

# BOLETÍN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

<b>ARTRÓPODOS Y HELMINTOS PARÁSITOS DE MAMÍFEROS SILVESTRES (MAMMALIA) DE VENEZUELA: CARNIVOROS (CARNIVORA).</b> Israel Cañizales y Ricardo Guerrero.....	162
<b>CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA GOMA DE SEMILLA DE <i>PROSOPIS JULIFLORA</i> OBTENIDA POR PRECIPITACIÓN CON ETANOL.</b> Fernando Rincón, Carmen Clamens, Olga Beltrán, Rocío Guerrero y Lilian Sanabria.	185
<b>AMPLIFICACIÓN DE GENES <math>BLA_{TEM}</math> Y <math>BLA_{SHV}</math> ASOCIADOS EN LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN AISLADOS CLÍNICOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> BLEE.</b> Judith Chiquinquirá Castro Vargas, Carla Andreina Lossada González, Lenin Andrés González Paz, Lorena Beatriz Atencio de Guínez.....	194
<b>INVENTARIO DE LAS AVES DEL RÍO LA GRITA (MICROCUCENCA SAN JOSÉ), EN LOS ANDES DE TÁCHIRA, VENEZUELA.</b> Steffani C. Olivares, Rosanna Calchi, Daría Pirela, Luis Estela y Anderson Saras.....	210
<b>INSTRUCCIONES A LOS AUTORES.....</b>	220

Vol.51, Nº3, Diciembre 2017

UNA REVISTA INTERNACIONAL DE BIOLOGÍA  
PUBLICADA POR LA  
UNIVERSIDAD DEL ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA



## Amplificación de genes $bla_{TEM}$ y $bla_{SHV}$ asociados en la resistencia antimicrobiana en aislados clínicos de *Escherichia coli* BLEE

Judith Chiquinquirá Castro Vargas<sup>1</sup>, Carla Andreina Lossada González<sup>2</sup>, Lenin Andrés González Paz<sup>1</sup>, Lorena Beatriz Atencio de Guínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética y Biología Molecular, <sup>2</sup>Laboratorio de Citogenética, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, estado Zulia. jhcvdu@gmail.com; lgonzalezpaz@gmail.com

### Resumen

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) representan un problema de salud pública, las BLEE clásicas derivan de betalactamasas con actividad penicilinasas e inhibibles por ácido clavulánico. Por lo que se buscó determinar los perfiles de susceptibilidad a antibióticos de cepas *Escherichia coli* aisladas de urocultivos, así como la presencia de los genes de resistencia  $bla_{TEM}$  y  $bla_{SHV}$  asociados al fenotipo BLEE. Se procesaron 287 muestras a las cuales se les realizaron las pruebas bioquímicas convencionales y la susceptibilidad a los antibióticos se llevó a cabo mediante las recomendaciones del CLSI. Se realizó la extracción de ADN mediante el protocolo de lisis alcalina para la amplificación por PCR de los genes confirmatorios de la especie, y los de los genes de resistencia  $bla_{TEM}$  y  $bla_{SHV}$  asociados al fenotipo BLEE. El 7% de las muestras resultaron positivas para *E. coli* de las cuales 5 fueron productoras de BLEE (24%). En todas las cepas se observaron bandas plasmídicas, encontrando de 1 a 3 bandas cuyos tamaños oscilaron entre 3 y 23kpb. El gen  $bla_{SHV}$  fue el más frecuente (100%), mientras que el gen  $bla_{TEM}$  fue menos prevalente (20%). Se recomienda realizar estudios en diferentes grupos poblacionales para determinar el flujo de genes asociados al fenotipo BLEE en *E. coli* y otros patógenos de interés clínico. Se debe educar al personal médico acerca de este tipo de mecanismos de resistencia y las implicaciones que tiene el uso irracional de antibióticos sobre la diseminación y el problema que representan a nivel de salud pública nacional.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, betalactamasas de espectro extendido, urocultivos, gen  $bla_{TEM}$ , gen  $bla_{SHV}$ .

## Genes *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> involved in antimicrobial resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* esbl

---

### Abstract

Extended-spectrum betalactamases (ESBL) represent a public health problem, classical ESBLs are derived from betalactamases with penicillinase activity and inhibitory to clavulanic acid. The aim of this study was to determine the antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains isolated from urine cultures, as well as the presence of *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> resistance genes associated with the phenotype ESBL. 287 samples were submitted to standard biochemical tests and susceptibility to antibiotics was performed using CLSI recommendations. DNA extraction was performed by the alkaline lysis protocol for PCR amplification of the species confirmatory genes and of the *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> resistance genes associated with the ESBL phenotype. 7% of the samples were positive for *E. coli* of which 5 were ESBL producers (24%). In all strains plasmid bands were observed, finding from 1 to 3 bands whose sizes oscillated between 3 and 23 kbp. The *bla*<sub>SHV</sub> gene was the most frequent (100%), while the *bla*<sub>TEM</sub> gene was less prevalent (20%). Studies are recommended in different population groups to determine the flow of genes associated with the ESBL phenotype in *E. coli* and other pathogens of clinical interest. Medical staff should be educated about these types of resistance mechanisms and the implications of the irrational use of antibiotics on dissemination and the problem they represent at the national public health level.

**Key words:** *Escherichia coli*, extended-spectrum betalactamases, urocultures, gene *bla*<sub>TEM</sub>, gene *bla*<sub>SHV</sub>.

## INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera microbiota normal, pero hay descritos varios grupos de *E. coli* productora de diarrea. La bacteria se puede aislar e identificar tradicionalmente con base en sus características bioquímicas o serológicas, pero también se pueden estudiar sus mecanismos de patogenicidad mediante ensayos en cultivos celulares o modelos animales y, más recientemente, empleando técnicas de biología molecular que evidencian la presencia de genes involucrados en dichos mecanismos (UK Standards for Microbiology Investigations, 2015).

Las infecciones por *E. coli* productoras de betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) han experimentado importantes cambios epidemiológicos en los últimos tiempos, la resistencia adquirida por las bacterias frente a los antibióticos, antisépticos y desinfectantes en la actualidad representa un problema de salud

pública, ya que desde el descubrimiento de los primeros antibióticos los microorganismos han sido capaces de evadir su acción (Rodríguez *et al.* 2015).

La mayoría de cepas BLEE encontradas son del tipo TEM o SHV, siendo las principales BLEE identificadas en enterobacterias como *E. coli* las que pertenecen a la clase molecular A grupo 2be (Esteve *et al.* 2015).

