

Genotipificación por PCR convencional de genes de resistencia en *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE aisladas de muestras clínicas del servicio de UCI de dos hospitales de Cajamarca

Conventional PCR genotyping of resistance genes in *Klebsiella pneumoniae* ESBL producer isolated from clinical samples of the UCI service of two hospitals in Cajamarca

Víctor Llontop Cornejo^{1,*}; Julio Hilario-Vargas²;

¹ Hospital II Essalud-Cajamarca, Av. Mario Urteaga N° 963, Cajamarca Perú.

² Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Roma N° 338, Trujillo, Perú.

*Autor correspondiente: vjllontop_1@hotmail.com (V. Llontop)

DOI: [10.17268/rev.cyt.2021.03.01](https://doi.org/10.17268/rev.cyt.2021.03.01)

RESUMEN

El Objetivo fue determinar genotípicamente por PCR, la presencia de los genes *blaSHV*, *blaTEM* y *blaCTXM*, en *K. pneumoniae* productora de BLEE, del servicio de UCI de dos hospitales de Cajamarca. En este estudio se utilizó diferentes muestras clínicas biológicas, de las que se aisló 59 cepas de *K. pneumoniae* BLEE +, de las cuales 37 (62,7%) cepas corresponden al Hospital Regional Cajamarca y 22 (37,3%) al Hospital II Essalud Cajamarca. Con respecto a la producción de genes de resistencia en el Hospital Regional de Cajamarca 37/37 (100%) cepas presentaron el gen *blaSHV*, 33/37 (89%) el gen *blaTEM* y 36/37 (97%) el *blaCTX-M*. En el hospital II Essalud Cajamarca, la presencia del gen *blaSHV* fue de 17/22 (77%) cepas, *blaTEM* 20/22 (91%) y *blaCTX-M* 20/22 (91%). Haciendo el análisis estadístico total a nivel de Hospitales de Cajamarca, el gen *blaSHV* está presente en 54/59 (92%) de cepas, el gen *blaTEM* en 53/59 (90%) y el gen *blaCTX-M* en 56/59 (95%) cepas. Por lo que se concluye que, en ambos hospitales de Cajamarca, la resistencia antimicrobiana es alta, que está producida mayormente por los genes en estudio especialmente para *K. pneumoniae* BLEE +, que codifican Betalactamasas de espectro extendido.

Palabras clave: Resistencia bacteriana, Betalactamasas, genotipificación y PCR, electroforesis.

ABSTRACT

The objective was to genotypically determine by PCR, the presence of the *blaSHV*, *blaTEM* and *blaCTX-M* genes, in *K. pneumoniae* producer of ESBL, of the ICU service of two hospitals in Cajamarca. In this study, different clinical biological samples were used, from which 59 strains of *K. pneumoniae* ESBL + were isolated, of which 37 (62.7%) strains correspond to the Regional Hospital of Cajamarca and 22 (37.3%) to the Hospital II Essalud Cajamarca. With respect to the production of resistance genes, in the Regional Hospital of Cajamarca 37/37 (100%) strains presented the *blaSHV* gene, 33/37 (89%) the *blaTEM* gene and 36/37 (97%) the *blaCTX-M*. In the Essalud Cajamarca II hospital, the presence of the *blaSHV* gene was 17/22 (77%) strains, *blaTEM* 20/22 (91%) and *blaCTX-M* 20/22 (91%). Performing the total statistical analysis at the level of hospitals of Cajamarca, the *blaSHV* gene is present in 54/59 (92%) of strains, the *blaTEM* gene in 53/59 (90%) and the *blaCTX-M* gene in 56/59 (95%) strains. It is therefore concluded that, in both hospitals of Cajamarca, antimicrobial resistance is high, which is mainly produced by the genes under study, especially for *K. pneumoniae* ESBL +, which encode extended spectrum beta-lactamases.

Keywords: antimicrobial resistance, Betalactamases, genotyping and PCR, Electrophoresis.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es reconocida por la Organización Mundial de Salud (OMS) como un problema de salud pública mundial, dado que incrementa la morbilidad y mortalidad por infecciones bacterianas, así como el costo de su tratamiento (González y Cardona, 2018; Angles, 2018). Entre sus principales causas se encuentran el uso inadecuado de los antibióticos en el tratamiento de infecciones que redundan sobre la presión selectiva de mecanismos de adaptación microbiana, el incremento en el uso de estos

medicamentos en medicina humana y veterinaria, en seguridad alimentaria y medio ambiente, la movilidad de la población, entre otras (Quiñones, 2017; Gonzáles y Cardona, 2018).

Muchas bacterias hoy en día presentan una alta tasa de resistencia generando una alerta mundial, que si no se toman medidas de control pronto estaríamos llegando a la era post antibiótica (Pérez y Bustamante, 2018; OMS, 2016). La OMS ha publicado una lista de bacterias patógenas de alta incidencia en el mundo que presentan multiresistencia a antibióticos, denominados como las “superbacterias”. Que lo integran *Enterococcus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp* (grupo *Eskape*). Para las cuales se están tomando estrategias urgentes para combatir las infecciones ocasionadas por éstas (Bocanegra et al., 2018).

Klebsiella pneumoniae se ha convertido a lo largo de las últimas décadas como un destacado patógeno nosocomial que ocasiona cuadros de neumonía, infecciones urinarias, meningitis, entre otras. Siendo responsable de hasta el 8% de las infecciones bacterianas intrahospitalarias diagnosticadas en Europa y Estados Unidos. *Klebsiella pneumoniae* causa un 9% de las infecciones urinarias y hasta un 60% de las neumonías adquiridas en el hospital, especialmente en las unidades de cuidados intensivos, con índices de mortalidad de entre el 25% y el 60% (Martínez, 2014; Bocanegra et al., 2018). Las cepas aisladas de estas bacterias pueden presentar resistencia a distintos antibióticos, que incluye a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, así como los carbapenémicos. La facilidad con que se transmite en el ambiente hospitalario la ha convertido en agente causante de importantes brotes que ha puesto en aprietos a la comunidad médica frente procesos infecciosos difíciles de controlar (Martínez, 2018). *Klebsiella pneumoniae*, así como las otras bacterias multiresistentes, pueden utilizar diferentes mecanismos para hacerse resistentes a la acción de los antibióticos. Uno de ellos y los más destacados es la producción de enzimas que modifican o inactivan al antibiótico, en este caso nos referimos a las Betalactamasas, enzimas de gran importancia que están implicadas en la inactivación de los antibióticos betalactámicos (Torres, 2012).

