				
		Lactosa (...)					
...	BactCaj-	Gram (...)	TSI (...)	Glucosa (...)	Citrato (...) Movilidad (...) Indol (...)	DcL (...) DaL (...) LIA (...)	
		Pureza (...)	Sacarosa (...)	H_2S (...)			
		Otros (.....)	Gas (...)				
		LIA (...)					
...	BactCaj-	Gram (...)	TSI (...)	Glucosa (...)	Indol (...) Movilidad (...) Indol (...)	DcL (...) DaL (...) LIA (...)	
		Pureza (...)	Sacarosa (...)	H_2S (...)			
		Otros (.....)	Gas (...)				
		LIA (...)					
...	BactCaj-	Gram (...)	TSI (...)	Glucosa (...)	Citrato (...) Movilidad (...) Indol (...)	DcL (...) DaL (...) LIA (...)	
		Pureza (...)	Sacarosa (...)	H_2S (...)			
		Otros (.....)	Gas (...)				
		LIA (...)					
...	BactCaj-	Gram (...)	TSI (...)	Glucosa (...)	Indol (...) Movilidad (...) Indol (...)	DcL (...) DaL (...) LIA (...)	
		Pureza (...)	Sacarosa (...)	H_2S (...)			
		Otros (.....)	Gas (...)				
		LIA (...)					

Apéndice 3. Ficha de recolección de datos para las pruebas fenotípicas de producción de β -lactamasas

Nº	Código	Especie	ATBM		BC	AmpC	OXA-48
...			CRO	... mm (...)	(...)	Halo (... mm)	Halo (...mm)
			CAZ	... mm (...)	BLEE		
			CTX	... mm (...)	(...)	Condición (...)	Condición (...)
			ATM	... mm (...)			
			AMC	... mm (...)			
...			CRO	... mm (...)	(...)	Halo (... mm)	Halo (...mm)
			CAZ	... mm (...)	BLEE		
			CTX	... mm (...)	(...)	Condición (...)	Condición (...)
			ATM	... mm (...)			
			AMC	... mm (...)			
...			CRO	... mm (...)	(...)	Halo (... mm)	Halo (...mm)
			CAZ	... mm (...)	BLEE		
			CTX	... mm (...)	(...)	Condición (...)	Condición (...)
			ATM	... mm (...)			
			AMC	... mm (...)			
...			CRO	... mm (...)	(...)	Halo (... mm)	Halo (...mm)
			CAZ	... mm (...)	BLEE		
			CTX	... mm (...)	(...)	Condición (...)	Condición (...)
			ATM	... mm (...)			
			AMC	... mm (...)			

ATBM: Antibiógrama, **BC:** Blue carba, **mm:** milímetros, **CRO:** ceftriaxona, **CAZ:** ceftazidima, **CTX:** cefotaxima, **ATM:** aztreonam, **AMC:** amoxicilina/ácido clavulánico

Apéndice 4. Frecuencia de resultados positivos en las pruebas fenotípicas empleadas para la detección de β -lactamasas por especie bacteriana

Especie	Prueba Fenotípica			
	Jarlier	Blue-Carba	DD (FOX)	DD (ETP)
	n	n	n	n
<i>E. coli</i>	45	4	4	2
<i>K. pneumoniae</i>	13	8	9	10
<i>C. freundii</i>	0	0	4	1
<i>Enterobacter</i> sp.	0	0	4	0
<i>P. mirabilis</i>	2	0	1	0
<i>Shigella</i> sp.	1	0	1	0
<i>Salmonella</i> sp.	0	0	2	0
<i>S. marcescens</i>	0	0	2	0
<i>K. oxytoca</i>	0	0	1	0
TOTAL	61	12	28	13

DD: disco difusión, **FOX:** cefoxitina, **ETP:** ertapenem, **n:** frecuencia. Jarlier: para detección de enzimas de clase A. **Blue-Carba:** para detección de enzimas de clase B. **DD (FOX):** para detección de enzimas de clase C. **DD (ETP):** para detección de enzimas de clase D

Apéndice 5. Concordancia de pruebas fenotípicas con las pruebas moleculares para la detección de genes de resistencia a β -lactámicos, por clase