Es por eso, que son consideradas marcadores clínicos importantes y el conocimiento de su incidencia juega un papel importante en la selección del tratamiento apropiado. Los genes codificantes de enzimas tipo BLEE se han detectado en diversas regiones a nivel mundial, y el éxito de su diseminación está relacionado con la ubicación de los genes ( $bla_{SHV}$ ,  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{CTX-M}$ , entre otros) en plásmidos auto transferibles o móviles, los cuales pueden co-transferir a cepas de la misma especie o especies diferentes, resistencia a otros antimicrobianos, aspecto que complica la terapia de algunas infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE (Guzmán *et al.* 2013).

En tal sentido, el objetivo de esta investigación es determinar los perfiles de susceptibilidad a antibióticos de cepas *E. coli* aisladas de urocultivos, así como la presencia de genes de resistencia como el  $bla_{TEM}$  y  $bla_{SHV}$ , quienes están implicados en la producción de infecciones nosocomiales, capaces de causar muertes intrahospitalarias.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestra de estudio

Se evaluaron 287 muestras provenientes de urocultivos de pacientes de los diferentes servicios de un hospital público del estado Zulia, durante el período diciembre 2013 – marzo 2014. La muestra de orina fue colectada por el paciente, en un envase colector plástico estéril, el cual se mantuvo en frío no más de 2 h, el envase se rotuló con el nombre y apellido del paciente, edad, servicio de procedencia e historial clínico, asimismo, se le preguntó si había recibido terapia antibiótica. Fueron procesados según la técnica del asa calibrada (Paz *et al.* 2012). A partir de un crecimiento axénico se realizaron las pruebas para la identificación del género y la especie, empleando las siguientes pruebas bioquímicas: prueba de la oxidasa, fermentación de azúcares, utilización del citrato, producción de enzima ureasa, motilidad, producción de indol, descarboxilación de la ornitina, arginina y de la lisina. Todas las pruebas se leyeron a partir de las 18 h de incubación a 35° C (Murray *et al.* 2015).

## Determinación de fenotipos de susceptibilidad a los antibióticos en las cepas de *E. coli*

Se llevó a cabo utilizando el método de difusión en disco (Baüer et al. 1966). La concentración celular del inóculo de cada cepa bacteriana se preparó en solución salina al 0,9 % o caldo a partir de un cultivo previo ( $35\pm 2^\circ\text{C}$  por 18-24 h de incubación) con una turbidez equivalente al estándar 0,5 de McFarland (documento M100-S23 CLSI, 2016). Se inoculó la cepa por hisopado (en tres direcciones), en placas de Petri con agar Müeller-Hington (HiMedia Laboratories®). Luego se colocaron asépticamente con una pinza estéril los siguientes discos de antibióticos: ampicilina (AMP) (10  $\mu\text{g}$ ), amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) 20/10  $\mu\text{g}$ , cefalotina (CF) 30  $\mu\text{g}$ , cefotaxima (CTX) 30  $\mu\text{g}$ , ceftazidima (CAZ) 30  $\mu\text{g}$ , cefepima (FEP) 30  $\mu\text{g}$ , aztreonam (ATM) 30  $\mu\text{g}$ , meropenem (MEM) 10  $\mu\text{g}$ , imipenem (IPM) 10  $\mu\text{g}$  todos manufacturados por Dispens-O-Disc<sup>TM</sup> susceptibility system tomando en consideración las plantillas sugeridas por el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” para el antibiograma estandarizado. Se incubaron a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  por 18 h en aerobiosis (CLSI, 2016).

## Determinación de la producción de $\beta$ -lactamasas

La presencia de BLEE se determinó fenotípicamente mediante el método del doble disco mediante la observación de una distorsión en el halo de inhibición entre los discos de cefotaxima (CTX) 30  $\mu\text{g}$  o ceftazidima (CAZ) 30  $\mu\text{g}$  y cada uno de ellos con ácido clavulánico. Se empleó para esta prueba la cepa control *K. pneumoniae* 70300 positiva para el perfil de resistencia BLEE (CLSI, 2016).

## Extracción de ADN total de las cepas de *E. coli* para el estudio de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>

Se requirió la extracción de ADN total, para ello las cepas fueron crecidas en medio TSB (BD Tryptic Soy Broth) enriquecido con 1 % de glucosa con la finalidad de obtener la mayor cantidad de biomasa. Fueron inoculados 20  $\mu\text{L}$  del cultivo bacteriano, en tubos con 5 mL de caldo TSB + 1 % de glucosa, incubándolas posteriormente 24 h a  $35\pm 2^\circ\text{C}$ . Estos cultivos posteriormente fueron centrifugados a 7.000 g, se descartó el sobrenadante y el *pellet* obtenido fue resuspendido utilizando 500  $\mu\text{L}$  de buffer TE. Seguidamente se realizó una centrifugación a 7.000 g y se descartó el sobrenadante, este paso de lavado con TE fue repetido tres veces. Una vez culminado el procedimiento de lavado, el *pellet* fue resuspendido en 200  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril y llevado a un baño de agua en ebullición durante 17 min, con la finalidad de producir lisis celular. Posteriormente a la ebullición, el microtubo se dejó reposar unos minutos hasta alcanzar temperatura ambiente y luego se procedió a centrifugar nuevamente a 7.000 g durante 5 min. El sobrenadante obtenido de esta centrifugación fue decantado a un nuevo microtubo estéril y almacenado a  $-4^\circ\text{C}$  para su posterior uso en las reacciones de PCR (Rivera 2009).

## Estandarización para la amplificación por PCR a partir del gen *uspA*

Todas las reacciones de estandarización de la PCR para la amplificación del gen *uspA* se llevaron a cabo en un volumen total de 25  $\mu\text{L}$  conteniendo: Buffer para polimerasa +  $\text{MgCl}_2$  (1X); dinucleótidos trifosfatos (0.2  $\mu\text{M}$ ) y Taq polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ ) (Martineau *et al.* 2000; Ausbel *et al.* 2002). La estandarización estuvo centrada en la variación de la concentración de los cebadores (0,2  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ , ver secuencias en tabla 2) vs la cantidad óptima del ADN extraído de las cepas en estudio: 0,5  $\mu\text{L}$  del ADN total extraído sin diluir, 0,5  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:10 o 2,5  $\mu\text{L}$  de esta misma dilución del ADN (Tabla 1). Los reactivos de la PCR utilizados fueron manufacturados por la casa comercial Thermo Fisher Scientific Inc., mientras que los cebadores fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc. A partir de la estandarización se realizaron las amplificaciones de los genes señalados en la tabla 2.