Las Betalactamasas son una familia de enzimas que hidrolizan los anillos B-lactámicos, estructuras que están presentes en los antibióticos conocidos como las penicilinas, las cefalosporinas y el aztreonam, (Serra, 2017). A las primeras B-lactamasas aisladas se les denominó B-lactamasas de amplio espectro (no BLEE o BLEA y codificadas por genes *bla*TEM-1, *bla*TEM.2 y *bla*SHV). Estas enzimas confieren resistencia a la ampicilina y la amoxicilina, cefalotina; pero no a cefalosporinas de tercera generación. La presencia de mutaciones en los genes que codifican para estas enzimas dio origen a nuevas betalactamasas capaces de hidrolizar las cefalosporinas de tercera generación y el Aztreonam., a las que se les denominó B-lactamasas de Espectro Extendido (BLEE). Rivera, et al 2015, refiere que las enzimas B-lactamasas de espectro extendido están entre las de mayor relevancia clínica e incluyen: TEM, SHV y CTX-M. Las enzimas TEM provienen de las clásicas TEM-1 y TEM-2 contenidas en plásmidos, mientras que las SHV tienen origen cromosómico. Las SHV (SulphHydryl Variable) son β-lactamasas plasmídicas, aunque en algunas especies son codificadas por genes cromosomales; un ejemplo de ello es la enzima SHV1 que es codificada por un gen cromosomal en *K. pneumoniae* (propia de la especie), cuyo espectro de acción es menor, considerada por ello una β-lactamasa de amplio espectro (BLEA). La SHV-5, es una enzima plasmídica mutante, que presenta sustituciones en las posiciones 238 Ser - Gly y 240 Lys - Glu (Bradford PA 2001). Tales cambios, así como otros en otras variantes de esta enzima, son responsables del incremento en su espectro de acción, por lo que se consideran a estas enzimas como β-lactamasas de espectro extendido (BLEE). La capacidad de transferir la resistencia está asociada a la presencia de plásmidos u otros genes denominados transposones y puede ocurrir entre diversas especies bacterianas (Calderón, et al 2003). Las CTX-M, de historia evolutiva distinta, tienen actividad BLEE intrínseca desde su predecesora cromosómica en *Kluyvera ascorbata* (D'Andrea M., et al. 2013; Kassakian & Merinel, 2014). Esta Enzima, que fue reportada por primera vez en la India en 1990, su expansión ha sido tan acelerada por todo el mundo que ha generado emergencia epidemiológica en varios hospitales, dada su alta capacidad hidrolítica sobre cefalosporinas de tercera y cuarta generación. CTX-M, no está muy relacionada con TEM y SHV ya que genéticamente muestran solo una relación de un 40% con las mismas. Se conocen más de 80 tipos de CTX-M, de las cuales unas son más activas contra Cefotaxima que a Cefuroxima (López et al., 2016). A la fecha estos genes y enzimas se han encontrado en cepas de *Salmonella entérica*, serovar *tiphymurium*, en *Escherichia coli*, entre otras enterobacterias con variantes predominantemente CTX-M-15 (López et al., 2016; Arce et al., 2013).

Cada vez es más frecuente la asociación de diferentes mecanismos de resistencia para la misma familia de antibióticos en una misma cepa, esto hace que el perfil fenotípico sea difícil de interpretar y el tratamiento difícil de abordar. Se ha descrito una cepa de *Escherichia coli* causante de infección urinaria de evolución fatal que producía dos carbapenemasas (VIM-1 y KPC-3), una AmpC plasmídica (CMY-2) y una Beta-lactamasa de espectro extendido –BLEE, SHV-12(Porres et al., 2014).

Existen investigaciones en nuestra región, donde se pone de manifiesto la problemática de la resistencia bacteriana, así tenemos que en el Hospital regional de Lambayeque (HRL) durante el 2015, se tuvo una incidencia acumulada en infecciones del tracto urinario del 11.2 por cada 1000 pacientes, superior al promedio anual que es del 3.31 para hospitales de nivel II-1, de esta incidencia más del 60% fueron por causas de enterobacterias productoras de BLEE, provenientes de los servicios de hospitalización y áreas críticas, durante esta etapa no se ha realizado el perfil epidemiológico molecular para establecer similitudes filogenéticas que permita determinar la presencia de clones causantes de brotes de infecciones intrahospitalarias difíciles de controlar, pero frente al elevado % de resistencia se decidió caracterizar molecularmente mediante ERIC-PCR y REP-PCR, cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE, aisladas de pacientes con infección urinaria intrahospitalaria del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de junio a diciembre de 2015, los resultados del análisis molecular detectaron tres patrones de clonales de resistencia en *E. coli* y dos en *K. pneumoniae* (López K, et al 2015).

La genómica hoy en día toma un gran impacto en resistencia bacteriana y surge con el desarrollo de técnicas de biología molecular que permiten la secuenciación de genomas completos, lo que supone el análisis del contenido de genes de un microorganismo como el caso de las bacterias. A partir del análisis de la secuencia de genomas bacterianos se pueden identificar genes y proteínas esenciales para la sobrevivencia de la bacteria y, a partir de esta información, "diseñar" nuevos antibióticos que inhiban el crecimiento bacteriano (Garza-Ramos, U & Martínez-Romero E, 2009).

La genómica y la identificación de nuevos blancos a fármacos. - Debido a la creciente necesidad de desarrollar nuevas clases de antibióticos para combatir bacterias resistentes a los antibióticos, se ha propuesto la identificación de nuevos blancos bacterianos mediante la secuenciación y análisis de los genomas que incluyen la genómica comparativa y la genética molecular. Por su parte, la química y biología estructural están encaminadas a comprender las interacciones entre las sustancias y sus blancos biológicos. Varias estrategias se han intentado para identificar nuevos antibióticos que incluyan otras estructuras además de las ya estudiadas y otras clases funcionales que actúen en patógenos bacterianos multirresistentes, además de ampliar y extender la vida media útil del antibiótico para obtener un mejor éxito durante la terapia antimicrobiana. Por lo regular se han utilizado tres blancos bacterianos: las PBP, los ribosomas y la ADN girasa. Sin embargo, los antibióticos que actúan sobre estos blancos han disminuido su efectividad debido a la multirresistencia. Hoy en día, los avances de la genómica han permitido identificar cientos de nuevos posibles candidatos como blancos bacterianos para inhibir el crecimiento bacteriano. Un blanco preferido ha sido la membrana bacteriana, con el objetivo de afectar la síntesis de los ácidos grasos que la componen (Wang J. et al 2006) Otra alternativa propuesta es la limitación de la capacidad mutagénica en la bacteria que interfiere con los genes activados en los mecanismos de reparación del ADN. (Cirz RT et al 2006, Garza-Ramos, U & Martínez-Romero E, 2009).