Clase	Técnicas	Frecuencia de Positivos	Proporción verdaderos positivos	Proporción de negativos
A	Jarlier	61	61/61	0/61
	Nº de cepas con al menos un gen de clase A	61	1.00 (100%)	0.00 (0%)
A* y B	Blue-Carba	12	8/12	4/12
	Nº de cepas con genes de clase A* y B	8	0.667 (66.7%)	0.333 (33.3%)
C	DD con cefoxitina	28	10/28	18/28
	Nº de cepas con genes de clase C	10	0.357 (35.7%)	0.643 (64.3%)
D	DD con ertapenem	13	1/13	12/13
	Nº de cepas con gen de clase D	1	0.077 (7.7%)	0.923 (92.3%)

*De la clase A solo fue considerado el gen *bla_{KPC}* por su naturaleza de ser carbapenemasa y por poder ser detectado también por la técnica de Blue-Carba. **DD:** Disco difusión

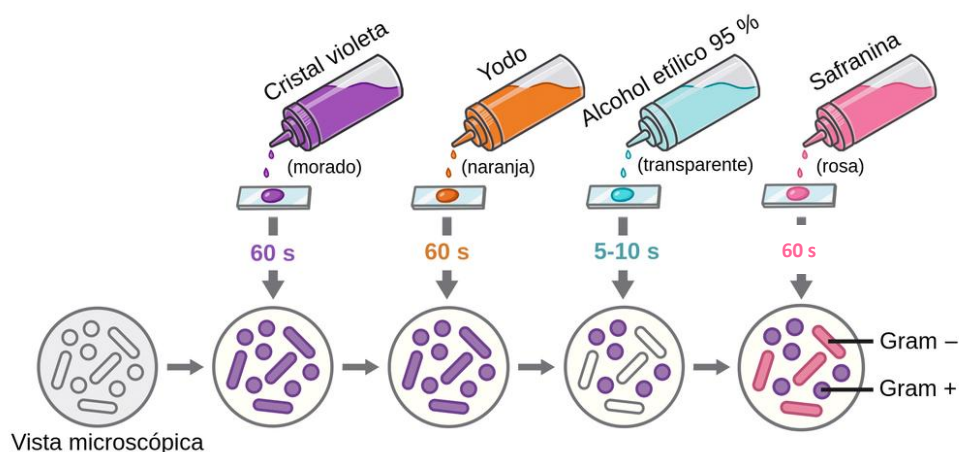
Apéndice 6. Evaluación del grado de significancia de las categorías de investigación frente a la susceptibilidad antimicrobiana encontrada en las especies de Enterobacterales

Categorías			Antibióticos	AMC		ATM		CTX		CRO		CAZ		FOX		ETP		IMP	
				S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
				n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
				102 (64.6)	35 (22.2)	86 (54.4)	49 (31.0)	72 (45.6)	73 (46.2)	81 (51.3)	67 (42.4)	93 (58.9)	31 (19.6)	130 (82.3)	25 (15.8)	143 (90.5)	13 (8.2)	143 (90.5)	15 (9.5)
Sexo	Masculino	121 (76.6)		0.0005		0.042		0.010		0.010		0.001		0.001		0.001		0.001	
	Femenino	31 (19.6)		0.243		0.178		0.217		0.217		0.405		0.293		0.312		0.347	
Especie bacteriana	<i>E. coli</i>	111 (70.3)		0.011		0.043		0.366		0.292		0.043		0.000		0.000		0.001	
	Otros aislamientos	47 (29.7)		0.217		0.182		0.075		0.087		0.182		0.570		0.371		0.356	
Diagnósticos	ITU	130 (82.3)		0.014		0.001		0.023		0.027		0.001		0.001		0.001		0.001	
	Otras infecciones	28 (17.7)		0.203		0.443		0.189		0.191		0.364		0.446		0.550		0.472	
Genes de RAM	<i>bla_{CTX-M}</i>	48 (30.4)		0.487		0.236		0.626		0.007 0.352		0.270		0.066		0.293		0.728	
	<i>bla_{TEM}</i>	19 (12.0)		0.260		0.737		0.499		0.597		0.416		0.812		0.842		0.608	
	<i>bla_{SHV}</i>	14 (8.9)		0.272		0.236		0.061		0.298		0.653		0.519		0.334		0.564	
	<i>bla_{KPC}</i>	5 (3.2)		0.000 0.512		0.395		0.652		0.577		0.111		-		-		-	
	<i>bla_{VIM}</i>	2 (1.2)		0.461		0.488		0.488		0.621		0.429		0.190		0.190		0.488	
	<i>bla_{FOX}</i>	6 (3.8)		0.629		0.708		0.469		0.612		0.964		-		0.910		0.601	
	<i>bla_{DHA}</i>	6 (3.8)		0.349		0.708		0.694		0.907		0.280		-		0.910		0.601	
	<i>bla_{OXA-48}</i>	1 (0.6)		-		0.118		-		-		-		-		-		-	
Grupo etario	Lactantes- niños	22 (15.2)																	
	Adolescentes- jóvenes	34 (23.4)		0.012		0.411		0.033		0.019		0.001		0.001		0.001		0.001	
	Adultos	46 (31.7)		0.296				0.256		0.272		0.355		0.447		0.507		0.479	
	Adultos mayores	43 (29.7)																	
n (%)				p valor V de Cramer		p valor V de Cramer		p valor V de Cramer		p valor V de Cramer		p valor V de Cramer		p valor V de Cramer		p valor V de Cramer		p valor V de Cramer	