**Tabla 1. Reacciones de PCR con variaciones en las concentraciones de primers y de ADN utilizados.**

ADN Primers	0,5 $\mu\text{L}$ de ADN Total	0,5 $\mu\text{L}$ dilución $10^{-1}$ de ADN Total	2,5 $\mu\text{L}$ dilución $10^{-1}$ de ADN Total
<b>0,2<math>\mu\text{M}</math></b>	Rx1	Rx2	Rx3
<b>1<math>\mu\text{M}</math></b>	Rx4	Rx5	Rx6

Fuente: Fernández (2010).

## Identificación de *E. coli* por análisis del *uspA*

Luego de la estandarización de la reacción de la PCR para el gen *uspA*, el protocolo fue aplicado a todas las cepas en estudio para confirmar molecularmente la identificación taxonómica bacteriana. En este sentido, la obtención de un amplión mayor a 700 kbp. (Tabla 2) fue el criterio de confirmación de *E. coli*, como lo señala Clausen (2012).

**Tabla 2. Cebadores utilizados para la PCR.**

Genes	Secuencia del cebador	Tamaño del amplicón (kpb)	Temperatura	Referencia
<i>uspA</i> -F <i>uspA</i> -R	5'-CCGATACGCTGCCAATCAGT-3' 5'-ACGCAGACCGTAGGCCAGAT-3'	>700	58°C 60°C	Chen y Griffiths, (1998)
<i>bla</i> <sub>CTX</sub> -F <i>bla</i> <sub>CTX</sub> -R	5'-TTAATGATGACTCAGAGCATTTC-3' 5'-GATACCTCGCTCCATTTATTG-3'	901	44°C 60°C	Randriani-rina <i>et al.</i> (2009)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> -F <i>bla</i> <sub>TEM</sub> -R	5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA-3' 5'-GACAGTTAGCAATGCTTAATCA-3'	867	52°C 60°C	Gil <i>et al.</i> (2014)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> -F <i>bla</i> <sub>SHV</sub> -R	5'-ATGCGTTATATTGGCCTGTG-3' 5'-AGCGTTGCCAGTGCTCGATG-3'	862	58°C 64°C	Mubarak <i>et al.</i> (2011)

La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador *Applied Biosystem* Modelo PCR 2720, las condiciones generales consistieron en una desnaturalización inicial a 94° C por 5 min seguido de 35 ciclos a 94° C por 2 min, y una extensión final a 72° C por 10 min. Las condiciones de alineamiento fueron 55° C por 1 min para el gen *uspA*, 58° C por 30 seg para los genes *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub>, y 58° C por 30 seg para *bla*<sub>CTX</sub>. La separación y observación de los productos de PCR se realizaron según especificaciones de Ausbel et al. (2002) por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %p/v, en una cámara horizontal con buffer TBE sometida a 103 voltios (95±2 miliamperios) durante 1h. Finalizada la corrida, los geles fueron observados en presencia de luz U.V sobre un transiluminador UVP Chromato – VUE modelo TM-36 de 115 voltios, 60Hz y capacidad de 1,2 amperios, y fotografiado con una cámara digital (Easy Share, Kodak). El tamaño de los productos de PCR se determinó según sus migraciones en los geles de agarosa y comparadas con la migración de las bandas de ADN estándar del marcador de peso molecular  $\lambda$ /HindIII (Promega®, EUA).

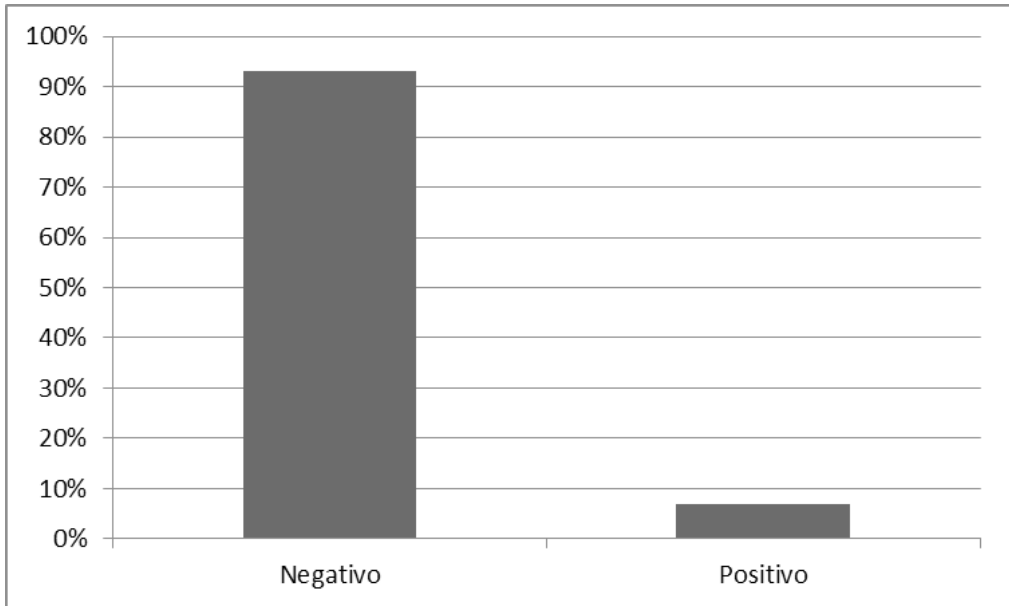
## Análisis de resultados

Se utilizó estadística descriptiva para determinar los porcentajes de cepas positivas para la presencia de los genes de interés. La prueba de chi-cuadrado fue aplicada para determinar diferencias y asociación entre el tipo de cepa y la presencia de los genes. Se hizo una comparación de media de las pruebas de susceptibilidad de cada cepa mediante el T-students, con un nivel de confianza del 99 %. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa *Statgraphics plus* versión 5.1. Los resultados se presentaron además en gráficos porcentuales y tablas de patrones de susceptibilidad. Realizando la discusión y resultados correspondientes, utilizando Microsoft Excel, office 2010.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento de cepas *E. coli* de muestras de Urocultivos

Se demostró la presencia de *E. coli*. A través de las pruebas bioquímicas convencionales (oxidasa, fermentación de azúcares, utilización del citrato, producción de enzima ureasa, motilidad, producción de indol, descarboxilación de la ornitina, arginina y de la lisina), (ver Figura 3) indicaron que de 287 un total de 21 muestras resultaron positivas para *E. coli* que represento el 7 % (Figura 1).