El uso de la **genómica** y la **proteómica** para el estudio de la resistencia bacteriana, son dos metodologías muy útiles y se emplean en forma regular en laboratorios de biología molecular. Sin embargo, en fecha reciente se han desarrollado otras metodologías novedosas que aportan conocimientos nuevos al campo de la genómica y la proteómica. En el caso de la primera se han desarrollado metodologías que permiten determinar el número de copias de un gen en un genoma bacteriano, basado en PCR en tiempo real, "pirosecuenciación" (denominada así por la liberación de pirofosfato durante la reacción) y microarreglos del ADN empleado para obtener una pronta genotipificación de expresión de proteínas (p. ej., β -lactamasas). Con respecto a la proteómica, se ha utilizado la espectrometría de masas para identificar polimorfismos y genotipificación de diferentes proteínas en una sola muestra. En cuanto al área de la bioinformática, se ha desarrollado una gran cantidad de bases de datos con información biomédica y así mismo se han realizado programas computacionales empleados para establecer las vías de evolución de los genes que codifican a las β -lactamasas de distribución mundial (Sturenburg E. et al 2006).

El **PCR en tiempo real**, Esta metodología permite la amplificación y detección simultáneas de fragmentos de ADN (gen de interés) gracias a la emisión de fluorescencia, que se relaciona de manera directa con la cantidad de ADN amplificado en cada ciclo, lo cual permite establecer y registrar continuamente la cinética de la reacción. Con esta técnica es posible determinar la coexistencia de diferentes alelos de β -lactamasas tipo SHV (BLEE y no BLEE) en un mismo aislamiento clínico. La coexistencia de ambos alelos favorece por una parte la resistencia a grandes concentraciones de penicilina debido a la expresión de la enzima TEM-1 (no BLEE) y cefalosporinas de tercera generación por parte de la enzima SHV-5 (BLEE). Esto se refleja en un tratamiento fallido con este tipo de antibióticos. Por otra parte, Hammond y colaboradores cuantificaron el número de copias del gen que codifica a la b-lactamasa SHV en un mismo aislamiento clínico. La identificación de más de un alelo en aislamientos clínicos individuales es una norma (más que la excepción) y existe una relación estrecha entre los niveles de resistencia a las cefalosporinas y el número de copias de BLEE, como se ha

determinado para el alelo SHV-12. Estos resultados son recientes e indican que el aumento de las concentraciones mínimas inhibitorias para combatir a las bacterias aumenta simplemente al duplicar el número de copias de una BLEE. Como ya se comentó, la familia SHV incluye mutaciones puntuales que les permiten hidrolizar a las cefalosporinas de tercera generación; las dos mutaciones más identificadas son gli238ser y glu240lis, que suelen ser dominantes sobre las mutaciones que no confieren la actividad contra las cefalosporinas. El diseño de oligonucleótidos específicos para la detección de estas mutaciones se ha desarrollado y empleado en la técnica de PCR en tiempo real mediante SYBR-Green como reactivo de detección (Hammond DS, et al 2005).

Gracias al desarrollo Biotecnológico disponible en la actualidad, pueden conocerse en forma más precisa y estrecha la fisiología y la estructura molecular de los agentes causantes de infecciones producidas por las bacterias. La secuenciación masiva de genomas bacterianos generará información relevante que permite identificar nuevos blancos a fármacos en las bacterias. Con estas herramientas se podrán realizar estudios epidemiológicos moleculares que hagan posible identificar poblaciones de bacterias resistentes a antibióticos y la diseminación de los genes que confieren la resistencia en diferentes nichos ecológicos. Sin embargo, un hecho importante que debe considerarse es la prevención del surgimiento de clones de bacterias resistentes a los antibióticos mediante el uso prudente de antibióticos y prolongar la efectividad de los medicamentos disponibles en la actualidad.

Finalmente, la prevalencia de la resistencia no solo ha aumentado en bacterias causantes de infecciones; la colonización e infección intestinal de personas sanas por enterobacterias productoras de BLEE, principalmente del tipo CTX-M, ha alcanzado niveles de pandemia a nivel mundial en pocos años y nuestro país no es ajeno. Ignacio, 2015; Porres et al., 2014, calculan que actualmente hay más de 1,753 millones de habitantes colonizados con bacterias multiresistentes. Conocedores de la emergencia que implica albergar bacterias multiresistentes causantes de infecciones en los hospitales, especialmente en la unidad de cuidados intensivos de nuestra zona, se propone el presente estudio, cuyo objetivo fue determinar la prevalencia de genes de resistencia *bla*SHV, *bla*TEM y *bla* CTX-M en *Klebsiella pneumoniae* en los dos hospitales referenciales de la ciudad de Cajamarca.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material Biológico

Estuvo constituido por 59 cultivos puros de *K. pneumoniae* BLEE positivo, obtenidos de muestras clínicas, de la UCI de dos hospitales de Cajamarca. De los cuales 37 fueron del Hospital Regional del Minsa y 22 del Hospital II de Essalud. Las muestras clínicas fueron: Sangre (hemocultivo), aspirados bronquiales, orina, esputo, Líquido de diálisis peritoneal, úlceras por presión (escaras), catéter venoso.

2.2 Toma y transporte de muestras

La toma de muestras clínicas fue realizada por el personal del laboratorio, de enfermería ó médicos entrenados para la obtención de muestras biológicas, aplicando las técnicas establecidas en el manual del Servicio de Microbiología de los Hospitales de Cajamarca (Llontop, V. 2014)

Una vez obtenida la muestra, estas fueron llevadas en frascos estériles o medio de transporte estéril, lo más pronto posible al laboratorio de Microbiología, según sea el nosocomio donde se obtuvo.