AMC: Amoxicilina/ácido clavulánico, **ATM:** aztreonam, **CTX:** cefotaxima, **CRO:** ceftriaxona, **CAZ:** ceftazidima, **FOX:** cefoxitina, **ETP:** ertapenem, **IMP:** imipenem. **S:** sensible, **R:** resistente. **n:** frecuencia

ANEXOS

Anexo 1. Proceso adaptado y modificado de la tinción Gram (149,150)



Anexo 2. Protocolo para la preparación de las soluciones A y B de la prueba de Blue-Carba (81,82)

Protocolo - preparación de soluciones A y B de Blue-Carba

I. Materiales, Equipos y Reactivos

Balanza analítica	Agua destilada estéril (pH 7)
Criovial de 2 mL	Azul de bromotimol
Frasco y vaso de precipitado	HCl a 0.1 M
Peachímetro digital	Imipenem/cilastatina
Perlas de borosilicato	NaOH a 1N
Pipeta de 1 mL y piseta con agua destilada	ZnSO ₄

II. Preparación de 1000 mL de la solución A

- En una balanza analítica, pesar 400 mg de azul de bromotimol. En un vaso de precipitado, agregar 100 mL de agua destilada estéril junto con los 400 mg de azul de bromotimol. Verter las perlas a la mezcla y homogenizar hasta que los grumos desaparezcan.
- Agregar 16 mg de ZnSO₄ y homogenizar lentamente
- Con el peachímetro digital, regular el pH a 7, agregar HCl o NaOH dependiendo del nivel de acidez de la mezcla. Cuando el pH esté en 7, y la coloración de la mezcla sea azulada, la solución A estará preparada. Refrigerar a 4°C hasta el momento de su uso.

III. Preparación de la solución B para evaluación de 10 muestras

- En una balanza analítica, pesar 6 mg de imipenem/cilastatina dentro de un vial estéril.
- Con una pipeta, verter 1000 µL de la solución A al vial con el antibiótico
- Vortexear hasta que el antibiótico se haya disuelto. Verificar la coloración original.

Anexo 3. Protocolos establecidos para la amplificación de los genes de β -lactamasas mediante PCR convencional

Protocolo para la Amplificación de genes de β -lactamasas

I. Materiales y reactivos

Cabina de PCR	Alcohol 70°
Kits de PCR y primers F y R	Agua ultrapura
Material biológico (ADN)	Microtubos de PCR
Micropipetas de 0.5 μ L – 10 μ L, 10 μ L – 100 μ L y de 100 μ L a 1000 μ L	Rack para microtubos
MicroSpin	Termociclador
	Tips de 10 μ L y de 20 - 100 μ L

II. Protocolo de trabajo

Limpiar, desinfectar y uvear la cabina de PCR y el material a utilizar. Encender el termociclador y buscar el programa a utilizar dependiendo del gen a correr.