**Figura 1.** Cepas *E. coli* Positivas, representación porcentual.

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran la presencia de cepas *E. coli* confirmadas en muestras de origen clínico provenientes de pacientes de un hospital público del estado Zulia, durante el período diciembre 2013 – marzo 2014. La infección del tracto urinario es una importante causa de sepsis nosocomial y la segunda en la consulta de asistencia médica comunitaria. *E. coli* constituye el principal microorganismo aislado (Khan *et al.* 2013). En su mayoría los investigadores concuerdan en sus estudios que *E. coli* es uno de los principales patógeno aislados (Khan *et al.* 2013; Rodríguez *et al.* 2013; Hernández *et al.* 2014).

### Susceptibilidad a antibióticos

El 100 % de cepas de *E. coli* aisladas fueron resistentes a AMP y 24 % a AMC, en cuanto a la resistencia a cefalosporinas probadas contra los aislados señalados, se halló que las cepas fueron resistentes a: AZT (48 %), CAZ (43 %), FEP (38 %), CF (33 %) y CTX (33 %). De las cepas aisladas, el 48 % presentaron resistencia al ATM, no se encontró resistencia a los carbapenémicos MEM e IMP. El 100 % (Tabla 3 y Figura 2). Los fenotipos de susceptibilidad a antimicrobianos en las cepas señaladas en la tabla 1 mostraron 8 tipos de patrones diferentes siendo los más frecuentes N=1,2 y 5.



**Tabla 3. Patrones de susceptibilidad a antibióticos exhibidos por las cepas de *E. coli***

N	Cepas	Origen	Patrón de susceptibilidad N.	
1	60	CE	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>S</sup> -CTX <sup>S</sup> -CAZ <sup>S</sup> -FEP <sup>S</sup> -ATM <sup>R</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	1
2	117	UBD	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>S</sup> -CTX <sup>S</sup> -CAZ <sup>S</sup> -FEP <sup>S</sup> -ATM <sup>R</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	
3	260	OBST	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>S</sup> -CTX <sup>S</sup> -CAZ <sup>S</sup> -FEP <sup>S</sup> -ATM <sup>R</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	
4	283	UCI	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>S</sup> -CTX <sup>S</sup> -CAZ <sup>S</sup> -FEP <sup>S</sup> -ATM <sup>R</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	
5	6	CE	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>S</sup> -CTX <sup>S</sup> -CAZ <sup>R</sup> -FEP <sup>S</sup> -ATM <sup>S</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	2
6	21	CE	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>S</sup> -CTX <sup>S</sup> -CAZ <sup>R</sup> -FEP <sup>S</sup> -ATM <sup>S</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	
7	193	UBD	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>S</sup> -CTX <sup>S</sup> -CAZ <sup>R</sup> -FEP <sup>S</sup> -ATM <sup>S</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	
8	201	CE	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>S</sup> -CTX <sup>S</sup> -CAZ <sup>R</sup> -FEP <sup>S</sup> -ATM <sup>S</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	
9	17	CE	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>S</sup> -CTX <sup>S</sup> -CAZ <sup>S</sup> -FEP <sup>R</sup> -ATM <sup>S</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	3
10	35	CE	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>S</sup> -CTX <sup>S</sup> -CAZ <sup>S</sup> -FEP <sup>R</sup> -ATM <sup>S</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	
11	119	CE	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>S</sup> -CTX <sup>S</sup> -CAZ <sup>S</sup> -FEP <sup>R</sup> -ATM <sup>S</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	
12	43	OBST	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>S</sup> -CTX <sup>R</sup> -CAZ <sup>S</sup> -FEP <sup>S</sup> -ATM <sup>S</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	4
13	197	MI	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>S</sup> -CTX <sup>R</sup> -CAZ <sup>S</sup> -FEP <sup>S</sup> -ATM <sup>S</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	
14	115	MI	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>R</sup> -CF <sup>R</sup> -CTX <sup>R</sup> -CAZ <sup>R</sup> -FEP <sup>R</sup> -ATM <sup>R</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	5
15	121	UCI	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>R</sup> -CF <sup>R</sup> -CTX <sup>R</sup> -CAZ <sup>R</sup> -FEP <sup>R</sup> -ATM <sup>R</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	
16	191	MI	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>R</sup> -CF <sup>R</sup> -CTX <sup>R</sup> -CAZ <sup>R</sup> -FEP <sup>R</sup> -ATM <sup>R</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	
17	270	UCI	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>R</sup> -CF <sup>R</sup> -CTX <sup>R</sup> -CAZ <sup>R</sup> -FEP <sup>R</sup> -ATM <sup>R</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	
18	286	MI	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>R</sup> -CF <sup>R</sup> -CTX <sup>R</sup> -CAZ <sup>R</sup> -FEP <sup>R</sup> -ATM <sup>R</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	
19	30	CE	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>R</sup> -CTX <sup>S</sup> -CAZ <sup>S</sup> -FEP <sup>S</sup> -ATM <sup>R</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	
20	145	MI	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>S</sup> -CTX <sup>S</sup> -CAZ <sup>S</sup> -FEP <sup>S</sup> -ATM <sup>S</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	7
21	210	UCI	AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> -CF <sup>S</sup> -CTX <sup>S</sup> -CAZ <sup>S</sup> -FEP <sup>R</sup> -ATM <sup>R</sup> -MEM <sup>S</sup> -IPM <sup>S</sup>	8

Abreviaturas: Ampicilina 10 µg (AMP); Amoxicilina/Ácido Clavulánico 20/10 µg (AMC); Cefalotina 30 µg (CF); Cefoxitina 30 µg; (CTX); Cefotaxidima 30 µg (CAZ); Cefepima 30 µg (FEP); Aztreonam 30 µg (ATM); Meropenem 10 µg (MEM); Imipenem 10 µg (IPM); Unidad de cuidados intensivos (UCI); Medicina Interna (MI); Consulta Externa (CE); Obstetricia (OBST); Unidad Bolivariana de Diálisis (UBD); Resistente (R); Susceptible (S).

Con respecto a la resistencia a penicilinas halladas en este estudio (Tabla 3) con un 100 % a AMP y 24 % a AMC, según la literatura, los datos obtenidos concuerdan con varios autores quienes señalan que se ubica por encima del 50 % (Khan et al. 2013; Rodríguez et al. 2013) e incluso en algunos casos hasta casi el 100 % (Hackman et al. 2013; Malhotra et al. 2016).