2.3 Estudio microbiológico

2.3.1 Aislamiento primario

Las muestras Clínicas, fueron sembrados por el método de estrías en placas conteniendo Agar sangre, agar MacConkey y parte o fragmento de la muestra se inocularon a caldo tioglicolato para conservarla. Luego se incubó a 35 °C durante 18 ó 24 horas. Pasado el tiempo, y visto si hay desarrollo de colonias bacterianas, se les realizó la coloración Gram para determinación de morfología y pureza de las colonias, para luego realizar la identificación del agente etiológico en estudio (Ramírez & Díaz, 2017).

2.3.2 Aislamiento secundario

Selección de cultivos puros bacterianos para el diagnóstico microbiológico preliminar, para lo cual se utilizó Agar MacConkey, medio selectivo y diferencial para el aislamiento de bacterias coliformes, dentro de ellas *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonellas*, *Shigellas*, etc. Este medio tiene sales biliares y el cristal violeta que

inhiben considerablemente la flora Grampositiva. La Lactosa, junto con el indicador de pH Rojo neutro sirve para la comprobación del metabolismo de dicho azúcar. Las colonias Lactosa negativa son incoloras y las Lactosa Positiva son rojas con un halo turbio debido al descenso del pH provocado por los ácidos biliares. También se procedió al sembrado en Agar sangre destinado al aislamiento y cultivo de diversos microorganismos, sobre todo de patógenos exigentes en su identificación y su abundante base nutritiva ofrece condiciones óptimas de crecimiento a todos los microorganismos presentes. El valor del pH de 6,8 es especialmente favorable para la conservación de los eritrocitos y para la formación de los diferentes tipos de halos hemolíticos claros (Ramírez y Díaz, 2017).

2.3.3 Identificación Bioquímica Diferencial

La identificación Bioquímica diferencial, específica para microorganismos de importancia clínica se realizó en base a dos metodologías; una utilizando la técnica semiautomatizada del **sistema Micro-Scan**, que nos permite determinar el género y/o especie de la bacteria en investigación, así como la sensibilidad antimicrobiana. También se procedió en su identificación a la técnica clásica o manual, que nos permite corroborar el aislamiento del germen anteriormente identificado., utilizando en la determinación bacteriológica la 6ta edición del Manual Diagnóstico Microbiológico de Koneman – 2006.

Para la identificación de *Klebsiella pneumoniae* por técnica clásica primero se seleccionó colonias compatibles con el género, que fermenten la lactosa + en agar MacConkey, posteriormente se sembró en medios de diferenciación bioquímica, en la que los microorganismos expresan características fenotípicas propias de especies. Siendo las más importantes: la utilización de los carbohidratos, ONPG (Ortonitrofenil -D galactosidasa), prueba de indol, Rojo de metilo (RM), Vogues- Proskauer (VP), utilización del citrato, producción de ureasa, descarboxilación de la lisina, ornitina y arginina, producción de Fenilalanina deaminasa, prueba de motilidad, la clasificación y diferenciación por la producción de sulfuro de hidrogeno (Winn et al., 2006).

2.3.4 Test de confirmación BLEE (método fenotípico de Jarlier)

Se utilizó el método recomendado por la CLSI (instituto de Standares Clínicos y de laboratorios) para el despistaje y confirmación de B-lactamasas de espectro extendido, usando un disco de Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC)(20/10 mcg) en el centro de una placa Petri con agar Mueller Hinton y alrededor a 25 – 30 mm de distancia, discos de Cefotaxidima CAZ (30 mcg), Cefepime CPM (30 mcg); Ceftriaxona CTR (30mcg) y Aztreonam AZ (30 mcg). La presencia de BLEE se manifestó por el efecto sinérgico del inhibidor y los discos: Efecto de huevo, cola de Pez o balón de Futbol americano (Jarlier et al., 1988).

2.3.5 Conservación de cultivos puros

Los cultivos positivos aislados, identificados y determinados como *K. pneumoniae*, fueron colocados en viales herméticamente sellados contiendo medio BHI glicerol, para ser conservados durante el estudio y sometidos a temperatura de congelación (-20 °C), y luego se procedió al estudio molecular 2.3.6

2.3.6 Estudio molecular de cultivos puros para determinación de genes de Resistencia productores de BLEE. (GENOTIPIFICACIÓN)

a. Extracción de ADN total (Plasmídico y/o cromosómico).

(Protocolo High pure PCR template preparation Kit-ROCHE. 2012).

1. Colocar 200 uL de cultivo puro de *K. pneumoniae* en un microtubo eppendor de capacidad de 1.5 mL.
2. Luego lavar por centrifugación con solución de Tris EDTA (TE) 20:5, por dos veces. Eliminando el sobrenadante.
3. Al sedimento obtenido se agregó 200 a 250 uL de BUFFER LISIS, más 40 uL de Proteinasas K.
4. Incubar a 54 °C por 15 minutos o más tiempo, hasta disolver la muestra.
5. Colocar 200 a 250 de BUFFER BINDING más 40 uL de Proteinasas K.
6. Incubar a 70 ° C por 10 a 15 minutos. Invertir los tubos en intervalo de tiempo.
7. Dejar enfriar y colocar 200 a 300 uL de isopropanol helado. Mezclar bien.
8. Pasar la muestra a microtubos dispuestos en columna sobre el soporte y centrifugar a 600 rpm por 2 minutos.
9. Colocar 500 uL de buffer INHIBITOR REMOVAL. Centrifugar 8 000 rpm x 2 minutos.
10. Colocar 500 uL de Buffer WASHING. Centrifugar 8 000 rpm x 2 minutos.
11. Repetir ítem anterior. Mezclar bien.

12. Centrifugar a 1000 rpm para descarta el exceso de Buffer Wash.
13. Colocar 70 a 120 uL de buffer Elution (previamente calentado a 70° C). dejar reposar por 5 minutos. Centrifugar a 6 000 rpm por 5 minutos.
14. Repetir Ítem anterior colocando 30 a 50 uL Elution nuevo.
15. Guardar a 4 °C.

El ADN extraído fué guardado de -24 a -20°C hasta el desarrollo de la técnica de Amplificación.

- b. Técnica de amplificación de nucleótidos- PCR convencional:
 Para la determinación de los genes de resistencia antibiótica en *K. pneumoniae*, se usó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (PCRc), haciendo uso de los siguientes oligonucleótidos:

Tabla 1. Primer Usado para Amplificación de genes *blaSHV*, *blaTEM* y *blaCTX-M* en *K. pneumoniae*.