Preparar el master mix de PCR según lo descrito en el cuadro a continuación

COMPONENTES	PARA 1X (μ L)	[Final]
Agua ultrapura	5.55	-
Kit DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	6.25	-
Primer F y R	0.25 y 0.25	0.1 μ M
Templado de ADN	0.7	-
Volumen total de la reacción	13	-

Dispensar el volumen de Master Mix (12.3 μ L) en los microtubos de PCR. El ADN templado se añade al final. Las condiciones del termociclador se indican en el recuadro a continuación

Gen	Pasos	T°	Tiempo y ciclo	Gen	Pasos	T°	Tiempo y ciclo
<i>bla_{CTX-M}</i>	Desnaturalización	95°	30" x 1	<i>bla_{KPC}</i>	Desnaturalización	95°	30" x 1
	Desnaturalización 2	95°	30" x 35		Desnaturalización 2	95°	30" x 35
	Alineamiento	61°	60" x 35		Alineamiento	50°	45" x 35
	Extensión	68°	30" x 35		Extensión	69°	60" x 35
	Extensión 2	68°	5' x 1		Extensión 2	69°	5' x 1
<i>bla_{TEM}</i>	Desnaturalización	95°	30" x 1	<i>bla_{SHV}</i>	Desnaturalización	95°	2' x 1
	Desnaturalización 2	95°	30" x 35		Desnaturalización 2	95°	20" x 35
	Alineamiento	50°	60" x 35		Alineamiento	55°	30" x 35
	Extensión	68°	90" x 35		Extensión	70°	15" x 35
	Extensión 2	68°	5' x 1		Extensión 2	70°	5' x 1
<i>bla_{DHA}</i>	Desnaturalización	95°	60" x 1	<i>bla_{FOX}</i>	Desnaturalización	95°	60" x 1
	Desnaturalización 2	95°	60" x 35		Desnaturalización 2	95°	60" x 35
	Alineamiento	61°	45" x 35		Alineamiento	61°	45" x 35
	Extensión	68°	60" x 35		Extensión	68°	60" x 35
	Extensión 2	68°	5' x 1		Extensión 2	68°	5' x 1
<i>bla_{IMP}</i>	Desnaturalización	95°	60" x 1	<i>bla_{VIM}</i>	Desnaturalización	95°	60" x 1
	Desnaturalización 2	95°	30" x 35		Desnaturalización 2	95°	30" x 35
	Alineamiento	54°	45" x 35		Alineamiento	58°	45" x 35
	Extensión	69°	50" x 35		Extensión	69°	50" x 35
	Extensión 2	69°	5' x 1		Extensión 2	69°	5' x 1
<i>bla_{OXA-48}</i>	Desnaturalización	95°	30" x 1	Clase A: <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> Clase B: <i>bla_{VIM}</i> , <i>bla_{IMP}</i> Clase C: <i>bla_{DHA}</i> , <i>bla_{FOX}</i> Clase D: <i>bla_{OXA-48}</i>			
	Desnaturalización 2	95°	30" x 35				
	Alineamiento	55°	45" x 35				
	Extensión	69°	60" x 35				
	Extensión 2	69°	5' x 1				

Terminado el ciclado, apretar cancelar el programa, retirar los productos y apagar el equipo. Conservar los amplificados a - 20 °C hasta realizar la electroforesis.

F: Primer forward; **R:** primer reverse; **T°:** temperatura; **desnaturalización 2:** desnaturalización final, **extensión 2:** extensión final; **'**: minutos; **"**: segundos

Anexo 4. Información molecular de genes de resistencia de AmpC tipo *bla_{DHA}* y *bla_{FOX}* en genomas de *Serratia marcescens* del NCBI

Gen	Bacteria	Descripción de la fuente	Número de acceso	URL de NCBI
<i>bla_{DHA}</i>	<i>Serratia marcescens</i>	Gen <i>bla_{DHA}</i> (alele <i>bla_{DHA}-I</i>) de <i>S. marcescens</i> cepa S16A-1, codificante de beta-lactamasa de clase C hidrolizadora de cefalosporinas (cds parcial).	KY400938.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY400938.1
<i>bla_{FOX-5}</i>	<i>Serratia marcescens</i>	Secuencia del genoma completo (WGS) de <i>Serratia marcescens</i> aislado 2025BM-0004, obtenida de un proyecto de secuenciación de patógenos con resistencia antimicrobiana.	ABYOU010000094.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EOX2435799.1