Además de esto, el patrón de multirresistencia a cefalosporinas se ha observado en diversos estudios, además los autores refieren que su utilización sigue siendo recomendada sugiriendo que deben adaptarse las modalidades de administración de acuerdo al blanco farmacológico (Rodríguez et al. 2013; Suárez 2015). Por otro lado, se han encontrado diferencias entre los porcentajes de resistencia a los monobactámicos con valores más bajos a los presentados por este estudio que han sido reportados por McWilliams et al. (2014) y Villalobos et al. (2014), quienes

encontraron 10 % y 25 % de resistencia respectivamente en muestras de aislados clínicos. Mientras que valores de susceptibilidad a carbapenémicos al igual que en este estudio, ha sido documentada por muchos autores para *E. coli* en aislados clínicos de pacientes con ITU (Khan *et al.* 2013; Rodríguez *et al.* 2013; Hernández *et al.* 2014; Suárez 2015).

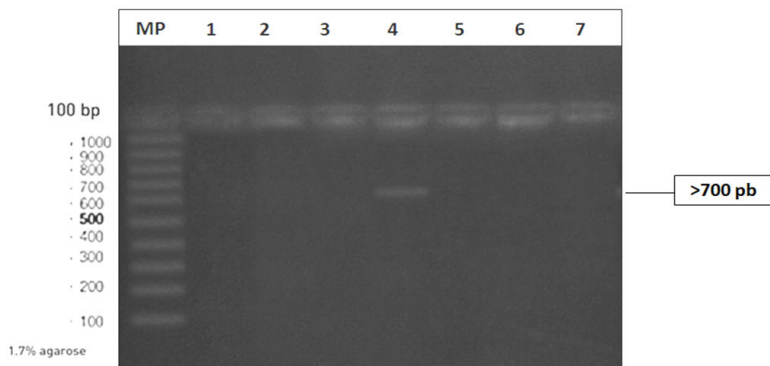
Por su parte, la aparición de cepas de *E. coli* BLEE ha ido en aumento en los últimos años a nivel mundial, sin embargo, valores por debajo de los encontrados (Tabla 3) en esta investigación han sido reportados en Suecia con frecuencias que oscilan entre 0,2 - 2,5 % (Helldal *et al.* 2013), en Estados Unidos con 3,9 % (Doi *et al.* 2013) y en España reportes de 3,9- 8,7 % (Rodríguez *et al.* 2013). En otros países la presencia de estas cepas es más alta, por ejemplo, en la India 21,4 % (Datta *et al.* 2014); y Colombia 54 % (Blanco *et al.* 2016) mientras que en otro estudio en Maracaibo, donde se analizaron un total de 3.883 cepas bacterianas de muestras clínicas, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, de las cuales 1.761 de ellas fueron cepas de *E. coli* 45,35 % (Perozo *et al.* 2009).

### Estandarización para la amplificación por PCR a partir del gen *uspA*

Se realizaron seis reacciones con un volumen final de 25  $\mu$ L, las cuales presentaban variaciones en las concentraciones de ADN y de los primers. Los resultados arrojados para la estandarización reflejan que de acuerdo a las reacciones realizadas en base a la Tabla 1 la reacción adecuada fue la Rx3 (Tabla 4 y Figura 2), la cual permitió una visualización más nítida del gel de agarosa para ello se utilizaron las concentraciones propuestas por Martineau *et al.* (2000). Por cada reacción se tomaron 2,5  $\mu$ L de Buffer más  $MgCl_2$  (1x), 0,25  $\mu$ L de Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L de la mezcla de di-nucleótidos trifosfato (0.2 $\mu$ M), 0,5  $\mu$ L de cada primer -R 1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ L de cada primer -F (1  $\mu$ M) más un volumen de 2.5  $\mu$ L de ADN  $\times 10^{-1}$  con agua desionizada libre de ADNsas y ARNsas hasta llegar a un volumen total de 25  $\mu$ L.

**Tabla 4. Concentraciones y volúmenes utilizados de cada reactivo para la reacción de PCR N° 3 (Rx3)**

Reactivo	Volumen/Concentración	
Buffer + $MgCl_2$	2,5 uL	1X
DNTP Mix	2 uL	0.2 uM
Primer- <i>uspA</i> -F	0,5 uL	1 uM
Primer- <i>uspA</i> -R	0,5 uL	1 uM
Taq polimerasa	0,25 uL	5 U/uL
ADN	2,5 uL	Dilución 1:10 en $H_2O$ libre de ADNsas y ARNsas
$H_2O$ desionizada	16,75 uL	
Volumen final:	25 uL	

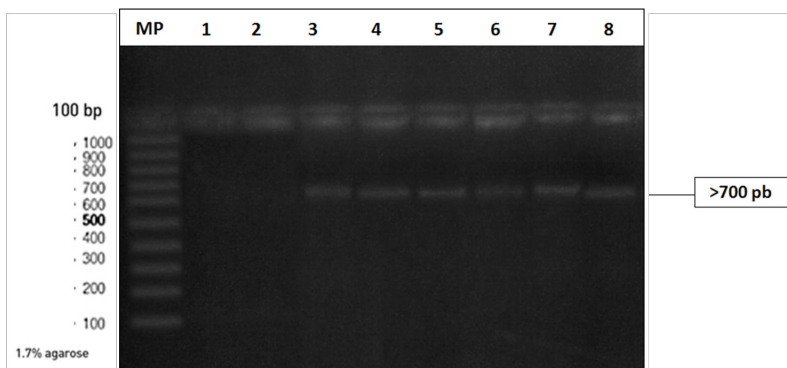


**Figura 2.** Estandarización de PCR del Gen *uspA* de la cepa control *Escherichia coli* ATCC®25922. Abreviaturas: MP, marcador de peso molecular; carril 1, reacción sin ADN; carril 2-7, reacciones con variaciones en las concentraciones de primer y de ADN utilizados (Fuente: propia).

El carril 4 corresponde a la reacción 3 cuyas concentraciones fueron las adecuadas para la reacción de PCR, a partir de esta estandarización se realizaron las amplificaciones de los genes en estudio cuya secuencia de cebadores se observa en la Tabla 2.