GEN	PRIMER	Secuencia (5´- 3´) de Oligonucleótidos	Amplicones(pb)	Referencias
blaSHV	SHV -F	GGGTTATTCTTATTTGTCGC	930	Mercier J. & Levesque 1990.
	SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC		
blaTEM	TEM-F	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1080	Zongo et al 2015 Arce Z, et al. 2013
	TEM-R	GACAGTTACCAATGCTTAATCA		
	CTX-M-F	TTTGCATGTGCAGTACCAGTAA		
blaCTXM	CTX-M-F	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	544	
	CTX-M-R			

Preparación del Master Mix.

(Manual diagnostico microbiológico y molecular de enteropatógenos, UPCH. 2016).

1. Limpiar y desinfectar la mesa de trabajo con alcohol al 70%. Preparar los materiales a utilizar (micropipetas, tips con filtro, rack, microtubos de PCR, guantes). Se puede ir descongelando las otras soluciones y tomando temperatura ambiente los reactivos, excepto la solución enzimática (Taq polimerasa).
2. Usando guantes, preparar los Master mix en el orden y cantidades que se calculan, según tabla A.
3. Homogenizar usando el vortex.
4. Dispensar 23 uL del Master mix en cada uno de los microtubos para PCR.
5. Agregar 2 uL de las muestras de ADN.
6. Colocar los tubos en el termociclador y programarlo.

- Condiciones de termociclado

Se utilizó 30 ciclos, con temperaturas estandarizadas, según guía práctica UPCH, 2016.

c. Análisis post PCR: Electroforesis. Electroforesis en gel de poliacrilamida 4%, de los Genes amplificados bla SHV, blaTEM y blaCTX-M en cultivo de Klebsiella pneumoniae.

1. Preparar el volumen necesario para un gel Acrilamida 4%. (20:1. 20 g de Acrilamida y 1 g de Bis acrilamida en 100 ml de agua destilada).
2. Armar el molde para la formación del gel.
3. Colocar la mezcla en el microondas y calentar hasta la disolución completa del gel. (Los calentamientos deben ser graduados: cada 15, 10, o 5 según corresponda. Para evitar evaporación del Buffer y/o contaminación).
4. Añadir el volumen necesario de Syber Saffe. Homogenizar la mezcla.
5. Dispensar cuidadosamente la mezcla de Acrilamida en el molde.
6. Con un tip, romper o desplazar hacia abajo las burbujas que pudieron formarse.
7. Esperar 30 minutos hasta la formación del gel.
8. Quitar cuidadosamente el peine y colocar el molde con gel en la cámara de Electroforesis. Considerar que siempre los pocillos deben ir cercanos al ánodo (el electrodo negro).
9. colocar 8 uL del producto de amplificación y 4,5 uL del marcador de pares de bases a los pocillos (en otros kit, es necesario mezclar el producto de amplificación con el Loading buffer antes de colocarlo en los pocillos)

10. Cerrar la cámara y conectarla a la fuente de poder. Programar la corrida a 80 V por 50 min.
 11. Después de la corrida, tomar cuidadosamente el gel y colocarlo en el transiluminador.
 12. Encender el equipo y visualizar los resultados.
- Es recomendable tomar una foto inmediatamente terminada la corrida electroforética.

2.3.7 Análisis estadísticos e interpretación de datos.

Las frecuencias con la que se presentan los genes BLEE y sus tipos por Hospital fue analizado empleando el programa SPSS v23. Se empleó el Test Exacto de Fisher con un nivel de confianza de 95% y una significancia estadística con valor de $p < 0,05$.

2.3.8 Consideraciones éticas.

El presente estudio antes de realizarse fue sometido al comité de ética e investigación del Hospital II de Essalud, Cajamarca para su revisión y aprobación. Así mismo se siguieron todos protocolos de confidencialidad y consentimiento de los jefes de servicio de los hospitales en estudio.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Se aislaron 59 (100%) cepas de *Klebsiella pneumoniae* BLEE, de los servicios de UCI de dos hospitales de Cajamarca durante 2016, distribuidas de la siguiente manera: Hospital Regional Cajamarca, MINSA 37 (62,7%) y Hospital II-Essalud Cajamarca, 22 (37,7%). Dichas cepas se obtuvieron de muestras clínicas y se les realizó la genotipificación por PCR convencional de los genes amplificados *blaSHV*, *blaTEM* y *blaCTX-M* (Fig. 1).

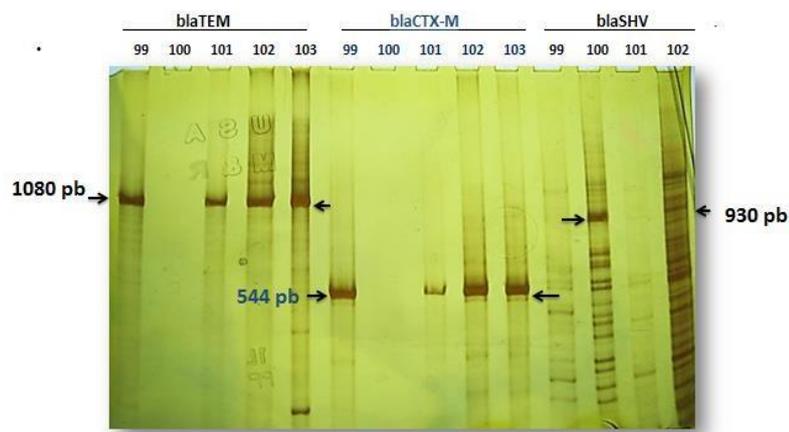


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida 4%, de los Genes amplificados en PCR: *bla SHV*, *blaTEM* y *blaCTX-M* en cultivos de 10^4 *klebsiella pneumoniae*.

Tabla 2. Frecuencia de genes *blaSHV*, *blaTEM* y *blaCTX-M* en cultivos de *K. pneumoniae* en el Hospital Regional MINSA y el Hospital II ESSALUD, Cajamarca 2016.

HOSPITAL	<i>K. pneumoniae</i> -BLEE +														
	<i>Bla SHV</i>					<i>bla TEM</i>					<i>bla CTX-M</i>				
	P*	%	N**	%	TOTAL	P	%	N	%	TOTAL	P	%	N	%	TOTAL
Hospital Regional MINSA	37	100	0	0	37	33	89.2	4	10.8	37	36	97.3	1	2.7	37
Hospital II EsSalud	13	59.1	9	10.9	22	20	90.9	2	9.1	22	21	95.5	1	4.5	22

P*: Positivo. N**: Negativo

Tabla 3. Frecuencia del gen *blaSHV* en *K. pneumoniae* según hospital de procedencia

			Hospital de procedencia		Total
			MINSa	EsSalud	
BLEE SHV	Positivo	Recuento	37	13	50
		%	100,0%	59,1%	84,7%
	Negativo	Recuento	0	9	9
		%	0,0%	40,9%	15,3%
Total		Recuento	37	22	59
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Prueba exacta de Fisher: $p = 0,000$

DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE HOSPITALES

Respecto a la relación del gen *blaSHV* según hospital, encontramos que la mayor cantidad de genes *blaSHV* lo presenta *K. pneumoniae* en el Hospital Regional con 37/59 (63%) cepas y el Hospital II Essalud Cajamarca con 17/59 (29 %) cepas. La relación existente del gen *blaTEM* entre muestras clínicas de hospitales: el Hospital Regional tiene la mayor producción, 33/59 (56%), mientras que 20/59 (34%) cepas presenta este gen en el hospital II Essalud-Cajamarca. En cuanto a la frecuencia del gen *blaCTX - M* según hospital, fue similar % en el Hospital Regional se encontró 36/59 (61%), mientras que para el hospital II de Essalud se encontró en 20/59(34%) (Tabla 2).

En el análisis estadístico de las frecuencias de los genes en estudio en *K. pneumoniae* por hospital, se encontró que para el gen *bla SHV* según hospital hubo diferencia altamente significativa entre hospitales (prueba exacta de Fisher: $p= 0,000$). Sin embargo, para los genes *blaTEM* y *blaCTX-M* no se encontró diferencias significativas (Prueba de Fisher: $P= 1,000$).

La presencia de mecanismos de resistencia, con la producción de enzimas BLEE están dadas mayormente para casos de enterobacterias como es el caso para *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, etc. Los genes que codifican las BLEE pueden ser fácilmente transferidos horizontalmente entre e intra-especies, hasta portadores por conjugación plasmídica, produciéndose la transferencia más frecuente de los genes *blaTEM*, *blaSHV* y *blaCTX-M*, *bla OXA*, entre otros (Velásquez et al., 2013; Guzmán et al., 2013).

Existen estudios en diferentes partes del mundo, como por ejemplo en un centro médico de EEUU, se hizo un estudio molecular de cepas de enterobacterias no susceptibles a ceftriaxona, reporta que de 378 cultivos puros, tenían características genotípicas si a resistencia por Betalactamasas BLEE y Amp C, el 78% (310/378) presentan los genes *blaSHV*, *blaTEM* y *blaCTX-M*, siendo el más común el *blaCTX-M-1*, con su variante *blaCTX-M-15* (Tamma et al., 2019). En nuestro estudio se analizaron 59 cultivos puros de *K. pneumoniae*, productores de BLEE en dos hospitales de Cajamarca, en la que encontramos alta presencia de los genes productores de BLEE: *blaSHV*, *blaTEM* y *blaCTX-M*, frecuencia que va por encima del 90%. Esto demuestra que los resultados obtenidos en nuestro medio, no se alejan de los obtenidos en otros países, a pesar de que los microorganismos en estudio son diferentes, la diversidad de genes de resistencia microbiana encontrados en un mismo tipo de bacteria y nicho ecológico son semejantes; que finalmente se convierten en grandes reservorios de microorganismos de resistencia antimicrobiana.

En Costa Rica, donde Araya et al., (2007) determina mediante la biología molecular por PCR convencional o clásica en *K. pneumoniae*, que el gen *blaTEM* está presente en un 100% de cepas productoras de BLEE, *blaCTX-M* en el 30% y *blaSHV-5*, no se encontró (00%). En varias de ellas se logró demostrar más de un tipo de enzimas y genes. Estudios realizados en dos Hospitales de Chiclayo por Arce et al 2012, reportan que de 66 (100%) cepas BLEE positivas estudiadas, el 72.73% de genes, son *blaSHV* y *blaTEM*, el resto de las cepas que no codificaron para estos genes, pero podrían estar dadas por el gen *blaCTX-M*, que también da producción de BLEEs. El mismo autor en el 2013, investiga la presencia del gen *blaCTX-M* en cepas de *E. Coli* del Hospital Regional de Lambayeque, encuentra que de 35 cepas productoras de aisladas BLEEs, 18 (51,4%) eran positivas a la presencia del gen *blaCTX-M*. Esta prevalencia contrasta con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, donde con técnica de PCRc, *K. pneumoniae* en el Hospital Regional de Cajamarca el gen *blaSHV* esta presenta en las 37/37 (100%) cepas estudiadas. El gen *blaTEM* en 33/37(89%) y el gen *blaCTX-M* en 36/37 (97%), muestran una alta incidencia de estos genes de resistencia, así mismo en el Hospital II – Essalud,

Cajamarca de 22 cepas BLEE positivas, el gen *blaSHV*, 17/22 (77, 3%) también manifiesta presencia en menor % pero aun de mucha consideración %. El gen *blaTEM* 20/22 (91%) y los mismos valores de éste último son para el gen *blaCTX-M*. De estos se puede concluir que en los hospitales en estudio, existe una alta prevalencia de genes *blaSHV*, *blaTEM* y *blaCTX-M*, responsables probablemente de la emergencia de la resistencia antimicrobiana que existe en este nosocomio. Cabe recalcar que en los estudios realizados por Arce y col, las muestras clínicas provienen de pacientes ambulatorios y hospitalizados. Esto explicaría probablemente la diferencia de prevalencia en el gen *blaCTX-M*, donde encontramos frecuencias mayores del 90%, muestras que fueron específicamente de pacientes del servicio de cuidados intensivos, donde *K. pneumoniae* y otros gérmenes intrahospitalarios encuentran condiciones adecuadas para la transferencia o conjugación plasmídica y transmitir la resistencia antimicrobiana (Ignacio, 2015).