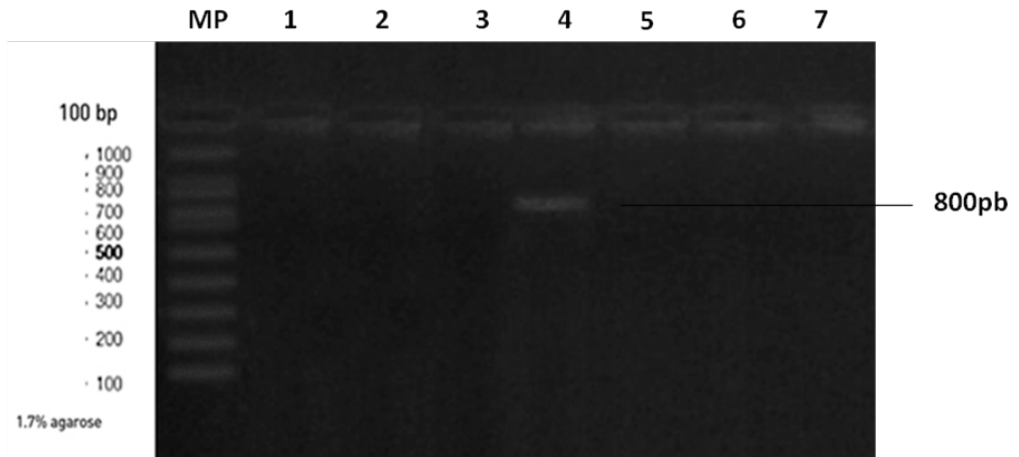
### Amplificación del gen *uspA*

La amplificación del Gen *uspA* confirmó qué aislamientos obtenidos pertenecían al género y la especie de *Escherichia coli* (Figura 3). La banda de 700 pb indicó la amplificación de una región altamente conservada del Gen *uspA* que confirman lo obtenido por las pruebas bioquímicas.

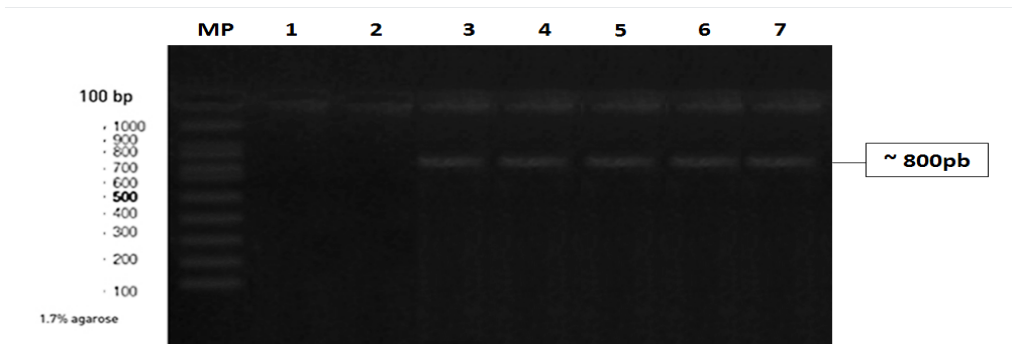


**Figura 3.** Amplificación por PCR del gen *uspA*. Abreviaturas: MP (Marcador de Peso Molecular); Carril 1: reacción sin ADN; Carril 2: control negativo (*S. aureus*); Carril 3: control positivo (*E. coli* ATCC®25922); Carril 4-8: cepas 115-121-191-270-286 (Fuente: propia).

Una vez estandarizadas las condiciones de la PCR, se procedió a amplificar los genes  $bla_{TEM}$  (Figura 4), sólo una cepa fue positiva para el gen  $bla_{TEM}$  (1/5; 121; 20 %) con un peso molecular equivalente a 800 pb (Figura 6), el gen  $bla_{SHV}$  estuvo presente en todas las cepas (100 %) (Figura 5 y 6).



**Figura 4.** Amplificación por PCR del gen  $bla_{TEM}$ . Abreviaturas: MP (Marcador de Peso Molecular); Carril 1: reacción sin ADN; Carril 2: control negativo; Carril 3-7: cepas 115-121-191-270-286 (Fuente propia).



**Figura 5.** Amplificación por PCR del gen  $bla_{SHV}$ . Abreviaturas: MP (Marcador de Peso Molecular); Carril 1: reacción sin ADN; Carril 2: control negativo; Carril 3-7: cepas 115-121-191-270-286 (Fuente propia).

En un estudio realizado por Hernández (2014) en Mérida, Venezuela, los ensayos de amplificación por PCR permitieron detectar en la mayoría de las cepas (20/21) la presencia de la  $\beta$ -lactamasas CTX-M-1. El análisis de la secuencia del producto amplificado reveló la variante  $bla_{CTX-M-15}$ , con un grado de identidad del 99 % correspondiente a la secuencia de referencia Genbank No. AY044436. Sólo una

cepa (ECUP22) fue portadora de BLEE tipo SHV. A diferencia de este estudio donde todas las cepas fueron portadoras de este gen. En relación a las diferentes combinaciones de BLEE, 5 cepas mostraron la asociación de por lo menos 2 tipos de  $\beta$ -lactamasas:  $bla_{CTX-M-15} + bla_{TEM-1}$ ,  $bla_{CTX-M-15} + bla_{SHV}$  (2/21; 9,52 %, respectivamente) y  $bla_{SHV} + bla_{TEM-1}$  (1/21; 4,76 %), mientras que en el resto de las cepas de ECUP el patrón genotípico de BLEE estuvo representado por un único gen  $bla_{CTX-M-15}$  (16/21; 76,19%). En este estudio solo hubo asociación significativa ( $P < 0,005$ ) de  $bla_{SHV} + bla_{TEM}$  en una de las cepas (1/5; 121; 20 %).

Seyedjavad et al. (2016) en su investigación, la PCR indicó que las cepas productoras de BLEE presentaban genes  $bla_{CTX-M}$  que fueron los más frecuentes (74 %), seguido por  $bla_{TEM}$  (67 %) y, finalmente,  $bla_{SHV}$  (45 %). 45% de 100 aislamientos llevan más de un tipo de genes de  $\beta$ -lactamasas, se detectó Co-existencia de la  $bla_{CTX-M}$  y  $bla_{TEM}$  en 22 aislamientos (22 %),  $bla_{CTX-M}$  y  $bla_{SHV}$  en 12 aislamientos (12 %),  $bla_{TEM}$  y  $bla_{SHV}$  en 8 aislamientos (8 %). Las bacterias son particularmente eficientes en potenciar los efectos de la resistencia, no sólo por su habilidad de multiplicarse rápidamente; sino también, por su capacidad de transferir genes de resistencia a otras cepas o especies. Las bacterias resistentes son capaces de diseminarse fácilmente entre la población, y particularmente, en ambientes donde el uso masivo de antimicrobianos y la presencia de pacientes debilitados (hospitalizados), hacen que la diseminación sea un fenómeno común (Perozo et al. 2009).