Otra de las publicaciones recientes, relacionadas a infectología y epidemiología molecular, son los estudios realizados por Liu et al., 2019, investiga a *E. coli* ST131 y *K. pneumoniae* ST11, productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes con neumonía, en un hospital Universitario de China. Se determinaron que de 59 cepas productoras de BLEE (31 *E. coli* y 28 *K. pneumoniae*). El gen más frecuente fue *blaCTX-M-14* (62,7%), seguido de *blaSHV-77*, *CTX-M-3*, *SHV-11* y *CTX-M-27*. Y el 55,9% de cepas al menos portaban dos o más tipos de genes BLEE. Nuestro estudio también comparte ciertas semejanzas por el mismo número de cultivos puros que fueron sometidos a genotipificación, pero difiere en frecuencia de genes aislados, los nuestros superan más del 90%. que son reportados en el presente trabajo para Cajamarca, Perú.

K. pneumoniae es el microorganismo productor de BLEE descrito con más frecuencia, este hecho se relaciona con que esta especie forma parte de la flora normal, sobrevive durante largos periodos de tiempo sobre la piel y los fómites adquiriendo con gran facilidad plásmidos conjugativos que en la mayoría de los casos portan éstos genes que codifican para múltiples antimicrobianos altamente estables (Serra, 2017; Lespada, 2018) En otras ocasiones los brotes epidémicos y las endemias por enterobacterias productoras de BLEE, son ocasionadas por una cepa clonada o por un único plásmido, esto es más evidente en *K. pneumoniae* productora de BLEE, que puede diseminarse entre hospitales o áreas sanitarias, pero esto también se ha descrito en *E. coli*, productora de BLEE; refiere Rodríguez et al., 2014; Fush, 2019).

El desarrollo de las técnicas de genotipificación por Biología molecular ha permitido detectar el origen y la ruta de epidemias Hospitalarias. Así como definir estrategias de control y eliminación de la infección con tratamientos adecuados y oportunos (López et al., 2016). Esta propuesta es la que nos permitió estudiar la presencia de genes productores de BLEEs en nuestros hospitales de Cajamarca.

4. CONCLUSIONES

El análisis molecular en el presente estudio permite concluir que la diseminación y virulencia portada en los genes de resistencia se debe posiblemente a la alta producción de enzimas Betalactamasas; ya que la mayoría de los genes han sido identificados y otros aún no estudiados en *Klebsiella pneumoniae*, y su incidencia elevada en % se da para ambos hospitales. Lo que exige continuar trabajando en este tipo de investigaciones dada la problemática de resistencia microbiana, que aún continúa siendo un desafío en la terapéutica médica.

AGRADECIMIENTOS

A la Univ. Peruana Cayetano Heredia-Lima, por su apoyo con el obsequio de cepas control que ayudaron mucho en la investigación.

Al laboratorio de Biología Molecular - Gen Mol, del Dr. Luis Rodríguez Delfín, por brindarnos sus ambientes y su apoyo técnico en el desarrollo del trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angles, E. 2018. Uso racional de antimicrobianos y Resistencia bacteriana ¿Hacia dónde vamos? Rev Med herediana 29: 3-4.
- Araya, C.; Boza, R.; Arguedas L.; Badilla, G.; García, F. 2007. Infecciones nosocomiales por bacterias productoras de B-lactamasas de espectro ampliado: prevalencia, factores de riesgo y análisis molecular. Centro de Investigaciones de Enf. Tropicales Universidad de Costa Rica AMC, 49 (2): 90-96.
- Arce, Z.; Alarcón, E.; Limo, J.; Llontop, J.; Valle, J. 2012. Detección de genes *blaSHV* y *blaTEM* en cepas de *Escherichia coli* productoras de Betalactamasas de espectro extendido procedentes de dos centros hospitalarios de Chiclayo-Perú. Revista del cuerpo Médico Hospital Nacional Almazor Aguinaga Asenjo, 5(3): 13-16.

- Arce, Z.; Llontop, J.; Flores, R.; Fernández, D. 2013. Detección del gen *bla*CTX-M en cepas de *Escherichia coli* productoras de B-lactamasas de espectro extendido procedentes del Hospital Regional de Lambayeque; Chiclayo-Perú. Rev. Cuerpo méd. HNAAA, 6(4):13-16.
- Bocanegra, P.; Camacho, A.; Flores, S.; Garza, E. 2018. Resistencia a los antibióticos ¿cuál es la situación actual en México? Biotecnología en movimiento, 15: 7-9.
- Bradford, P. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microb Rev, 14(4): 933-51.
- Calderón, R.; Sacsquispe R.; Pasterán, F.; Galas, M.; Soto, J.; Riveros, J.; Valencia, A.; Silva, N.; Suárez, V.; Montoya, Y. 2003. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Klebsiella pneumoniae* Y *Enterobacter cloacae* PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO TIPO SHV-5 EN UNA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS NEONATAL DE LIMA. Rev. Perú med Exp Salud pública, 20 (3): 121 – 126.
- D'Andrea M.; Arena F., Pallecchi L., Rossolini M. 2013. CTX-Type B-lactamases: A successful story of antibiotic resistance. Journal Med Microb, 303 (6): 305-17.
- Fush, L.; Chihu, L.; Conde, C.; Gonzáles, V.; Noguez, A.; Calderón, E.; Avonce, N.; Ovando, C. 2019.
- Garza, U.; Silva, J.; Martínez, E. 2009. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. Rev. Salud Pública Mex, 51 (3): 439-445.
- Gonzáles, C.; Cardona, J. 2018. Revisión sistemática sobre elementos genéticos móviles portadores de resistencia a antibióticos en aguas residuales, 2000 - 20017. MedPub Journals, 14(2): 5.
- Guzmán, M.; Rodríguez, E.; Antón, K.; Silva, S.; Navarro, J.; Lastra, L. 2013. Gen *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M en enterobacterias productoras de B-lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infección Intrahospitalaria. Rev. Investigación Clínica, 54 (3): 1-12.
- Hammond, D.; Schooneveldt, J.; Nimmo, G.; Huygens, F.; Giffard, P. 2005. Bla (SHV) Genes in *Klebsiella pneumoniae*: different allele distributions are associated with different promoters within individual isolates. Antimicrob Agents Chemother, 49:256-263.
- Ignacio, J. 2015. Resistencia bacteriana a los antibióticos: Una crisis global. Rev. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 33(10): 692-699.
- Jarlier, V.; Nicolas, MH.; Fournier, G.; Philippon, A. 1988. Extended broad spectrum Beta lactamases conferring transferable resistance to newer beta lactamases enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibilidad patterns. infect. 10(4): 867-878.
- Kassakian, Z.; Mermel, A. 2014. Changing epidemiology of infections due to extended spectrum betalactamase producing bacteria. Antimicrob resist Infect Control, 3(1): 3-9.
- Lespada, M.; Córdova, E.; Roca, V.; Gómez, N.; Badia, M.; Rodríguez, C. 2018. Bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* productora de Carbapenemasa tipo KPC. Estudio comparativo y Evolutivo en 7 años. Rev. Española de Quimioterapia, 32(1): 15-21.
- Liu Du, SX.; Zhang, JN.; Liu, SH.; Zhou, YY.; Wang, XR. 2019. Difusión de *Escherichia coli*ST131 y *Klebsiella pneumoniae* ST11 productoras de Betalactamasa de espectro extendido en pacientes con neumonía; un estudio de epidemiología molecular. China med journal 132(16): 1894-1902.
- Llontop, V. 2014. Manual de Microbiología Clínica. Cajamarca: Impresiones, Hospital II-Essalud.
- López, K.; Díaz, K.; Arminda, M.; Santamaría, O.; Serquén, L.; Canelo, B.; León, F.; Aguilar, F. 2018. Patrón de clonalidad mediante ERIC-PCR y REP-PCR de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido, aisladas de pacientes con infección urinaria intrahospitalaria. Hospital Regional Lambayeque, Perú. Rev. Horiz Med. 18(2): 11-18.
- López, D.; Torres, M.; Prada, C. 2015. Genes de resistencia en bacilos Gramnegativos: Impacto en la salud pública en Colombia. Rev. Universidad y Salud 18(1): 190-202.
- Martínez, V. 2014. Papel del lípido A de *Klebsiella pneumoniae* en el control de la respuesta inmune. Tesis doctoral, Universitat de Les Illes Balears, Palma de Mallorca, España.
- Mecanismos Moleculares de Resistencia Bacteriana. Centro de investigaciones de Enf. Infecc. Inst. Nacional de salud Pública de México 15 (3): 1-14.
- Mercier, J.; Levesque, R. 1990. Cloning of OHIO-1 and OXA-6 B-lactamases and cloning and sequencing of SHV-1 B-lactamase. Rev. Anticobial Agent and Chemotherapy 10: 1577-83.

- Pérez, D.; Bustamante, V. 2018. Crisis mundial por bacterias patógenas resistentes a antibióticos. *Biotechnología en movimiento UNAM*. 15: 3-5.
- Porres, N.; Azcona, M.; Rojo, B.; Undabeitia, E.; Torres, C.; Saenz, Y. 2014. Emergence of a multiresistant KPC3 and VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* strain in Spain. *Journal Antimicrob Chemother* 69: 1792-95.
- Quiñones, D. 2017. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". *Rev. Cubana de Medicina Tropical* 69 (3): 1-17.
- Ramírez, R.; Díaz, J. 2017. *Microbiología Clínica Básica*. Los Zafiro 244, La Victoria – Lima-Perú. 1era Edición. Libro Impreso en Jesús G. Bellido M. 63-103 pp.
- Rivera, M.; Rodríguez, C.; Flores, R.; Serquén, L.; Arce, Z. 2015. Betalactamasas de Espectro Extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella spp* y *Escherichia coli* Aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. *Rev peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 32 (4): 752-55.
- Rodríguez, E.; Saavedra, S.; Leal, A.; Álvarez, C.; Olarte, N.; Valderrama, A.; Cuervo, S.; Escobar, J. 2014. Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* de tipo KPC-3 en Hospitales de Bogotá durante un periodo de tres años. *Rev. Biomédica*. 34 (1): 224-31.
- Serra, M. 2017. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y la aplicación en la política antimicrobiana. *Rev. Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3): 402-19.
- Sturenburg, E.; Storm, N.; Sobottka, I.; Horskotte, M.; Scherpe, S.; Aepfelbacher, M. 2006. Detection and genotyping of SHV beta-lactamase variants by mass spectrometry after base-specific cleavage of in vitro generated RNA transcripts. *J Clin Microbiol*, 44: 909-915.
- Tamma, P.; Shahara, S.; Pana, Z.; Amoal, J.; Fisher, S.; Tekle, T.; Doi, Y.; Simne, P. 2019. Epidemiología molecular de cepas de enterobacterias no susceptible a ceftriaxona en un centro médico en los Estados Unidos. Agosto 18, 2019, de Foro abierto de Enfermedades infecciosas.
- Torres, C. 2012. La resistencia a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. *Academia de Farmacia "Reino de Aragón"* (Discurso de recepción académica) 1: 15-39.
- Velásquez, J.; Hernández, R.; Pamo, O.; Candiotti, M.; Pinedo, Y.; Sacaquispe, R.; Suárez, L.; Fernández, N. 2013. *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. *Rev Peru Med Interna*. 26(4):192-6.
- Wang, J.; Soisson, S.; Young, K.; Shoop, W.; Kodali, S.; Galgoci, A., Painter R., Parthasarathy G., Tang Y., Cummings R., Ha S., Dorso K., Motyl M., Jayasuriya H., Ondeyka J., Herath K., Zhang C., Hernandez L., Allocco J., Bailio A., Tormo J., Genilloud O., Vicente F., Pelaez F., Colwell L., Ho Lee S., Michael B., Felcetto T., Gill C., Silver L., Hermes J., Bartizal., Barrett J., Schmatz D., Becker J., Cully D & Singh S. 2006. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature Revc*. 441:358-361.
- Winn, H.; Allen, S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P.; Woods, G. 2006. *Diagnostic Microbiologic*. 6ta Edition, Edit. Panamericana. Madrid, España, 1475: 206-301.
- Zongo, K.; Dabire, A.; LG Compaore, L.; Sanou, I.; Sangare, L.; Simpore, J.; Zeba B. 2015. First detection of *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*CTX-M among gram negative bacilli exhibiting extended spectrum B-lactamase phenotype isolated at University hospital center, Yalgado Ouédraogo, Burkina Faso. *Rev. African Journal of Biotechnology*, 14 (14): 1174-1180.