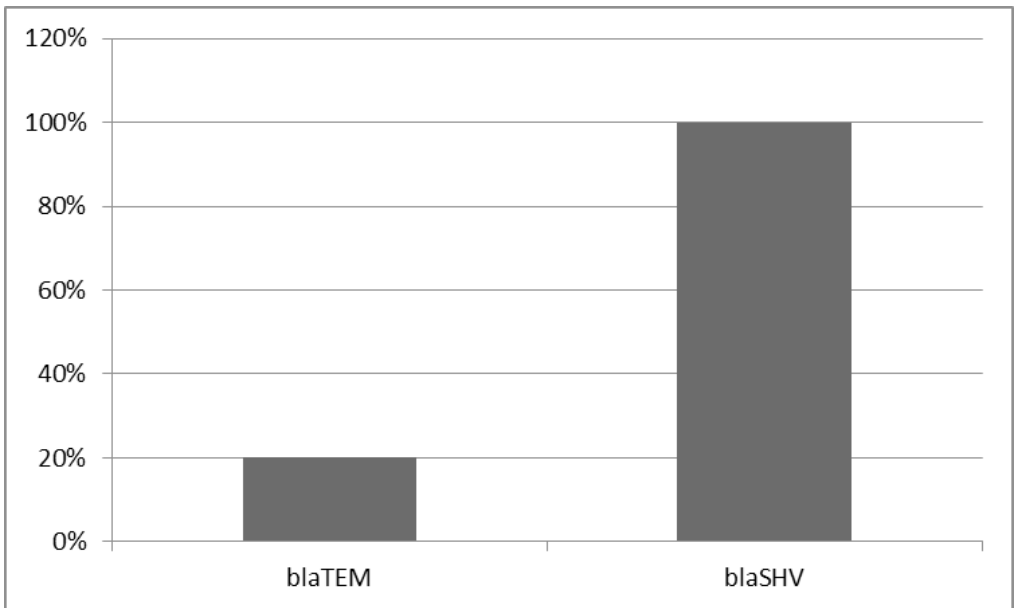


Figura 6. Tipos de BLEE detectados en las muestras clínicas de *E. coli* (Fuente propia).

Los genes que codifican para  $\beta$ -lactamasas son probablemente los más distribuidos a nivel mundial. El gen blaTEM es uno de los más frecuentemente aislados (Guzmán *et al.* 2013; Abujnah *et al.* 2015). En este estudio dio positiva la amplificación para determinar la presencia del gen blaTEM en una sola cepa (1/5; 121; 20 %) (Figura 4) con un peso molecular equivalente a 800pb (Figura 6), que presente plásmido con bandas de 3, 10 y >23 kpb con un perfil de resistencia a betalactámicos (Tabla 3), mientras que el gen blaSHV estuvo presente en todas las cepas (100 %) (Figura 6) compartiendo así dos genes de resistencia, además de esto presentan todas las cepas un plásmido en común >23 kpb, siendo por lo tanto probable que exista relación entre el gen blaSHV y este plásmido (Figura 5).

## CONCLUSIONES

Se identificaron cepas de *Escherichia coli* en las muestras de urocultivos provenientes de pacientes de los diferentes servicios de un hospital público del estado Zulia tanto hombres como mujeres con amplio rango de edades. Encontrándose diversos patrones de susceptibilidad a antimicrobianos en las cepas de *E. coli* estudiadas. Destacando la prevalencia de cepas resistentes a ampicilina en todas las muestras analizadas así como patrones de resistencia variable a amoxicilina-ácido clavulánico y a las cefalosporinas probadas, con una sensibilidad marcada frente a carbapenémicos. Si bien se encontró una baja frecuencia de cepas productoras de BLEE, entre las *E. coli* estudiadas, todas las cepas con dicho fenotipo presentaron un perfil de resistencia característico, con el genotipo SHV, seguido de TEM, como los más frecuentes, así como un plásmido en común de gran tamaño. No se encontró el genotipo CTX-M en las cepas estudiadas con fenotipo BLEE. Por lo que se recomienda realizar estudios en diferentes grupos poblacionales para determinar el flujo de genes asociados al fenotipo BLEE que circulan en la región, así como realizar estudios moleculares a un mayor número de muestras, que conlleven a la búsqueda de otros tipos de BLEE, tanto en *E. coli* como en otros patógenos de interés clínico. Se recomienda incorporar en este tipo de estudios protocolos de curado y utilizar compuestos inhibitorios para la eliminación de plásmidos que permitan poder ubicar los determinantes genéticos asociados a la resistencia exhibida por las cepas evaluadas. Se debe educar al personal médico acerca de este tipo de mecanismos de resistencia encontrados y las implicaciones que tiene el uso irracional de antibióticos sobre la diseminación de este tipo de multiresistencia y el problema que representan a nivel de salud pública nacional.

## LITERATURA CITADA

- ABUJNAH, A., A. ZORGANI, M. SABRI, H. EL-MOHAMMADY, R. KHALEK Y K. GHENGESH. 2015. Multidrug resistance and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases genes among *Escherichia coli* from patients with urinary tract infections in Northwestern Libya. *Libyan Journal of Medicine*. 10(1):1-7.

- AUSUBEL F, BRENT R, KINGSTON R, MOORE D, SEIDAM J, SMITH J Y K. STRUHL. 2002. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. Vol. 2. Fifth edition. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- BAÜER, A., KIRBY, M., SHORRIS, J y C. TURK. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. American Journal Pathology. 45(4): 493-496.
- BLANCO, V., M. MAYA, A. CORREA, M. PERENGUEZ, J. MUÑOZ, G. MOTOA, C. PALLARES, F. ROSSO, L. MATTA, Y. CELIS, M. GARZON, Y M. VILLEGAS. 2016. Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. En Prensa. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X15004553>.
- CHEN, J. Y M. GRIFFITHS. 1998. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. Letters in applied microbiology. 27(6): 369-371.
- CLAUSEN, J. 2012. Bacteria Source Tracking Of Pigeon and Cattle Strains of *Escherichia coli* In: A Constructed Stormwater Treatment Wetland. Recipient Organization. Univ of Connecticut. Storrs, Ct 06269.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. USA. M100-S23. 32(3): 48-49.
- DATTA, P., V. GUPTA, S. SIDHU Y J. CHANDER. 2014. Community Urinary Tract Infection due to ESBL producing *Escherichia coli*: epidemiology and susceptibility to oral antimicrobials including Mecillinam. Nepal Journal of Medical Sciences. 3(1): 5-7.
- DOI, Y., Y. SOO, J. RIVERA, J. ADAMS, A. HINGWE, E. SORDILLO, J. LEWIS, W. HOWARD, L. JOHNSON, B. POLSKY, J. JORGENSEN, S. RICHTER, K. SHUTT, Y D. PATERSON. 2013. Community-Associated Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Infection in the United States. Clinical Infectious Diseases. 56(5): 641-648.
- ESTEVE, E., G. SOLANDE, F. SÁNCHEZ, L. SORLÍ, M. MONTERO, R. GÜERRI Y J. HORCAJADA. 2015. Clinical and economic impact of urinary tract infections caused by ESBL-producing *Escherichia coli* requiring hospitalization: a matched cohort study. Journal of Infection. 71(6): 667-674.
- FERNÁNDEZ, R. 2010. Determinación de genes de resistencia a antimicrobianos *mecA* Y *bla*Z en *Staphylococcus aureus* aislados en el estado Zulia. Trabajo Especial de Grado, Dpto. de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Univ. del Zulia, Maracaibo, 87 pp.
- GIL, Z., J. NÚÑEZ, E. BENEVIDEZ Y E. LÓPEZ. 2014. Detección de los genes SHV, TEM Y CTX-M en cepas de *Escherichia coli*  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo-Perú. Revista del cuerpo médico del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo. 7(3): 27-30.

- GUZMÁN, M., E. RODRÍGUEZ, K. ANTÓN, S. SILVA, J. NAVARRO, L. LASTRA, E. SALAZAR Y G. ALONSO. 2013. Genes bla<sub>TEM</sub>, bla<sub>SHV</sub> y bla<sub>CTX-M</sub> en enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria. *Investigación Clínica*. 54(3): 235 – 245.
- HACKMAN, H., G. OSEI, A. GORDON, E. LARYEA, S. QUAYE, L. ANISON, Y K. BU. 2013. Phenotypic Characterization of AmpC beta-lactamase among Cefoxitin Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Accra. Ghana. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 3(16): 102-105.
- HELLDAL, L., N. KARAMI, K. FLOREN, C. WELINDER, E. MOORE Y C. AHREN. 2013. Shift of CTX-M genotypes has determined the increased prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in south-western Sweden. *Clinical Microbiology and Infection*. 19(2): 87-90.
- HERNÁNDEZ, C., V. BLANCO, G. MOTOA, A. CORREA, J. MAYA, E. DE LA CADENA, M. PERENGUEZ, L. ROJAS, A. HERNÁNDEZ, M. VALLEJO Y M. VILLEGAS. 2014. Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica*. 34(1): 91-100.
- KHAN, F., S. AHSAN Y S. KABIR. 2013. Antibiotic resistance patterns of pathogenic Gram negative bacteria isolated from UTI patients in Sirajganj district. *Standford Journal of Microbiology*. 3(1): 17-20.
- MALHOTRA, R., R. SIKKA Y U. CHAUDHARY. 2016. Antimicrobial sensitivity pattern among clinical isolates of *Escherichia coli* in tertiary care centre of Northern India. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 4(2): 639-642.
- MARTINEAU, F., F. PICARD, L. GRENIER, P. ROY, M. OUELLETTE Y M. BERGERON. 2000. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46(4): 527-533.
- MCWILLIAMS, C., S. CONDON, R. SCHWARTZ Y C. GINOCCHIO. 2014. Incidence of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* that test susceptible to cephalosporins and aztreonam using the revised CLSI breakpoints. *Journal of Clinical Microbiology*. 54(2): 1-14.
- MUBARAK, S., H. ELKOUSH Y A. ALSHEHHI. 2011. Molecular Characterization and Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the United Arab Emirates. *Medical Principles and Practice*. 20(2): 177-180.
- MURRAY, P., K. ROSENTHAL Y M. PFALLER. 2015. *Microbiología médica*. Elsevier Brasil.
- PAZ, A., A. PEROZO, E. PIÑA, Y L. SANDREA. 2012. Procedimiento de Muestras Clínicas para Estudios Bacteriológicos. Universidad del Zulia, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis, Práctica Profesional de Bacteriología, Centro de Referencia Bacteriológica SAHUM. 77-87.



- PEROZO, A. Y M. CASTELLANO. 2009. Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en cepas de la familia Enterobacteriaceae. *Kasmera*. 37(1): 25-37.
- RANDRIANIRINA, F., S. VEDY, D. RAKOTOVAO, C. RAMAROKOTO, H. RATSITOHAINA, J. CAROD, E. RATSIMA, M. MORILLON Y A. TALARMIN. 2009. Role of contaminated aspiration tubes in nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-2 and CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Journal of Hospital Infection*. 72(1): 23-29.
- RIVERA, J. 2009. Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Staphylococcus* spp. Productoras de biofilm aisladas de quesos. Trabajo de Grado. Facultad Experimental de Ciencias. Maestría en Microbiología. Universidad del Zulia, Maracaibo-Venezuela. Pp. 80.
- RODRÍGUEZ, C., I. RODRÍGUEZ, E. HERNÁNDEZ Y J. PICAZO. 2013. Aumento significativo de la resistencia a fosfomicina en cepas de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de urocultivos (2005-2009-2011). *Revista Española de Quimioterapia*. 26(1): 43-46.
- RODRÍGUEZ, J., J. CISNEROS, N. COBOS, G. FRESCOE, C. NAVARRO, C. GUDIOL, J. HORCAJADA, L. LÓPEZ, J. MARTÍNEZ, J. MOLINA, M. MONTERO, J. PANO, A. PASCUAL, C. PENA, V. PINTADO, P. RETAMAR, M. TOMÁS, M. BORGES, J. GARNACHO Y G. BOU. 2015. Diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multi-drug-resistant Enterobacteriaceae. Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 33(5): 337e1-337e21.
- SEYEDJAVADI, S., M. GOUDARZI Y F. SABZEHALI. 2016. Relation between *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes and acute urinary tract infections. *Journal of Acute Disease*. 5(1): 71-76.
- SUÁREZ, C. 2015. Análisis de perfiles plasmídicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido aisladas en urocultivos en el Instituto Nacional de Salud del Niño. Tesis para optar al título de Licenciado en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Humana. E.A.P. de Tecnología Médica. Lima. Perú. P.19.
- UK STANDARDS FOR MICROBIOLOGY INVESTIGATIONS. 2015. Identification of Enterobacteriaceae. Standards Unit Microbiology Services Public Health England. *Bacteriology-Identification*. 16(4): 1-34.
- VILLALOBOS, A., L. BARRERO, S. RIVERA, M. OVALLE Y D. VALERA. 2014. Vigilancia de infecciones asociadas a la atención de salud, resistencia bacteriana y consumo de antibióticos en hospitales de alta complejidad, Colombia, 2011. *Biomédica*. 34(1): 67-80.



UNIVERSIDAD  
DEL ZULIA

---

**BOLETÍN DEL CENTRO DE  
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

**Vol.51 N° 3\_\_\_\_\_**

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada  
en diciembre de 2017, por el **Fondo Editorial Serbiluz,**  
**Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela***