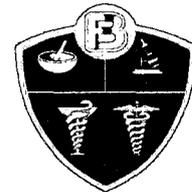




UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
POSTGRADO EN MICROBIOLOGÍA  
MÉRIDA-VENEZUELA



**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE FACTORES  
DE VIRULENCIA EN CEPAS EXTRAINTESTINALES DE  
*Escherichia coli* PRODUCTORAS DE  $\beta$ -LACTAMASAS CTX-M**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



**Autora**

Licda. Beatriz Leonor Quiroz Buelbas

**Tutora**

Prof<sup>a</sup>. María del Carmen Araque

**SERBIULA**

*Tullo Febres Cordero*

NOVIEMBRE-2012

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela  
(CC BY - NC - SA 3.0 VE )

**DONACION**

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
POSTGRADO EN MICROBIOLOGÍA  
MÉRIDA-VENEZUELA**

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE FACTORES  
DE VIRULENCIA EN CEPAS EXTRAINTESTINALES DE  
*Escherichia coli* PRODUCTORAS DE  $\beta$ -LACTAMASAS CTX-M**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Como requisito parcial para optar al grado de  
Especialista en Microbiología Clínica

**Autora**

Licda. Beatriz Leonor Quiroz Buelbas

**Tutora**

Prof<sup>a</sup>. María del Carmen Araque

NOVIEMBRE-2012

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela  
(CC BY - NC - SA 3.0 VE )

## RESUMEN

### Caracterización genética de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichiacoli* productoras de $\beta$ -lactamasas CTX-M

Licda. Beatriz Leonor Quiroz Buelbas  
Tutora: Prof<sup>a</sup>. María del Carmen Araque

*E. coli* es el microorganismo asociado con mayor frecuencia a infecciones extraintestinales adquiridas en la comunidad y a nivel hospitalario, debido a que genéticamente está dotada de diversos factores de virulencia que le permiten producir una gran diversidad de infecciones en áreas anatómicas distintas a la de su reservorio intestinal. Adicionalmente, la presencia de mecanismos de resistencia como las  $\beta$ -lactamasas de espectro expandido (BLEE), incrementa su potencial de patogenicidad y diseminación. En Venezuela son escasos los trabajos que han estudiado la virulencia en cepas extraintestinales de *E. coli* productoras de BLEE tipo CTX-M y su relación con la fisiopatogenia de la infección, especialmente la sepsis nosocomial. Por tanto, el presente estudio tuvo como objetivo determinar genéticamente los factores de virulencia de 22 cepas extraintestinales de *E. coli* productoras de BLEE tipo CTX-M, provenientes de neonatos con septicemia nosocomial recluidos en el Hospital Central Universitario "Dr. José María Vargas" de San Cristóbal, Estado Táchira. A estas cepas se les determinó el patrón de susceptibilidad antimicrobiana por concentración inhibitoria mínima y la detección fenotípica de BLEE de acuerdo a lo establecido por CLSI (2011). El análisis genotípico de los genes *bla* (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>) y los de virulencia (*fimH*, *kpsMTII*, *papAH*, *PAI*, *fyuA*, *usp*) se realizó mediante la técnica de amplificación por la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y secuenciamiento. La transferencia genética de los genes *bla* se realizó por conjugación y la relación o diversidad clonal de las cepas se determinó por la técnica de Rep-PCR. Los resultados evidenciaron perfiles compatibles con la producción de BLEE en las ExPEC, con resistencia a los aminoglucósidos, con un predominio del patrón III. La detección genotípica de BLEE reveló una alta prevalencia de la enzima CTX-M, con predominio del subgrupo CTX-M-1. El análisis de secuencias de los genes CTX-M-1 confirmó que pertenecían a la enzima CTX-M-15. La transferencia conjugativa de genes *bla*<sub>BLEE</sub>, corroboró en el 36,4% que la presencia de la resistencia por producción de BLEE CTX-M y TEM está codificada en plásmidos transferibles. La investigación de 6 genes de virulencia demostró que los factores relacionados *fimH*, *fyuA*, *kpsMTII* y *PAI* fueron los más frecuentes. Con un predominio del patrón tipo II conformado por la variante IIa y IIb, constituidos por un solo factor de virulencia asociados a los diversos genes *bla* detectados. La tipificación por Rep-PCR no demostró relación clonal. Este es el primer reporte que señala la circulación de ExPEC productoras de CTX-M y su asociación con genes de virulencia.

## ***A mis padres***

***Por ser los mejores maestros que la vida me dió, este trabajo se los dedico a ellos con todo mi amor. Gracias por siempre estar allí y brindarme su amor incondicional.***

## **Agradecimientos**

A la Dra. María del Carmen Araque, por su incondicional apoyo, dedicación, orientación, enseñanzas, consejos y sobre todo por el enorme interés en el desarrollo de este trabajo de grado. Mis más sinceros agradecimientos.

A la Licda. Beatriz Millán, por su apoyo, orientación y enseñanzas durante mi estancia en el Laboratorio de Microbiología Molecular.

Agradezco el apoyo para el desarrollo de este trabajo, por parte de la Licda. Belkis Garzón Coordinadora del Laboratorio de Microbiología del Hospital Central Universitario "Dr. José María Vargas" de San Cristóbal Edo. Táchira, y el Centro de Secuenciación y Procesamiento de Ácidos Nucleicos del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

A mis profesores del postgrado por compartir conmigo sus conocimientos, gracias por su apoyo en mi formación académica y profesional.

A mis compañeras de postgrado Yoerlinda, Cynthia y Eliana por su compañerismo, apoyo y amistad. Mil gracias!!!

A mis padres y mi hermano, por todo su apoyo y amor incondicional. Los quiero!!!

## ÍNDICE

<b>Índice de Tablas</b> .....	ix
<b>Índice de Figuras</b> .....	x
<b>Introducción</b> .....	1
<b>Hipótesis</b> .....	4
<b>Objetivos</b>	
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos.....	5
<b>Marco Teórico</b>	
1. <i>Escherichia coli</i> .....	6
1.1 Características microbiológicas.....	6
1.2 Hábitat.....	7
2. Estructura antigénica y factores de virulencia.....	8
2.1 Estructura antigénica.....	9
2.2 Filogenia y factores de virulencia.....	10
3. Resistencia de <i>E. coli</i> a los antibióticos $\beta$ -lactámicos.....	15
3.1 Antibióticos $\beta$ -lactámicos.....	15
3.2 Resistencia a los $\beta$ -lactámicos.....	16
3.2.1 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).....	18
3.2.2 Tipos de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).....	19
3.2.2.1 TEM.....	19
3.2.2.2 SHV.....	19
3.2.2.3 CTX-M.....	21
3.2.2.4 OXA.....	22
4. Importancia clínica y epidemiológica de <i>E. coli</i> productoras de BLEE.....	23
5. Tipificación y epidemiología molecular de <i>E. coli</i> productora de BLEE.....	27

## **Materiales y Métodos**

1. Cepas bacterianas.....	29
2. Reactivación de las cepas.....	29
3. Caracterización fenotípica.....	29
3.1 Confirmación de la identificación microbiológica.....	29
3.2 Detección fenotípica de BLEE y AmpC y la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana.....	30
4. Caracterización genética.....	34
4.1 Extracción del ADN.....	34
4.2 Detección de los genes <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , y <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .....	34
4.3 Detección de los genes <i>bla</i> <sub>CTX M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX M-2</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX M-8</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX M-9</sub> y <i>bla</i> <sub>CTX M-25</sub> .....	35
4.4 Transferencia conjugativa de genes que codifican para BLEE.....	38
4.5 Detección genética de genes de virulencia <i>fimH</i> , <i>kpsMTII</i> , <i>papAH</i> , <i>PAI</i> , <i>fyuA</i> , y <i>usp</i> .....	40
4.6 Secuenciación de genes <i>bla</i> y de virulencia.....	43
5. Determinación de la relación o diversidad clonal mediante Rep-PCR.....	43

## **Resultados**

1. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana y detección fenotípica de BLEE y AmpC.....	46
2. Detección genotípica de BLEE.....	48
3. Transferencia conjugativa de genes que codifican para la BLEE.....	51
4. Detección genética de genes de virulencia.....	52
5. Análisis de la secuenciación de genes <i>bla</i> y de virulencia.....	57
6. Tipificación de las cepas ExPEC por Rep-PCR.....	57

<b>Discusión</b> .....	60
------------------------	----

<b>Conclusiones</b> .....	67
---------------------------	----

<b>Recomendaciones</b> .....	69
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	70

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales factores de virulencia de <i>E. coli</i> causante de infecciones extraintestinales.....	14
<b>Tabla 2.</b> Principales genes de virulencia de <i>E. coli</i> causante de infecciones extraintestinales.....	15
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de las $\beta$ -lactamasas bacterianas.....	20
<b>Tabla 4.</b> Iniciadores empleados en la amplificación de los genes de BLEE tipo: TEM, SHV y CTX-M.....	36
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de amplificación de los genes <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , y <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .....	37
<b>Tabla 6.</b> Iniciadores empleados en la amplificación por PCR de los genes de virulencia <i>fimH</i> , <i>kpsMTII</i> , <i>papAH</i> , <i>PAI</i> , <i>fyuA</i> , y <i>usp</i> ..	41
<b>Tabla 7.</b> Condiciones para la amplificación por PCR de los genes de virulencia <i>fimH</i> , <i>kpsMTII</i> , <i>papAH</i> , <i>PAI</i> , <i>fyuA</i> , y <i>usp</i> .....	42
<b>Tabla 8.</b> Determinación de la CIM en las cepas de <i>E. coli</i> en estudio.....	47
<b>Tabla 9.</b> Distribución de los patrones de resistencia asociados a la presencia de BLEE en las cepas de estudio.....	48
<b>Tabla 10.</b> Asociación de genes TEM y CTX-M en las cepas de <i>E. coli</i> en estudio.....	50
<b>Tabla 11.</b> Distribución de los genes de virulencia aislados en las cepas de <i>E. coli</i> en estudio.....	53
<b>Tabla 12.</b> Distribución de las asociaciones de genes de virulencia encontradas en las cepas de <i>E. coli</i> en estudio.....	55
<b>Tabla 13.</b> Distribución de los perfiles de genes de virulencia asociados a los genes BLEE en las cepas estudiadas.....	56
<b>Tabla 14.</b> Diversidad clonal y características fenotípicas y genéticas de las cepas ExPEC estudiadas.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tinción de gram <i>E. coli</i> .....	6
<b>Figura 2.</b> Esquema de la pared celular de <i>E. coli</i> .....	8
<b>Figura 3.</b> Infecciones causadas por <i>E. coli</i> .....	11
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de resistencia a los antibióticos $\beta$ - lactámicos.....	17
<b>Figura 5.</b> Prueba del doble disco, para la detección fenotípica de BLEE.....	31
<b>Figura 6.</b> Prueba de sinergia con discos de ácido 3- aminofenilborónico (APB) y cefoxitina (FOX), para la detección fenotípica de BLEE AmpC.....	32
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática del método de concentración inhibitoria mínima (CIM) por dilución en agar.....	33
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de la transferencia de los determinantes de resistencia BLEE.....	39
<b>Figura 9.</b> Representación de la detección fenotípica de BLEE (+) y AmpC (-) (área superior e inferior, respectivamente).....	46
<b>Figura 10.</b> Distribución de las $\beta$ -lactamasas TEM, SHV y CTX-M en las cepas de estudio.....	49
<b>Figura 11.</b> Distribución de los subgrupos de la familia CTX-M en las cepas de estudio.....	49
<b>Figura 12.</b> Gel electroforético representativo de la detección del gen <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> general por amplificación PCR.....	50
<b>Figura 13.</b> Gel electroforético representativo de la amplificación por PCR del gen <i>bla</i> <sub>TEM</sub> .....	51
<b>Figura 14.</b> Representación de la detección fenotípica de BLEE (+) en las células transconjugantes obtenidas (área superior SCT12 e inferior SCT13).....	51
<b>Figura 15.</b> Gel electroforético representativo de la PCR CTX-M general de las células transconjugantes obtenidas.....	52

<b>Figura 16.</b> Gel electroforético representativo de la PCR TEM de las células transconjugantes obtenidas.....	52
<b>Figura 17.</b> Distribución de los genes de virulencia de acuerdo al numero presente en las cepas de estudio.....	53
<b>Figura 18.</b> Gel electroforético representativo de la amplificación por PCR múltiple de los genes que codifican los factores de virulencia <i>PAI</i> , <i>fimH</i> y <i>KpsMTII</i> .....	54
<b>Figura 19.</b> Gel electroforético representativo de la amplificación por PCR del gen que codifica el factor de virulencia <i>fyuA</i> .....	54
<b>Figura 20.</b> Gel electroforético representativo de la Rep-PCR de las cepas de ExPEC en estudio.....	58
<b>Figura 21.</b> Dendograma que muestra la relación genética de las 22 cepas de ExPEC incluidas en el estudio.....	58

www.bdigital.ula.ve

## INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* es uno de los microorganismos gramnegativos más frecuentemente aislados en infecciones extraintestinales. Las cepas de *E. coli* con capacidad de producir infecciones extraintestinales son denominadas ExPEC (del inglés *Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli*). Estas se encuentran formando parte de la flora intestinal y no causan infecciones diarreicas. *E. coli* produce una variedad de patologías extraintestinales, tales como: infecciones urinarias, bacteriemias y sepsis adquiridas en la comunidad, principalmente en adultos. También se le considera a esta bacteria la causa infecciosa principal de meningitis y de septicemia neonatal. De igual forma, aunque en menor frecuencia *E. coli* se ha aislado en infecciones intraabdominales, neumonía nosocomial, osteomielitis, celulitis entre otras patologías (Soto, 2006).

La capacidad de ExPEC de producir infección se debe a que genéticamente está dotada de diversos factores de virulencia que hacen posible la infección en áreas anatómicas distintas a la intestinal. Entre los factores de virulencia de las cepas ExPEC se encuentran: los implicados en la adherencia a las células del hospedero o factores colonizantes tales como: fimbrias P (*papC*, *papE/F* y *papG*), fimbria tipo 1 (*fimH*), fimbrias S (*sfaC/D*), adhesinas (*afaB/C*), cápsula tipo II (*kpsMTII*); mecanismos para la adquisición de nutrientes: aerobactina (*iucD*, *fyuA*), enzimas: proteína uropatógena específica (*usp*) y toxinas como: factor citotóxico

necrotizante tipo I (*cnf-1*),  $\alpha$ -hemolisina (*hly*) y toxina de distensión citoletal (*cdtB*). La expresión de uno o varios genes de patogenicidad en las cepas de ExPEC está determinado por las regulaciones genéticas que se pongan en juego durante la dinámica de la infección (Blanco y col., 1995; Soto, 2006; Ananias y Yano, 2008; karisik y col., 2008; Ribeiro y col., 2008).

Las cepas *E. coli* son clasificadas en 4 grupos filogenéticos: A, B1, B2, y D. Esta clasificación se fundamenta en las variaciones alélicas de genes codificantes de enzimas, las cuales son detectadas a través del sistema *multilocus enzyme electrophoresis*. Sin embargo, en la actualidad la caracterización del grupo filogenético de una cepa puede determinarse por pruebas rápidas y sencillas como amplificación por PCR-múltiple (*del inglés polimerase chain reaction*). Las cepas ExPEC pertenecen en su mayoría al grupo filogenético B2 y en menor frecuencia al D. Estos grupos son considerados como los más patógenos debido a la presencia de un número mayor de factores de virulencia (Soto, 2006).

Otro aspecto que incrementa la frecuencia de la infección por ExPEC, es la aparición de cepas con capacidad de resistir a la acción de potentes antimicrobianos como las cefalosporinas de amplio espectro. Este fenómeno se debe a que estas cepas, producto de la presión selectiva ejercida por el uso y abuso de los antibióticos, tienen la capacidad de producir  $\beta$ -lactamasas de espectro expandido (BLEE), además de asociarse a otros mecanismos que median la resistencia a otros grupos

de antibióticos diferentes a los  $\beta$ -lactámicos (Cortés y col., 2006; Lezameta y col., 2010; García y col., 2011).

Actualmente se reconocen más de trescientos tipos de BLEE, destacándose en este grupo la familia CTX-M, considerada como la más ampliamente diseminada en el mundo. Estas enzimas son capaces de hidrolizar eficientemente antimicrobianos como cefotaxima, y pueden conferir a las bacterias altos niveles de resistencia contra otras cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima), monobactámicos y niveles variables de resistencia contra cefalosporinas de cuarta generación (Cortés y col. 2006; Mantilla y col. 2009; García y col. 2011). Estudios de vigilancia epidemiológica posicionan a ExPEC como las cepas con mayor porcentaje en la producción de BLEE de tipo CTX-M (Pitout, 2010).

En Venezuela son escasos los estudios que relacionan la carga de factores de virulencia y los marcadores de resistencia en los procesos de colonización e infección de patógenos bacterianos. En este contexto y desde el punto de vista clínico-epidemiológico, se considera importante evaluar la presencia de diversos factores de patogenicidad en cepas de ExPEC productoras CTX-M, involucradas en la fisiopatogenia de la septicemia nosocomial en neonatos reclusos en el Hospital Central Universitario "Dr. José María Vargas" de San Cristóbal, Estado Táchira, Venezuela.

## HIPÓTESIS

Las cepas extraintestinales de *E. coli* productoras de CTX-M poseen diversos genes de virulencia que favorecen la fisiopatología de la septicemia nosocomial en neonatos recluidos en el Hospital Central Universitario "Dr. José María Vargas" de San Cristóbal, Estado Táchira.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## OBJETIVO GENERAL

Determinar genéticamente los factores de virulencia en una colección de cepas extraintestinales de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas CTX-M, provenientes de neonatos con septicemia nosocomial recluidos en el Hospital Central Universitario “Dr. José María Vargas” de San Cristóbal, Estado Táchira.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

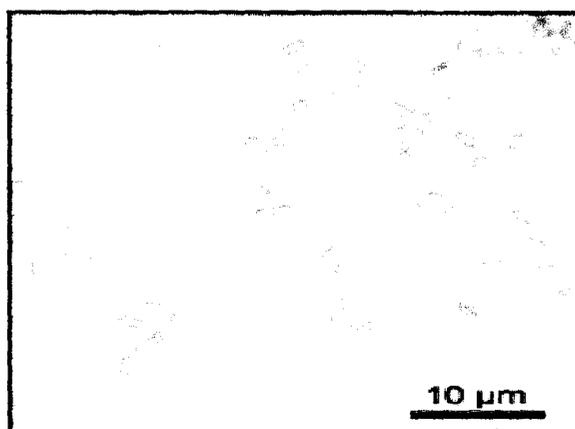
- Establecer los patrones de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos por Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).
- Detectar fenotípicamente la producción de BLEE y AmpC por la prueba del doble disco.
- Detectar la presencia de genes que codifican para la producción de BLEE, mediante la amplificación por PCR de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *bla*<sub>CTX-M-25</sub>.
- Detectar la presencia de genes de virulencia, mediante la amplificación por PCR de los genes *fimH*, *kpsMTII*, *papAH*, *PAI*, *fyuA*, y *usp*.
- Determinar la transferencia conjugativa de genes que codifican para BLEE.
- Relacionar el perfil de patogenicidad y la producción de  $\beta$ -lactamasa CTX-M en las cepas de estudio.
- Establecer la relación o diversidad clonal de las cepas de estudio mediante la técnica Rep-PCR.

## MARCO TEÓRICO

### 1. *Escherichia coli*

#### 1.1 Características microbiológicas

*E. coli* es una de las bacterias más estudiadas, y la especie mayormente descrita como causa de patología en los seres humanos, donde ha sido involucrada en enfermedades infecciosas que afectan cualquier tejido y sistema orgánico. Esta bacteria fue descrita por primera vez por Theodore Von Escherich en 1885, el cual la denominó *Bacterium coli commune*, posteriormente la denominaron *Escherichia coli* en su honor. Desde el punto de vista taxonómico *E. coli* pertenece al Reino Protista, Filo Proteobacteria, Clase Gammaproteobacteria, Orden Enterobacteriales, Familia *Enterobacteriaceae*, Género *Escherichia*, Especie *E. coli* (Fig. 1) (Winn y col., 2008; [www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy)).



**Figura 1. Tinción de gram *E. coli*.** Fuente: Técnico enfermería, (2009) disponible en:

[www.tecnicoenfermeria.com/2009/09/uso-de-tinciones-en-microorganismos.php](http://www.tecnicoenfermeria.com/2009/09/uso-de-tinciones-en-microorganismos.php).

*E. coli* es un bacilo gramnegativo, corto de 0,4 – 0,7 µm de diámetro y de 1 – 4 µm de longitud, anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos o inmóvil, catalasa positiva, oxidasa negativa, no forma esporas, produce ácido y gas a partir de la glucosa, reduce el nitrato a nitrito, normalmente fermenta la lactosa y el manitol, produce indol a partir del triptófano, descarboxila la lisina, siendo negativa a la reacción de Vorges-Proskauer, ureasa, fenilalanina desaminasa y citrato (Rodríguez, 2002; Cortés y col., 2006; Martínez y col., 2007).

## **1.2 Hábitat**

*E. coli* es la especie predominante de la flora comensal aerobia y anaerobia facultativa del tracto gastrointestinal de animales y humanos, eliminándose al exterior por las heces. Por esto, frecuentemente se le encuentra en el medio ambiente, son capaces de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente (Máttar y col., 2001).

Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento, siendo la bacteria ingerida con el agua y alimentos u obtenida directamente de otros individuos (Rodríguez, 2002; Sousa, 2006; Weintraub, 2007).

## 2. Estructura antigénica y factores de virulencia

La pared celular de *E. coli*, está formada por una bicapa lipídica, conocida como membrana externa que consiste en una doble capa de fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS), estos últimos están formados químicamente por dos componentes: un componente llamado "lípidio A" y otro, "polisacárido O" o antígeno somático, el cual se proyecta fuera de la membrana exterior y proporciona los sitios para la unión de anticuerpos, confiriéndole de esta manera especificidad antigénica. Esta membrana externa se separa del peptidoglicano por un espacio denominado periplásmico, este espacio es un compartimiento en el que se encuentran diversas enzimas hidrolíticas. El peptidoglicano se encuentra entre la membrana citoplasmática y la membrana externa y está constituido por residuos alternantes de N-acetilglucosamina (NAG) y N-acetilmurámico (NAM), cadenas laterales tetrapeptídicas, con residuos L y D aminoácidos y un puente péptico (Barrios, 1988; Murray y col., 2009).

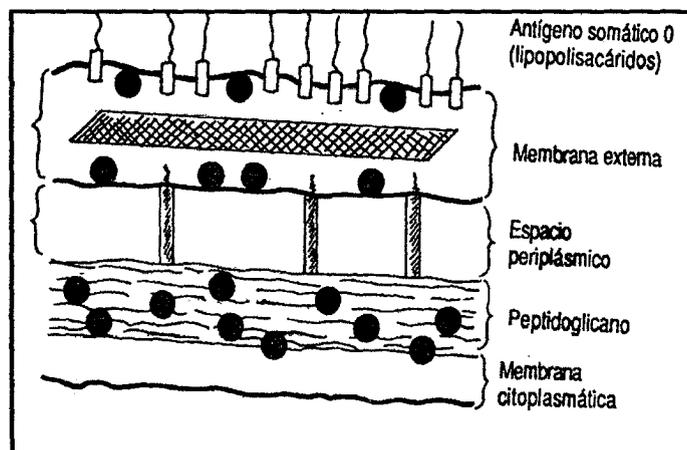


Figura 2. Esquema de la pared celular de *E. coli*. Fuente: Barrios, (1988).

Además de las características inmunogénicas del antígeno O del LPS, las proteínas formadoras de los flagelos en las cepas móviles y la cápsula de las cepas que la producen son entre otros, los elementos antigénicos conocidos como el antígeno H y el antígeno K, respectivamente. De acuerdo a esto tres tipos de antígenos se ha establecido la estructura antigénica de *E. coli* y su clasificación serotípica (Pacheco y Felipe, 1991; Máttar y col., 2001; Rodríguez, 2002).

## 2.1 Estructura antigénica

- Antígenos somáticos (O), están constituidos por cadenas de polisacárido procedente del LPS capsular, es el que le confiere la especificidad serológica.
- Antígenos flagelares (H) son proteínas que se localizan en los flagelos.
- Antígenos capsulares (K) presente en cepas con cápsula, constituyen una barrera defensiva disminuyendo la capacidad de los anticuerpos para unirse a la bacteria, son un factor de virulencia fundamental, porque impide la fagocitosis. Los antígenos capsulares (K) polisacáridos se han dividido a su vez en tres clases: L, A, y B (Máttar y col., 2001; Rodríguez, 2002).

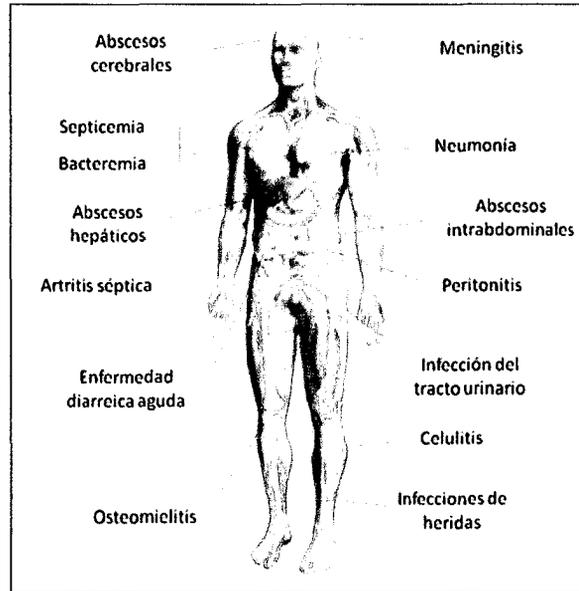
En la actualidad se reconocen 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H), y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H)

indica el serotipo, el cual en ocasiones puede asociarse con un cuadro clínico en particular (Rodríguez, 2002).

## **2.2 Filogenia y factores de virulencia**

Los factores de virulencia, son todas las estructuras o productos bacterianos que intervienen en el proceso infeccioso. La capacidad de las cepas patógenas de *E. coli* para causar los distintos tipos de enfermedades intestinales y extraintestinales (Fig. 3) procede de la expresión de múltiples factores de virulencia incluyendo: fimbrias, adhesinas, sideróforos, toxinas, entre otros, que le permiten invadir órganos, evadir la respuesta inmune y producir un estado tóxico en el paciente (Blanco y col., 1995; Soto, 2006; Ananias y Yano, 2008).

No todas las cepas de *E. coli* poseen la misma capacidad para causar enfermedad, por lo que el tipo de interacción resultante entre el microorganismo y hospedador, permite clasificar las cepas de *E. coli* como comensales o saprófitos y patógenas. A su vez son frecuentemente clasificados en patotipos de acuerdo con el tipo de enfermedad que causan y por el conjunto de factores de virulencia que posea (Máttar y col., 2001; Rodríguez, 2002; Sousa, 2006; De Mello y col., 2009).



**Figura 3. Infecciones causadas por *E. coli*.** Fuente: TUM. (S/F) disponible en: <http://www.doping-prevention.de/es/human-body/> (Modificado).

*E. coli* pueden ser asignada a uno de los cuatro principales grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D, los cuales fueron identificados en función de la variación alélica de genes codificantes de enzimas detectadas por *multilocus enzyme electrophoresis*. Hoy en día, la caracterización del grupo filogenético de una cepa se hace por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR-múltiple). Así, las cepas comensales (sin potencial patógeno) de *E. coli* pertenecen en su mayoría a los grupos filogenéticos A y B1 y se caracterizan por carecer de muchos de los determinantes de virulencia que están presente en las cepas patógenas. Las cepas comensales constituyen la mayor población de la microbiota fecal, donde se encuentran adaptadas a una pacífica convivencia con el hospedador, sin causar enfermedad intestinal y sólo producen infección extraintestinal cuando existen

factores favorables de riesgo por parte del hospedero humano. Las cepas causantes de infección intestinal se incluyen en los grupos filogenéticos A, B1 y D o en linajes no clasificados y según el cuadro clínico que provocan se han clasificado en 6 categorías de *E. coli* causantes de enfermedad diarreica aguda (DEA): *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* con adherencia difusa o enteroadherente (DAEC). Los seis patotipos intestinales de *E. coli* tienen características únicas en sus interacciones con las células del hospedero (Máttar y col., 2001; Rodríguez, 2002; Andreu, 2005; Soto, 2006; Karisik y col., 2008; De Mello y col., 2009).

Por otra parte, las cepas causantes de enfermedad extraintestinal, como infecciones del tracto urinario, septicemia, meningitis, conocidas con el acrónimo ExPEC pertenecen en su mayoría al grupo filogenético B2 y en menor frecuencia al D. Estas cepas son conocidas con designaciones más restrictivas para patotipos causantes de síndromes específicos. Así, *E. coli* asociada a meningitis es conocida como MNEC, las asociadas a sepsis son llamadas SEPEC y las uropatógenas como UPEC. Estas cepas comparten muchos factores de virulencia, además algunos clones pueden causar varios tipos de infección (Soto, 2006; Ananias y Yano, 2008; De Mello y col., 2009).

Entre los factores de virulencia presentes en la mayoría de las cepas ExPEC, destacan los factores implicados en la adherencia de las bacterias a las células o adhesinas (fimbrias tipo S y fimbrias tipo P), factores que permiten evitar o sobrevivir a los sistemas de defensa del hospedero (como cápsulas y lipopolisacáridos), mecanismos de adquisición de nutrientes (siderófos, sistemas de adquisición de hierro), mecanismos de resistencia al suero, proteasas, invasinas y toxinas (hemolisina y factor citotóxico necrosante) (Tabla 1) (Blanco y col., 1995; Soto, 2006; Ananias y Yano, 2008; Karisik y col., 2008; Ribeiro y col., 2008).

Los genes de virulencia de ExPEC, están frecuentemente localizados en plásmidos, transposones, bacteriófagos o islas de patogenicidad (IP) que son elementos genéticos móviles que pueden transmitirse vertical y horizontalmente de una cepa a otra. Además pueden albergar genes relacionados con resistencia a los antimicrobianos, tales como  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Soto, 2006; Ananias y Yano, 2008; Karisik y col., 2008; Ribeiro y col., 2008; Zalewska y col., 2009).

Los principales genes de virulencia descritos para ExPEC son los relacionados con las adhesinas (fimbrias), toxinas, sideróforos y capsulares. Sin embargo, también han sido descritos otros genes de virulencia entre los que destacan el gen que codifica la invasión de las células endoteliales de la microvasculatura cerebral (*ibeA*), resistencia al suero (*traT*), colicina V (*cvaC*), proteínas uropatógenas específicas (*usp*) entre otros (Soto, 2006; Karisik y col., 2008).

**Tabla 1. Principales factores de virulencia de *E. coli* causante de infecciones extraintestinales.**

Superficie		Función
Adhesinas	Fimbriadas	Fimbrias P (alelos I, II y III) Fimbria tipo 1 Fimbria F1C Fimbria S
	No fimbriadas (adhesinas X)	Adhesinas del antígeno Dr Adhesinas AFA y AFAIII Adhesina M
Flagelo		Movilidad y adaptación
Mecanismos evasores de las defensas del hospedero	Cápsula	K1, K2, K13, K5
	Lipopolisacáridos	O6, O4, O1, O2, O18, O83, O7
	Proteínas de membrana externa	
	Resistencia al suero	Proteína TraT *Plásmidos Col V
		Efecto antifagocitario, anticomplemento, resistencia al suero y evasión del sistema inmune
		Efectos endotóxicos, antígeno O, inducción de citoquinas, resistencia al suero, inmunoadyuvante
		Receptor y transporte
		*Aumenta la virulencia de la bacteria
Exportado		Función
Toxinas	$\alpha$ -hemolisina	
	Factor citotóxico necrosante	
	Toxina citoletal distensiva	
	Citolisina A	
Sistema de captación de hierro (sideróforos)	Toxina secretada autotransportadora	
	Aerobactina	
	Yersiniabactina	
Invasinas	Enterobactina	
	Invasinas del endotelio cerebral	Antígeno K1
		Citotoxicidad, hemólisis
		Interferencia en la fagocitosis y apoptosis
		Citotoxicidad
		Captación de hierro
		Permite la invasión de cepas de <i>E. coli</i> al sistema nervioso central de neonatos

Fuente: Pacheco y Felipe, (1991); Emödy y col., (2003); Andreu, (2005).

**Tabla 2. Principales genes de virulencia de *E. coli* causante de infecciones extraintestinales.**

Factor de virulencia	Factor relacionado	Genes
Adhesinas	Fimbria tipo 1	<i>fimH</i>
	Fimbria S	<i>sfaD/E</i>
	Fimbria P	<i>papC</i>
	Adhesina no fimbriadas Adhesina no fimbriadas -3 Adhesina no fimbriadas -8	<i>afaB/C</i> <i>afaB/C III</i> <i>afaE-8</i>
	Adhesina fimbriadas P	<i>papG</i> (alelos I, II y III)
Cápsula	Grupo capsular 2 (K1/K5) Grupo capsular 3	<i>kpsMTII</i> <i>kpsMTIII</i>
Siderofos	Aerobactina	<i>iucD</i>
	Yersiniabactina	<i>fyuA</i>
	Salmochelina	<i>iroN</i>
Toxinas	Hemolisina	<i>hlyA</i>
	Factor citotóxico necrosante tipo 1	<i>cnf1</i>
	Toxina secretada autotransportadora	<i>sat</i>
	Toxina citoletal distensiva	<i>cdtb</i>
Varios	Invasinas del endotelio cerebral	<i>ibeA</i>
	Resistencia al suero aumento de resistencia al suero	<i>traT</i> <i>iss</i>
	Colicina V (bacteriocina)	<i>cvaC</i>
	Proteasa T (proteína de membrana externa)	<i>ompT</i>
	Proteínas uropatógenas específica	<i>usp</i>
	Adhesina homóloga a <i>irga</i> de <i>Vibrio cholerae</i>	<i>iha</i>
	Adhesina específica del grupo sanguíneo M	<i>bmaE</i>

Fuente: Ananías y Yano, (2008); Karisik y col., (2008); De Mello y col., (2009).

### 3. Resistencia de *E. coli* a los antibióticos $\beta$ -lactámicos

#### 3.1 Antibióticos $\beta$ -lactámicos

Uno de los grupos de antibióticos más importantes, desde el punto de vista histórico como clínico, es el grupo de los  $\beta$ -lactámicos, los cuales se han empleado en el tratamiento de infecciones bacterianas debido a su baja toxicidad y a su amplio espectro bacteriano (Perozo y col., 2007).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos constituyen una amplia familia, en la que se incluye a las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenemos y monobactámicos, entre otros antibióticos clínicamente útiles. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son antibióticos de acción bactericida, que actúan sobre la fase final de la síntesis del peptidoglicano, impidiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, a través de la inactivación de una o varias proteínas (transpeptidasas) de unión a penicilina (PBP); esto es debido a la similitud estructural que presenta con el extremo D-alanina-D-alanina del pentapéptido que enlaza las cadenas de *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina del peptidoglicano (Perozo y col., 2007; García y col., 2011).

En presencia del antibiótico, las transpeptidasas hidrolizan el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico y se forma un éster estable entre el compuesto hidrolizado y un grupo hidroxilo de la serina del sitio activo de enzima, con ello se inhibe la transpeptidación, se desestabiliza la pared celular y finalmente se produce la lisis bacteriana mediada por autolisinas (Araya y col., 2007; García y col., 2011).

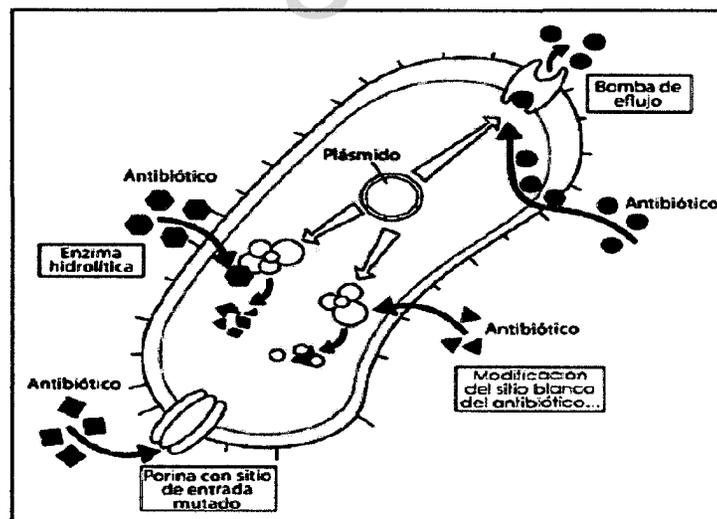
### **3.2 Resistencia a los $\beta$ -lactámicos**

La resistencia bioquímica a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se puede atribuir a cuatro mecanismos principales:

1. Alteración de la diana (PBP)
2. Disminución de la permeabilidad

3. Mecanismos de eflujo o expulsión del antibiótico
4. Inactivación enzimática por  $\beta$ -lactamasas
  - a.  $\beta$ -lactamasas cromosómicas
  - b.  $\beta$ -lactamasas plasmídicas
    - b.1  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

El mecanismo de resistencia más utilizado por los bacilos gramnegativos para adquirir resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, ya sea de manera natural o adquirida, es la inactivación de las drogas por las enzimas denominadas  $\beta$ -lactamasas. Estas enzimas hidrolizan el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico, formando compuestos inactivos (Zemelman y col., 2002; Perozo y col., 2007; García y col., 2011).



**Figura 4. Mecanismos de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.**

Fuente: Moreno y col., (2009).

### 3.2.1 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las BLEE son enzimas que hidrolizan las penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos. Son inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam y no afectan las cefamicinas, ni los carbapenemos (Morales, 2003; González y col., 2007; De Oliveira y col., 2009; Lezameta y col., 2010). Las BLEE han evolucionado como resultado de mutaciones en el centro activo de las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas clásicas TEM y SHV excepto la CTX-M. Estas mutaciones originan cambios en la secuencia de la cadena aminoacídica, como respuesta a la presión ejercida por el amplio uso de las cefalosporinas de tercera generación, permitiendo modificar su perfil de sustrato, mejorando su capacidad de hidrólisis frente a los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro. Estas enzimas son principalmente codificadas por elementos extracromosómicos como los plásmidos (Cortés y col., 2006; Perozo y col., 2007; García y col., 2011).

Las BLEE son clasificadas de acuerdo con dos sistemas generales, el de Ambler (1980) basado en la estructura molecular (secuencia de aminoácidos) y el de Bush, Medeiros y Jacoby (1995), sustentado en similitudes funcionales (sustratos, propiedades fenotípicas) (Cortés y col., 2006; Lezameta y col., 2010). De acuerdo con el esquema de Ambler las  $\beta$ -lactamasas pueden dividirse en cuatro clases moleculares diferentes (A, B, C y D), cada una con una secuencia de aminoácidos distinta, donde las BLEE derivadas de SHV y TEM pertenecen a las enzimas de

clase A, mientras que las BLEE derivadas de OXA pertenecen a la clase D (Tabla 3). En la clasificación de Bush, Medeiros y Jacoby, las BLEE se localizan en dos subgrupos del grupo 2, llamados 2be y 2d, en los cuales se ubican las BLEE derivadas de TEM, SHV y CTX-M y las derivadas de OXA, respectivamente (Cortés y col., 2006).

### 3.2.2 Tipos de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

**3.2.2.1 TEM:** Las  $\beta$ -lactamasas TEM-1 se encuentran diseminadas en todo el mundo, y son en la actualidad, el mecanismo de resistencia más común de las bacterias gramnegativas al grupo de los  $\beta$ -lactámicos, aislándose con mayor frecuencia en cepas de *E. coli* y en *Klebsiella pneumoniae*. La detección de la enzima TEM-1 se reportó por primera vez en 1965 a partir de un aislado de *E. coli*. En la actualidad existen al menos unas 150  $\beta$ -lactamasas tipo TEM (Cortés y col., 2006; Harada y col., 2008).

**3.2.2.2 SHV:** La mayoría de las enzimas SHV se encuentran en cepas de *K. pneumoniae*. Sin embargo, también se han identificado en *Citrobacter diversus*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. En la actualidad existen alrededor de 100 tipos diferentes de SHV. La enzima progenitora, SHV-1, sólo tiene actividad contra penicilinas de amplio espectro, y las cefalosporinas de espectro reducido como cefalotina y cefaloridina pero, como resultado de mutaciones puntuales, su espectro ha sido ampliado a cefalosporinas de tercera generación, denominándose así SHV-2. Esta enzima fue

descrita por primera vez en Alemania en 1983, a partir de una cepa de *Klebsiella ozaenae* (Cortés y col., 2006; González y col., 2007; Harada y col., 2008).

**Tabla 3. Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas bacterianas.**

$\beta$ -lactamasa	Bush, Medeiros y Jacoby	Molecular (Ambler)	Familias de $\beta$ -lactamasas	Sustrato
Espectro ampliado	2b	A	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Bencilpenicilinas, Aminopenicilinas, Carboxipenicilinas, Ureidopenicilinas, Cefalosporinas de espectro estrecho*
	2d	D	OXA-1 a OXA-10, PSE-2 (OXA-10)	El mismo sustrato de TEM-1, TEM-2, SHV-1, más cloxacilina, metilicina y oxacilina
Espectro extendido (BLEE)	2be	A	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6, K1 de <i>K. oxytoca</i>	El mismo sustrato el grupo de espectro ampliado mas cefalosporinas de tercera generación * y aztreonam
	2br		TEM-30 a TEM-36, TRC-1	
	2d	D	OXA-1 a OXA-10	El mismo sustrato el grupo de espectro ampliado mas cefepima para algunas enzimas
	ND	A	Familia CTX-M Otras (BES-1, familia GES/IBC, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1, VEB-1 y VEB-2)	El mismo sustrato el grupo de espectro ampliado mas cefepima para algunas enzimas El mismo sustrato de la familia TEM y SHV
AmpC	ND	C	ACC-1, ACT-1, CFE-1, familia CMY, DHA-1, DHA-2, familia FOX, familia LAT, MIR-1, MOX-1 y MOX-2	El mismo sustrato del grupo de espectro ampliado mas cefamicinas*
Carbapenemasas	ND	B	Familia IMP, familia VIM, GIM-1 y SPM-1	El mismo sustrato del grupo de espectro extendido más cefamicinas* y carbapenémicos
	ND	A	KPC-1, KPC-2 y KPC-3	El mismo sustrato del grupo de la familia IMP, familia VIM, GIM-1 y SPM-1
	ND	D	OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40 y OXA-48	El mismo sustrato del grupo de la familia IMP, familia VIM, GIM-1 y SPM-1

No determinado (ND) \* Benzilpenicilinas, penicilina G, aminopenicilinas, amoxicilina y ampicilina; carboxipenicilinas, carbenicilina y ticarcilina; ureidopenicilinas, piperacilina, cefalosporinas de espectro estrecho, cefazolina, cefalotina, cefamandol y cefuroxima, entre otras; cefalosporinas de tercera generación, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, y ceftriaxona, carbapenemos, ertapenem, imipenem, y meropenem, cefamicinas, cefotetan, ceftioxima.

Fuente: Cortés y col., (2006).

**3.2.2.3 CTX-M:** En 1989, se informó la existencia de un aislamiento clínico de una cepa de *E. coli* resistente a la cefotaxima, con características de ser productora de BLEE no TEM, no SHV, por lo cual fue designada como CTX-M-1 (conocida como MEN-1 desde 1992), por su actividad hidrolítica frente a la cefotaxima (Cortés y col., 2006; Harada y col., 2008; Mantilla y col., 2009).

En la actualidad, las  $\beta$ -lactamasas de tipo CTX-M, son consideradas las más ampliamente diseminadas en el mundo. Estas se hallan codificadas en plásmidos transferibles y la mayoría se encuentran en enterobacterias tales como *Salmonella* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *P. mirabilis*, *E. cloacae* y *E. aerogenes*. Estas enzimas denominadas cefotaximasas, se caracterizan por hidrolizar eficientemente la cefotaxima, y pueden conferir a las bacterias que las producen altos niveles de resistencia contra otras cefalosporinas de tercera generación. De igual forma, también presentan altos niveles de resistencia a los monobactámicos, y niveles variables de resistencia contra cefalosporinas de cuarta generación. Estas enzimas son inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Cortés y col., 2006; Harada y col., 2008; Dubois y col., 2009; Mantilla y col., 2009).

Actualmente, se han descrito más de 110 variantes de CTX-M, clasificadas de acuerdo con la similitud de sus secuencias de aminoácidos en 5 grupos filogenéticos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-

M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25. El grupo CTX-M-1 incluye 6 enzimas mediadas por plásmidos (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15 y FEC-1) y las enzimas no publicadas CTX-M-22, CTX-M-23 y CTX-M-28; el grupo CTX-M-2 está conformado por 8 enzimas (CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-4L, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20 y Toho-1), mientras que el grupo CTX-M-8 está representado por una sola enzima. El grupo CTX-M-9 consta de 9 enzimas (CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27 y Toho-2) y otras dos enzimas no publicadas, una de ellas es la CTX-M-24 y por último, el grupo CTX-M-25 que incluye soló 2 enzimas (CTX-M-25 y CTX-M-26) (Bonnet, 2004; Mantilla y col., 2009).

www.bdigital.ula.ve

Esta familia de BLEE se encuentra estrechamente relacionada con las  $\beta$ -lactamasa cromosómicas (AmpC) provenientes de distintas especies del género *Kluyvera*. Se considera que los grupos CTX-M-1 y CTX-M-2 derivan de las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *Kluyvera ascorbata*, mientras que los grupos CTX-M-8 y CTX-M-9 derivan de las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *Kluyvera georgiana* (Harada y col., 2008; Mantilla y col., 2009).

**3.2.2.4 OXA:** A diferencia de TEM y SHV, las BLEE derivadas de OXA pertenecen a la clase molecular D de Ambler (oxacilinasas) y al grupo funcional 2d. Presentan una gran actividad hidrolítica contra oxacilina, cloxacilina, meticilina, ureido y aminopenicilinas, y

son inactivadas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas en forma variable. En la familia de  $\beta$ -lactamasas OXA, pocas expresan el fenotipo BLEE, estas enzimas han sido aisladas, principalmente, en *P. aeruginosa*, pero también en *Enterobacteriaceae* (Cortés y col., 2006; Harada y col., 2008).

#### **4. Importancia clínica y epidemiológica de *E. coli* productoras de BLEE**

Hasta finales de los años noventa la mayoría de las BLEE se aislaban en cepas de *K. pneumoniae* implicadas en brotes nosocomiales. Sin embargo, estudios recientes afirman que ha ocurrido un cambio epidemiológico en cuanto a los tipos de BLEE más prevalentes y su distribución en la población bacteriana. En este contexto, *E. coli* emerge como uno de los patógenos extraintestinales más frecuentes productores de BLEE tipo CTX-M en infecciones urinarias y bacteriemias nosocomiales (Mantilla y col., 2009; García y col., 2011, Pitout, 2012).

Actualmente se desconoce la prevalencia real de *E. coli* productoras de BLEE, pero su incidencia es creciente. Los últimos datos registrados por el Sistema de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos de Europa (*por sus siglas en inglés* EARSS), organismo que se encarga de monitorear las resistencias antibióticas en patógenos invasivos, muestra un aumento en la frecuencia de *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación en Europa entre los años 2006 y 2008, con una prevalencia de *E. coli* productora de BLEE

entre el 1-5%, siendo algo más alta en España con un 5-10%. Mientras que en países como Irlanda, Italia y Portugal, ya se sitúan en una frecuencia del 10-25% (García y col., 2011, Pitout, 2012).

En Estados Unidos, García y col., (2011) señalan que la situación es distinta y en las conclusiones del estudio MYSTIC apuntan hacia una tendencia a la baja en los aislamientos de cepas productoras de BLEE tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae*. Sin embargo, las enzimas CTX-M que eran extremadamente raras, en los últimos años se han incrementado de modo notable, principalmente en cepas de *E. coli* en algunas zonas de dicho país (McGettigan y col., 2009; Sidjabat y col., 2009).

En Latinoamérica, las BLEE representan un importante problema de salud pública, con proporciones alarmantes, debido a su rápida propagación, por lo que se reportan altas tasas de prevalencia en países como Colombia, Guatemala, Uruguay, Perú, México, Venezuela, Ecuador, Argentina, Chile, Panamá y Brasil. Las enzimas más comunes en esta región son SHV-2, SHV-4, SHV-5, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, PER-2 y recientemente la presencia de CTX-M-15 en aislados de *E. coli* (Morales y col., 2005; Andrade y col., 2006; Vignoli y col., 2006; Castro y col., 2008; Gaitán y Espinal, 2009; Pitout., 2010).

En Venezuela, se realiza la vigilancia de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos desde el año 1987, cuando se creó el Programa Venezolano de Vigilancia de Resistencia Bacteriana a los

Antimicrobianos. Desde entonces, se ha observado un incremento marcado en la producción de BLEE en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*, con sensibilidad disminuida a las cefalosporinas de tercera generación, con frecuencias del 29% y 39% para ceftazidima y cefotaxima, respectivamente (Comegna y col., 2000).

Para los años 2000 y 2004, Araque y col., lograron determinar la presencia de BLEE SHV-5 y TEM-1 en cepas de *K. pneumoniae* procedentes de la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal del Hospital Universitario de Los Andes, en el estado Mérida. Posteriormente Torres y col., (2006), realizaron la detección fenotípica y molecular de BLEE en 224 aislados de enterobacterias procedentes de ocho centros de salud de Caracas, reportando 91,1% de las cepas analizadas como productoras de BLEE, y de esta, el 72% fueron del grupo SHV y el 21% del grupo CTX-M. Esta investigación permitió realizar el primer reporte conocido de la presencia de CTX-M en Venezuela. Por su parte Vergara y col., (2007), evaluaron la frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE en la Maternidad "Concepción Palacios" Caracas, en aislados de hemocultivos, puntas de catéter, orina y secreciones, reportado un 80% de enterobacterias productoras de BLEE. En el mismo año, Sandra y col., (2007) determinaron la frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE aisladas de hemocultivos en el Hospital Universitario de Maracaibo, registrando un 39,48% de enterobacterias productoras de BLEE,

siendo *K. pneumoniae* y *E. coli* las especies predominantes. También en el estado Zulia, en el Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo del Hospital Universitario de Maracaibo, Perozo y Castellano., (2009) encontraron una alta incidencia de BLEE en las especies de enterobacterias procedentes de pacientes hospitalizados en Terapia Intensiva. Mientras que Guzmán y Alonso., (2009) detectaron la presencia de BLEE (TEM-1, SHV-5-2a y CTX-M-2) en cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes con infección nosocomial en el Estado Sucre. Posteriormente, Ghiglione y col., (2010) lograron determinar la presencia de CTX-M-2 en cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes de la Unidad de Alto Riesgo Neonatal del Hospital Universitario de Los Andes y Millán y col., (2011) reportaron la presencia de CTX-M-14 en una cepa de *Citrobacter freundii* aislada en la comunidad, en el estado Mérida.

Sin duda, la prevalencia de los diferentes tipos de BLEE y su distribución no es un fenómeno estático, sino que se observa una intensa dinámica de expansión territorial de las distintas cepas, producto de los cambios en el ámbito clínico en el que se aíslan y al surgimiento de bacterias que co-expresan varios tipos de BLEE (García y col., 2011).

Con base en una exhaustiva revisión bibliográfica realizada, en Venezuela aún se desconoce la distribución de la producción de BLEE

tipo CTX-M, y los subgrupos de CTX-M en patógenos bacterianos que circulan en las unidades hospitalarias de alto riesgo.

##### **5. Tipificación y epidemiología molecular de *E. coli* productora BLEE.**

La tipificación molecular es indispensable en el control epidemiológico de las infecciones producidas por patógenos bacterianos productores BLEE, su caracterización permite determinar la relación clonal existente entre las cepas, conocer el número y tipos de clones circulantes, detectar la presencia de un brote e identificar la fuente de infección o reservorio y los vehículos o vías de transmisión. Así mismo, se puede evaluar la eficacia de las medidas de control implementadas para evitar la diseminación de clones y diferenciar entre casos aislados, brote y epidemia (Fernández, 2004).

Actualmente, se cuenta con diversas técnicas de tipificación molecular para el estudio de patógenos productores de BLEE. En su mayoría, estas técnicas se fundamentan en el análisis del ADN genómico o extracromosomal tales como: el polimorfismo del ADN amplificado al azar (*por sus siglas en inglés* RAPD), el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (*por sus siglas en inglés* RFLP), la electroforesis en gel de campo pulsado (*por sus siglas en inglés* PFGE). Esta última, es considerada la prueba de elección para el seguimiento de los brotes causados por microorganismos productores de BLEE a nivel hospitalario, ya que permite demostrar la

transmisión clonal de forma horizontal. Sin embargo, se han descrito otras técnicas como la amplificación de secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (*por sus siglas en inglés* Rep-PCR) y amplificación de las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (*por sus siglas en inglés* ERIC-PCR), las cuales han sido utilizadas ampliamente en estudios epidemiológicos y sus resultados son comparables con PFGE (Máttar y Martínez., 2007). La elección de un método de tipificación molecular depende de una serie de factores, tales como: fácil operación e interpretación, rapidez, tipeabilidad, costo, así como el poder de discriminación y reproducibilidad del método (Fernández, 2004).

En consecuencia, resulta de gran importancia estudiar las estrategias adoptadas por los microorganismos en la adquisición y mantenimiento de los determinantes de patogenicidad y resistencia, así como las relaciones genéticas o clonales entre cepas aisladas en una población o área determinada mediante diversos métodos de tipificación. Por tanto estos estudios permitirán orientar y evaluar las políticas que se adopten para el control, prevención y vigilancia de patógenos nosocomiales (Fernández, 2004; Máttar y Martínez., 2007 y Álvarez, 2010).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cepas bacterianas

Se estudió una colección de 22 cepas de *E. coli* con sensibilidad disminuida a las cefalosporinas de amplio espectro, aisladas de hemocultivos de neonatos con septicemia nosocomial recluidos en el Hospital Central Universitario "Dr. José María Vargas" de San Cristóbal Estado Táchira, Venezuela durante el año 2010. Estas cepas fueron enviadas al Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes para su estudio y caracterización genética.

### 2. Reactivación de las cepas

El proceso de reactivación se realizó subcultivando las cepas de *E. coli* en caldo BHI (BBL<sup>TH</sup>) y posteriormente, en agar MacConkey (Himedia ®) para verificar su pureza.

### 3. Caracterización fenotípica

#### 3.1 Confirmación de la identificación microbiológica

La identificación bacteriana se confirmó utilizando la galería API 20E (BIOMÉRIEUX), de acuerdo a lo descrito en el protocolo del proveedor.

### **3.2 Detección fenotípica de BLEE, AmpC y la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana**

Las cepas con resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro fueron evaluadas fenotípicamente para la detección de BLEE, mediante la prueba del doble disco, según lo descrito por CLSI (2011). Para ello, se inocularon las placas de agar Mueller Hinton (Himedia ®) con las cepas problema a partir de un inóculo equivalente al patrón 0,5 de McFarland. Posteriormente, se colocó un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (BD BBL<sup>TH</sup>) (20/10  $\mu$ g) en el centro de la placa y a los lados, a 15 mm de distancia (de borde a borde), se ubicaron los discos de ceftazidima (BD BBL<sup>TH</sup>) (30  $\mu$ g) y cefotaxima (BD BBL<sup>TH</sup>) (30  $\mu$ g). Luego, se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se realizó la lectura de la prueba.

Una visible distorsión e incremento del halo inhibitorio entre los discos de cualquiera de las cefalosporinas y el disco de amoxicilina/ácido clavulánico se consideró como positivo para la presencia de BLEE (Fig. 5). Para la detección fenotípica de BLEE se utilizó como control negativo la cepa de *E. coli* ATCC 25922 y como control positivo *K. pneumoniae* LMM60 (BLEE +).

La detección fenotípica de la enzima AmpC se realizó según la metodología descrita por Jure y col., (2011), con algunas modificaciones. La presencia de ésta enzima se investigó mediante

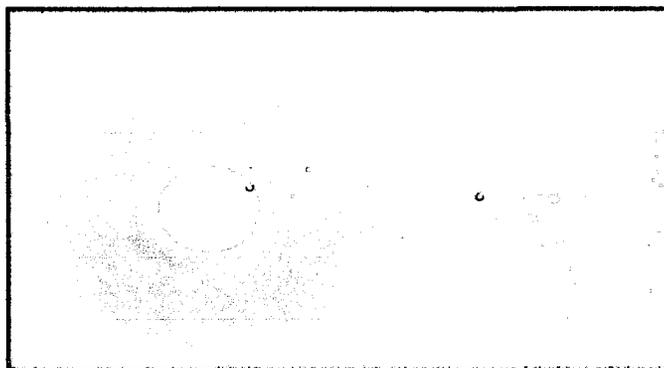
una prueba de sinergia, en la cual se colocó un disco con ácido 3-aminofenilborónico (AFB 300) y uno de cefoxitina (BD BBL<sup>TH</sup>) (30 µg) a 15 mm de distancia entre borde y borde. Bajo las mismas condiciones que para la detección de BLEE. Se consideró un resultado positivo cuando se observó un incremento en el halo de inhibición entre el disco de cefoxitina (FOX) y el del ácido 3-aminofenilborónico (AFB). Se utilizó como control positivo la cepa *E.coli* LMM77913 (AmpC+) y negativo la *E. coli* ATCC 25922 (Fig. 6).



**Figura 5. Prueba del doble disco, para la detección fenotípica de BLEE.**

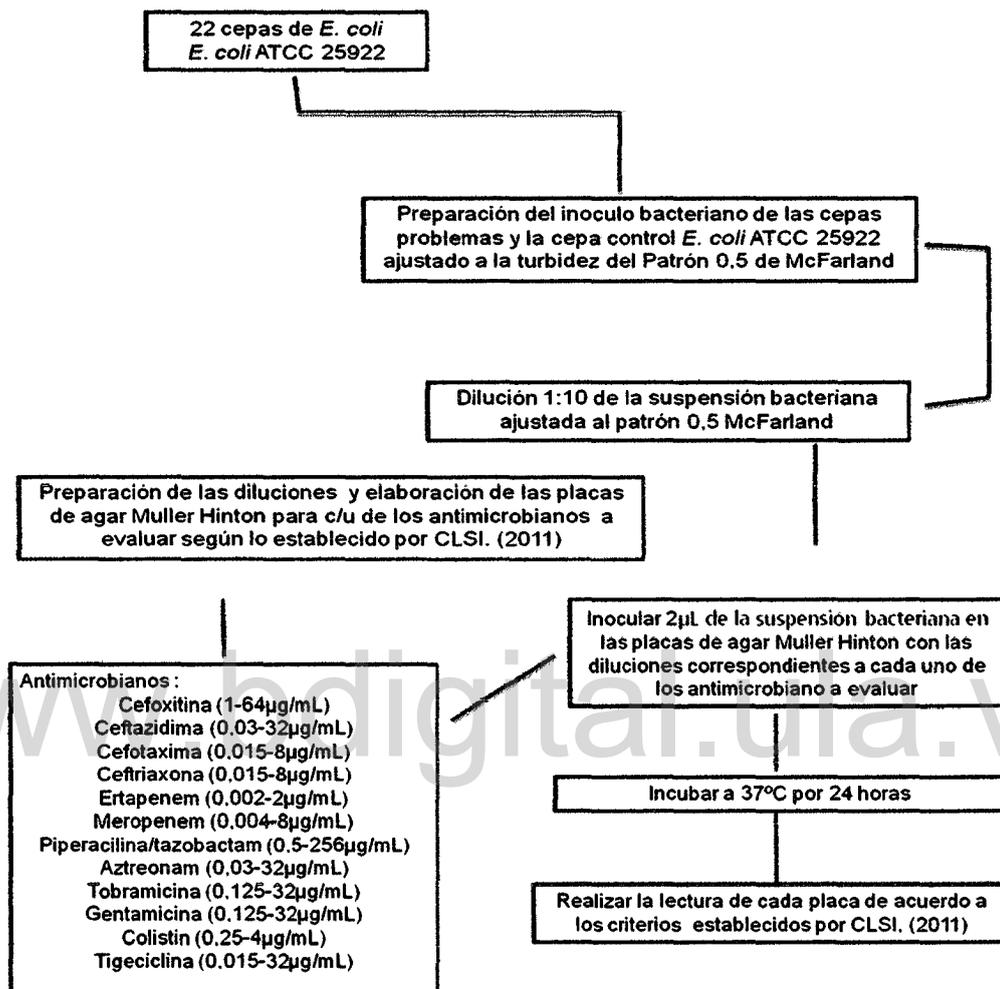
Cefotaxima (CTX), amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), ceftazidima (CAZ).

Fuente: Laboratorio de Microbiología Molecular (Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA).



**Figura 6. Prueba de sinergia con discos de ácido 3-aminofenilborónico (AFB) y cefoxitina (FOX), para la detección fenotípica de BLEE AmpC.** Fuente: Laboratorio de Microbiología Molecular (Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA).

La susceptibilidad a los agentes antimicrobianos, se realizó por concentración inhibitoria mínima (CIM), mediante el método de dilución en agar, de acuerdo a lo establecido por CLSI, (2011). Los antimicrobianos evaluados fueron: ceftazidima (Distriquímica S.A), cefotaxima (Genven), cefoxitina (Merck Sharp), ceftriaxona (Kopran Limited), piperacilina/tazobactam (Wyeth), ertapenem (Merck Sharp and Dohme), meropenem (Richet), gentamicina (Quim-Farm C.A), tobramicina (Eurofarm Limited), aztreonam (Bristol Myers Squibb, SL), colistina (GlaxoSmithkline) y tigeciclina (Wyeth). Se utilizó como cepa control para estos ensayos *E. coli* ATCC 25922. Se consideró como fenotipos multirresistentes todas aquellas cepas que presentaron resistencia por lo menos a 3 antibióticos de grupos diferentes.



**Figura 7. Representación esquemática del método de concentración inhibitoria mínima (CIM) por dilución en agar.** Fuente: Laboratorio de Microbiología Molecular (Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA).

## 4. Caracterización genética

### 4.1 Extracción del ADN

Para la extracción del ADN fueron resuspendidas varias colonias provenientes de cultivos frescos en 200 µl de agua destilada estéril, las cuales se mezclaron por vortex por algunos segundos, luego la suspensión se llevo al congelador (-20 °C) durante 30 min. Posteriormente, la suspensión fue sometida a ebullición (100 °C) en baño de María durante 15 min. Los residuos celulares se separaron por centrifugación (13.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente), y el ADN disuelto en el sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf estéril y se preservó a -20 °C, hasta su uso inmediato.

### 4.2 Detección de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, y *bla*<sub>CTX-M</sub>

La detección de los genes que codifican para la familia TEM, SHV y CTX- M, se realizaron por amplificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores que se describen en la Tabla 4. La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 25 µL, y estuvo compuesta por 2,5 µL del buffer de reacción (10X), 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 Mm), 1,5 µL de dNTPs (10 mµ; FUNDAIM), 2,5 µL de cada iniciador (10 pmol/µL), 0,3 µL de la Taq polimerasa (5 U/µL; FUNDAIM), 11,45 µL de agua bidestilada ultrapura y 3 µL del ADN extraído. Las PCR se realizaron en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp. PCR System 2400. Las

condiciones de amplificación se señalan en la Tabla 5, de acuerdo a lo descrito por Di Conza y col., (2002) y Eckert y col., (2006).

Los productos de amplificación se observaron en geles de agarosa al 1%, en TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio (50 µg/ml; Sigma), y fotografiados a través del sistema UVP Biodoc-It System. Como marcador de peso molecular se utilizó una escalera de 1kb (BIONEER). La corrida electroforética se realizó a 80V durante 30 min.

#### **4.3 Detección de los genes *bla*<sub>CTX M-1</sub>, *bla*<sub>CTX M-2</sub>, *bla*<sub>CTX M-8</sub>, *bla*<sub>CTX M-9</sub> y**

##### ***bla*<sub>CTX M-25</sub>**

Las cepas que resultaron positivas a la detección de genes CTX-M, se les identificó en un segundo paso de amplificación el grupo al cual pertenecen, para ello se realizaron las amplificaciones de PCR en un volumen final de 25 µL. La mezcla de reacción fue igual a la descrita anteriormente y los iniciadores que se utilizaron se señalan en la Tabla 4. Las condiciones de amplificación se realizaron según lo descrito por Di Conza y col., (2002) y Eckert y col., (2006) (Tabla 5).

**Tabla 4. Iniciadores empleados en la amplificación de los genes de BLEE tipo: TEM, SHV y CTX-M.**

<b>Gen</b>	<b>Iniciadores</b>
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	F: 5'- ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA - 3' R: 5'- GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC A - 3'
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	F: 5'- GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC - 3' R: 5'- TTA GCG TTG CCA GTG CTC - 3'
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	F: 5'- ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC - 3' R: 5'- CCG CTG CCG GTY TTA TCV CCB AC - 3'
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	F: 5'- ATG GTT AAA AAA TCA CTG C - 3' R: 5'- GGT GAC GAT TTT AGC CGC - 3'
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	F: 5'- TTA ATG ATG ACT CAG AGC ATT C - 3' R: 5'- GAT ACC TCG CTC CAT TTA TTG C - 3'
<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>	F: 5'- TGA ATA CTT CAG CCA CAC G - 3' R: 5'- TAG AAT TAA TAA CCG TCG GT - 3'
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	F: 5'- AAC ACG GAT TGA CCG TCT TG- 3' F: 5'- TTA CAG CCC TTC GGC GAT- 3'
<i>bla</i> <sub>CTX-M-25</sub>	F: 5'-CGC CGA TAA CAC GCA GAC- 3' F: 5'-CGG CTC CGA CTG GGT GAA GTA- 3'

Fuente: Di Conza y col., (2002) y Eckert y col., (2006).

**Tabla 5. Condiciones de amplificación de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>.**

Genes	Condiciones de amplificación	Producto esperado	Control positivo	Control negativo
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	94°C x 5 min 94°C x 45 seg 46°C x 45 seg 72°C x 1 min 72°C x 10 min 35 ciclos	1105 pb	<i>E. coli</i> LMM74914	Mezcla de la amplificación sin ADN
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	95°C x 5 min 95°C x 1 min 60°C x 1 min 72°C x 1 min 72°C x 10 min 35 ciclos	886 pb	Kpn LMM77916	Mezcla de la amplificación sin ADN
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	95°C x 5 min 94°C x 1 min 50°C x 1 min 72°C x 1 min 72°C x 10 min 30 ciclos	593 pb	Kpn LMM28	Mezcla de la amplificación sin ADN
		550 pb	Kpn LMM28	
		921 pb	Kpn LMM206	
		900 pb	Kpn LMM29	
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	94°C x 5 min 94°C x 1 min 55°C x 1 min 72°C x 1 min 72°C x 10 min 30 ciclos	906 pb	Kpn LMM1707	Mezcla de la amplificación sin ADN

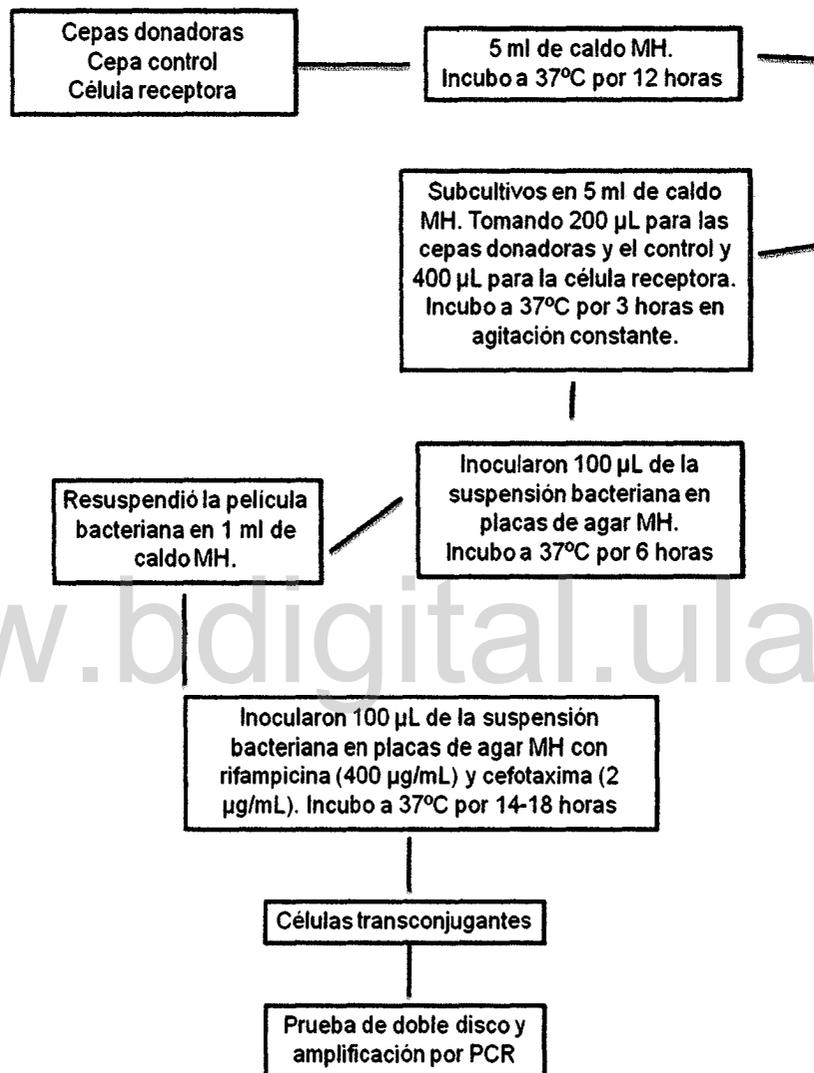
Fuente: Di Conza y col., (2002) y Eckert y col., (2006).

#### 4.4 Transferencia conjugativa de genes que codifican para BLEE

La transferencia de los determinantes de resistencia BLEE se realizó mediante ensayos de conjugación en medio sólido agar Muller Hinton (MH) (Himedia ®), utilizando la cepa *E. coli* MKD-135 rifampicina resistente como receptora y *Salmonella* 175 como cepa control.

La cepa donadora (ExPEC), el control y la célula receptora se cultivaron por separado en 5 ml de caldo MH sin antibiótico a 37 °C, durante 12 horas. Posteriormente, de cada uno de los cultivo se realizó un subcultivo en 5 ml de caldo MH sin antibiótico a 37 °C, en agitación constante durante 3 horas (tomando 200 µL para las cepas donadoras y la de control y 400 µL para la cepa receptora). En una proporción de 1:10 a favor de la célula receptora, se colocó 100 µL de la cepa donadora y 900 µL del cultivo bacteriano de la célula receptora; a partir de esta suspensión se inocularon 100 µL en una placa de agar MH, la cual se incubó durante 6 horas a 37 °C. Luego, la película bacteriana que se formó sobre la superficie del agar, fue resuspendida en 1 mL de caldo MH; de esta suspensión se tomó una alícuota de 100 µL y se inoculó en placas de agar MH suplementadas con rifampicina (400 µg/mL) y cefotaxima (2 µg/mL). Las placas se incubaron a 37 °C por 14-18 horas.

Las células transconjugantes obtenidas se les verificó su fenotipo por la prueba de doble disco y amplificación por PCR.



**Figura 8. Representación esquemática de la transferencia de los determinantes de resistencia BLEE.** Fuente: Laboratorio de Microbiología Molecular (Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA).

#### 4.5 Detección genética de genes de virulencia *fimH*, *kpsMTII*, *papAH*, *PAI*, *fyuA*, y *usp*.

La detección de estos genes se realizó por amplificación a través de PCR, utilizando los iniciadores que se describen en la Tabla 6. La mezcla de reacción para los genes *papAH*, *fyuA* y *usp* se ajustó a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , y ésta estuvo compuesta por 2,5  $\mu\text{L}$  del buffer de reacción (10X), 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 Mm), 1,5  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM; FUNDAIM), 2,5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 0,2  $\mu\text{L}$  de la Taq polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ ; FUNDAIM), 13,0  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada ultrapura y 3  $\mu\text{L}$  del ADN extraído. Mientras que la mezcla de reacción para la PCR múltiple de los genes *KpsMTII*, *fimH* y *PAI* se ajustó a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , y la misma estuvo compuesta por 2,5  $\mu\text{L}$  del buffer de reacción (10X), 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 Mm), 2,0  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM; FUNDAIM), 2,5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) *KpsMTII* y *PAI*, 2,0  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) *fimH*, 0,3  $\mu\text{L}$  de la Taq polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ ; FUNDAIM), 3,0  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada ultrapura y 3  $\mu\text{L}$  del ADN extraído. Las PCR se realizaron en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp. PCR System 2400. Las condiciones de amplificación se señalan en la Tabla 7, de acuerdo a lo descrito por Moreno y col., (2005) y Ribeiro y col., (2008).

Los productos de amplificación se observaron en geles de agarosa al 1%, en TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio (50 µg/ml; Sigma), y fotografiados a través del sistema UVP Biodoc-It System. Como marcador de peso molecular se utilizó una escalera de 1 kb (BIONEER). La corrida electroforética se realizó a 70V durante 30 min.

**Tabla 6. Iniciadores empleados en la amplificación por PCR de los genes de virulencia *fimH*, *kpsMTII*, *papAH*, *PAI*, *fyuA*, y *usp*.**

Gen	Iniciadores
<i>fimH</i>	F: 5'- TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG – 3' R: 5'- GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA – 3'
<i>KpsMTII</i>	F: 5'- GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG – 3' R: 5'- CAT CAG ACG ATA AGC ATG AGC A – 3'
<i>papAH</i>	F: 5'- ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG – 3' R: 5'- CGTCCCACCATACGTGCTCTTC – 3'
<i>PAI</i>	F: 5'- GGACATCCTGTTACAGCGCGCA – 3' R: 5'- TCGCCACCAATCACAGCCGAAC – 3'
<i>fyuA</i>	F: 5'- TGATTAACCCCGCGACGGGAA – 3' R: 5'- CGCAGTAGGCACGATGTTGTA – 3'
<i>usp</i>	F: 5'- ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT – 3' R: 5'- CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAAT – 3'

Fimbria tipo 1 (*fimH*); Cápsula tipo II (*kpsMTII*); Adhesina (*papAH*); Isla de patogenicidad (*PAI*); Yersiniabactina (*fyuA*); Proteína uropatógena específica (*usp*). Fuente: Moreno y col., (2005); Ribeiro y col., (2008).

**Tabla 7. Condiciones para la amplificación por PCR de los genes de virulencia *fimH*, *kpsMTII*, *papAH*, *PAI*, *fyuA*, y *usp*.**

Genes	Condiciones de amplificación	Producto esperado	Control positivo	Control negativo
<i>papAH</i>	95°C x 5min 95°C x 1min 60°C x 1 min 72°C x 1min 72°C x 10min 35 ciclos	720 pb	LMSC03	Mezcla de la amplificación sin ADN
<i>fyuA</i>	95°C x 5min 94°C x 1min 63°C x 1 min 72°C x 1min 72°C x 7min 30 ciclos	880 pb	E02	Mezcla de la amplificación sin ADN
<i>usp</i>	94°C x 5min 94°C x 1min 57°C x 1 min 72°C x 1min 72°C x 7min 30 ciclos	1000 pb	E02	Mezcla de la amplificación sin ADN
<i>KpsMTII</i> <i>fimH</i> <i>PAI</i>	95°C x 5min 94°C x 1min 63°C x 1 min 72°C x 1min 72°C x 10min 30 ciclos	272 pb	LM3211 (E02 /E09)	Mezcla de la amplificación sin ADN
		508 pb		
		930 pb		

Adhesina (*papAH*); Yersiniabactina (*fyuA*); Proteína uropatógena específica (*usp*); Cápsula tipo II (*kpsMTII*); Fimbria tipo 1 (*fimH*); Isla de patogenicidad (*PAI*). Fuente: Moreno y col., (2005); Ribeiro y col., (2008).

#### **4.6 Secuenciación de genes *bla* y de virulencia**

Los amplicones obtenidos se purificaron utilizando el kit AccuPrep® PCR Purification (BIONEER). Las secuencias nucleotídicas fueron determinadas por el Centro de Secuenciación y Procesamiento de Ácidos Nucleicos (CeSAAN) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas-Venezuela, mediante electroforesis capilar en un secuenciador modelo ABI 3130X2 (Applied Biosystem), utilizando los mismos iniciadores usados en la PCR. Las secuencias nucleotídicas resultantes fueron analizadas mediante el uso del programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y comparadas con las secuencias genéticas incluidas en la base de datos ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)).

#### **5. Determinación de la relación o diversidad clonal mediante Rep-PCR.**

Esta tipificación se realizó utilizando la técnica de amplificación de secuencias repetitivas por PCR (Rep-PCR), a partir del ADN total, a través del empleo de los siguientes iniciadores (Bioneer) descritos por Lozano y col., (2002):

REP-1F 5'IIIIGCGCCGICATCAGGC3'

REP-2R 5'ACGTCTTATCAGGCCTAC3'

La mezcla de reacción para la Rep-PCR, estuvo constituida por 2,5  $\mu\text{L}$  de buffer (10X) libre de  $\text{MgCl}_2$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 Mm), 3  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 Mm), 3  $\mu\text{L}$  de cada uno de los iniciadores (10 pmol/  $\mu\text{L}$ ), 0,5  $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 5,50 de agua bidestilada estéril y 5  $\mu\text{L}$  de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 min de desnaturalización a 94 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, alineación a 50 °C por 1min e hibridación a 72 °C por 4 min, finalmente un período de extensión final a 72 °C por 7 min (Snelling y col., 1996; Lozano y col., 2002).

Los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 1,5% (Promega), teñido con bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Sigma), para ello se mezcló 25  $\mu\text{L}$  de cada producto con 3  $\mu\text{L}$  de buffer muestra 10X. Las bandas resultantes se visualizaron a través de un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con el sistema de iluminador y cámara UVP Biodoct System. La corrida electroforética se llevó a cabo a 4,6 V/cm durante 3 horas. Como marcador de peso molecular se utilizó una escalera molecular de 50 pb (Bioneer) para comparar el tamaño de los productos de amplificación obtenidos.

Finalmente los patrones obtenidos en la Rep-PCR para cada una de las cepas fueron interpretados mediante inspección visual de dos o más observadores, y analizados por el paquete de Software TREECON, programa desarrollado para la construcción y diseño de

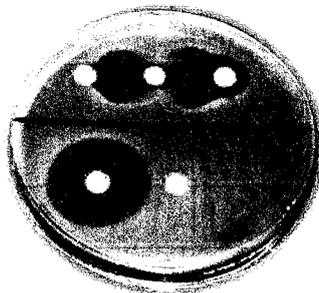
arboles filogenéticos de distancias evolutivas, inferidos a partir de las bandas obtenidas de cada una de las cepas en particular.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## RESULTADOS

### 1. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana y detección fenotípica de BLEE y AmpC.

Según los resultados obtenidos en los ensayos de susceptibilidad (CIM) las veintidós cepas de *E. coli* estudiadas mostraron perfiles de susceptibilidad compatibles con la producción de BLEE. El 100% de las cepas fueron resistentes a las cefalosporinas de amplio espectro cefotaxima y ceftriaxona, mientras que un 86,4% de estas, resultaron resistentes a ceftazidima. Para los aminoglucósidos se observó un 100% de resistencia a tobramicina, siguiéndole en frecuencia la gentamicina (68,2%). La resistencia para el aztreonam fue de 86,4% y un 13,6% para piperacilina/tazobactam. Todas las cepas fueron sensibles a los carbapenemos (ertapenem y meropenem), colistin y tigeciclina (Tabla 8). La prueba fenotípica del sinergismo de doble disco resultó positiva para las 22 cepas estudiadas, coincidiendo con los resultados obtenidos en la CIM. La prueba de sinergia para la detección de AmpC, resultó negativa para las 22 cepas de *E. coli* en estudio (Fig. 9).



**Figura 9. Representación de la detección fenotípica de BLEE (+) y AmpC (-) (área superior e inferior, respectivamente).**

**Tabla 8. Determinación de la CIM en las cepas de *E. coli* en estudio**

Antibiótico	CIM Rango µg/mL	Nº de cepas			% Resistencia (N: 22)
		S	I	R	
CTX	0,015 – 8	0	0	22	100%
CRO	0,015 – 8	0	0	22	100%
TBO	0,125 – 32	0	0	22	100%
CAZ	0,03 – 32	3	0	19	86,4%
ATM	0,03 – 32	1	2	19	86,4%
GTM	0,125 – 32	6	1	15	68,2%
FOX	1 – 64	8	8	6	27,2%
TZP	0,5 – 256	12	7	3	13,6%
MER	0,004 – 8	22	0	0	0%
ERT	0,002 – 2	22	0	0	0%
CLT	0,25 - 4	22	0	0	0%
TGC	0,015 – 32	22	0	0	0%

CIM: Concentración inhibitoria mínima; (R): resistente; (I): intermedia; (S): sensible; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona; TBO: tobramicina; CAZ: ceftazidima; ATM: aztreonam; GTM: gentamicina; FOX: cefoxitina; TZP: piperacilina/tazobactam; MER: meropenem; ERT: ertapenem; CLT: colistina; TGC: tigeciclina.

De acuerdo a la resistencia observada para los aminoglucósidos evaluados, las cepas fueron agrupadas en 3 patrones de resistencia. Siendo el patrón III el más frecuente (68,2%), conformado por cepas positivas a BLEE y con resistencia asociada a tobramicina (TBO) y gentamicina (GTM) (Tabla 9).

**Tabla 9. Distribución de los patrones de resistencia asociados a la presencia de BLEE en las cepas de estudio.**

Patrón de resistencia	Marcadores de resistencias	N (%)
I	BLEE (+)-TOB <sup>R</sup>	6 (27,3%)
II	BLEE (+)-TOB <sup>R</sup> -GTM <sup>I</sup>	1(4,5%)
III	BLEE (+)-TOB <sup>R</sup> -GTM <sup>R</sup>	15 (68,2%)

BLEE (+): β-lactamasa de espectro expandido positiva; (R): resistente; (I): intermedia; TBO: tobramicina; GTM: gentamicina.

## 2. Detección genotípica de BLEE

A partir del patrón de resistencia observado, todas las cepas de *E. coli* en estudio fueron sometidas a la detección de genes que codifican para la producción de las tres principales familias de β-lactamasas (TEM, SHV y CTX-M). Los resultados obtenidos, revelaron que el 95,4% (21/22) de las cepas de estudio presentaron genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, (Fig. 10). El análisis de los genes correspondientes a los subgrupos de la familia CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25), reveló que 9 cepas (42,8%) portaban genes del subgrupo *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, 8 del subgrupo *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (38,1%), 3 (14,3%) con genes del subgrupo *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, y una cepa (4,8%) pertenecía al subgrupo *bla*<sub>CTX-M-8</sub>. (Fig. 11).

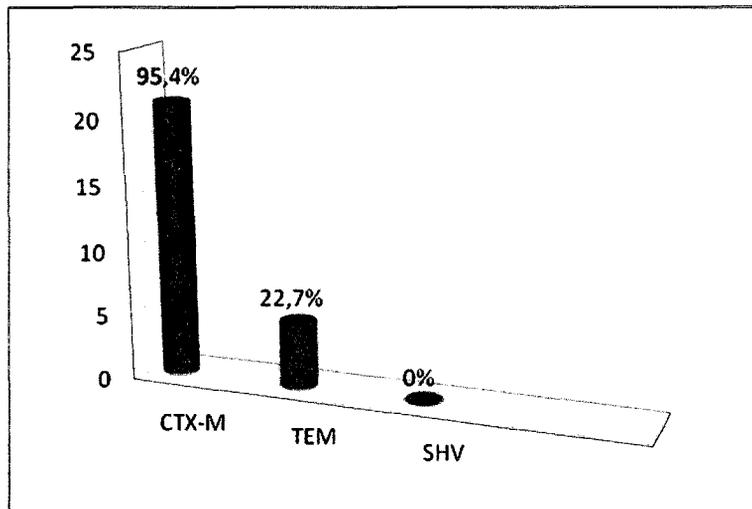


Figura 10. Distribución de las  $\beta$ -lactamasas TEM, SHV y CTX-M en las cepas de estudio.

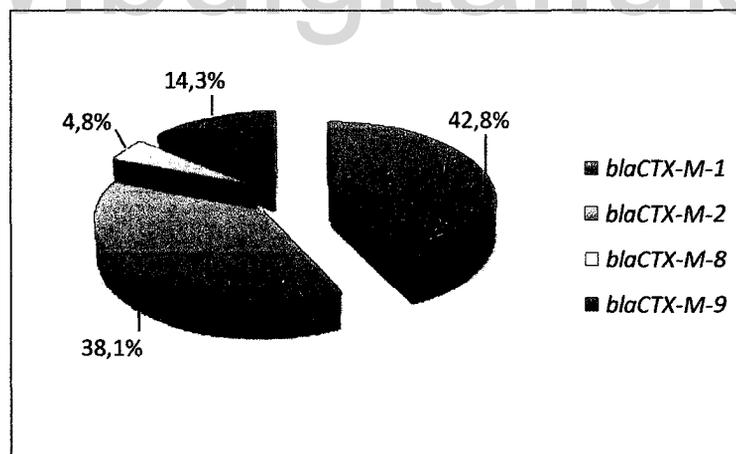
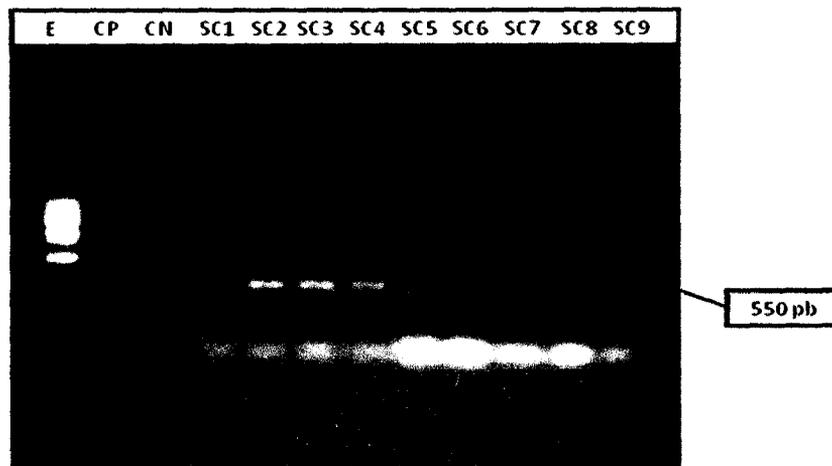


Figura 11. Distribución de los subgrupos de la familia CTX-M en las cepas de estudio.

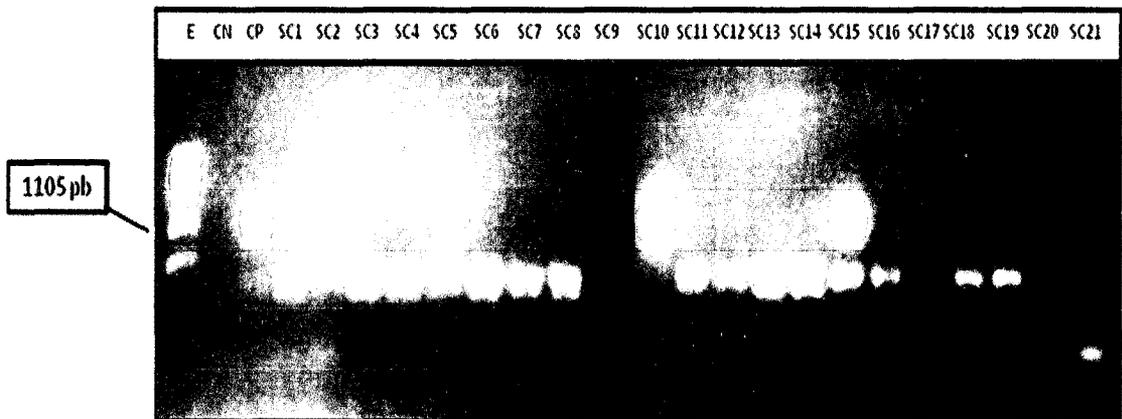


**Figura 12. Gel electroforético representativo de la detección del gen *bla*<sub>CTX-M</sub> general por amplificación PCR.** SC: cepas de estudios; E: escalera molecular 1Kb; CP: control positivo; CN: control negativo.

El gen *bla*<sub>TEM</sub> estuvo presente en un 22,7% de las cepas de estudio (5/22), ninguna de las cepas presentaron el gen *bla*<sub>SHV</sub> (Fig. 10). El gen *bla*<sub>TEM</sub> siempre se detectó en asociación al gen *bla*<sub>CTX-M</sub>, excepto en una cepa donde su presencia fue única (Cepa N°. SC22). Las distintas asociaciones TEM+CTX-M se describe en la Tabla 10. La combinación más frecuente fue *bla*<sub>TEM+CTX-M-9</sub> (50%; 2/4) seguidas de las asociaciones *bla*<sub>TEM+CTX-M-1</sub> y *bla*<sub>TEM+CTX-M-2</sub> (25%; 1/4, respectivamente).

**Tabla 10. Asociación de genes TEM y CTX-M en las cepas de *E. coli* en estudio.**

Asociación	N (%)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	2 (50%)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	1 (25%)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	1 (25%)

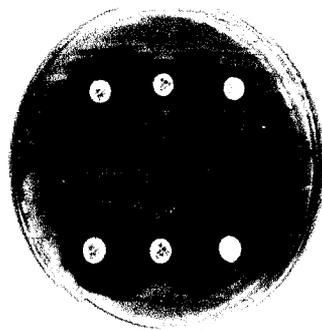


**Figura 13. Gel electroforético representativo de la amplificación por PCR del gen *bla*<sub>TEM</sub>.** SC: cepas de estudio E: escalera molecular 1Kb; CN: control negativo; CP: control positivo.

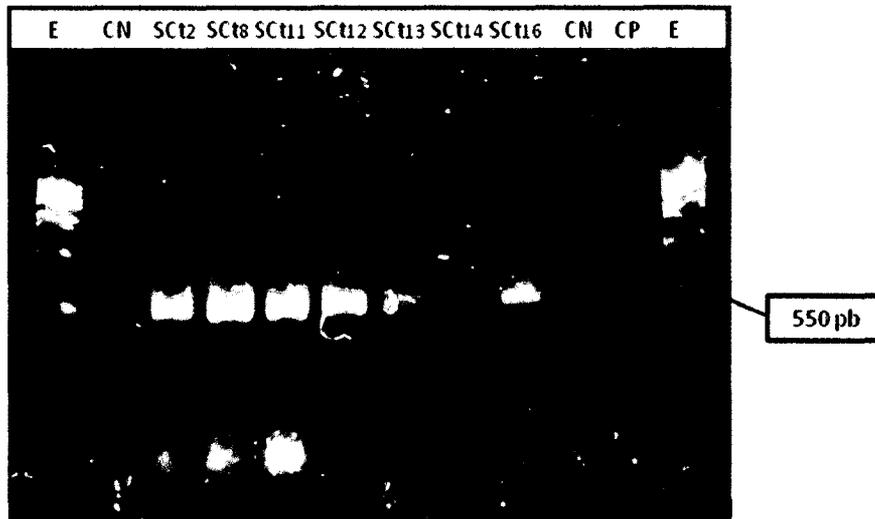
### 3. Transferencia conjugativa de genes que codifican para BLEE

Mediante ensayos de conjugación, el 36,4% de las cepas de estudio (8/22) transfirieron en bloque los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> y/o *bla*<sub>TEM</sub> a las células receptoras, independientemente que estos se encontraran en asociación.

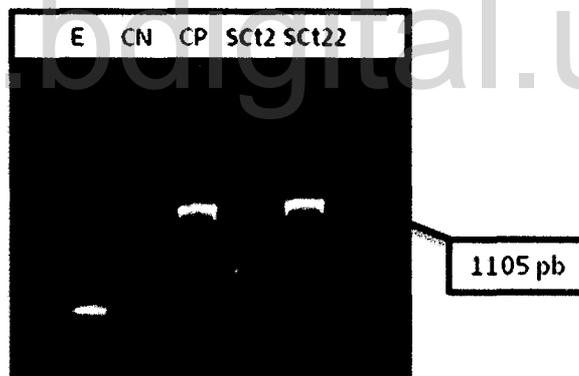
La verificación del fenotipo de las células transconjugantes se realizó con la prueba SDD y genotípicamente amplificando por PCR los genes *bla* (Figs. 14-16).



**Figura 14. Representación de la detección fenotípica de BLEE (+) en las células transconjugantes obtenidas (área superior SCt12 e inferior SCt13)**



**Figura 15. Gel electroforético representativo de la PCR CTX-M general de las células transconjugantes obtenidas.** Sct: cepas transcojugantes; E: escalera 1kb; CN: control negativo; CP: control positivo.



**Figura 16. Gel electroforético representativo de la PCR TEM de las células transconjugantes obtenidas.** Sct: cepas transcojugantes; E: escalera 1kb; CN: control negativo; CP: control positivo.

#### 4. Detección genética de genes de virulencia

Veintiuna cepas (95,5%) de las veintidós presentaron al menos uno de los factores de virulencia en estudio. Siendo el factor de virulencia *fimH* el más frecuente con un 81,8%, seguido por los factores *fyuA* (54,5%), *PAI*

y *KpsMTII* (36,4%), mientras que los genes de virulencia encontrados con menor frecuencia fueron *papAH* y *usp* (4,5%) (Tabla 11). Además se observó la existencia de asociaciones de factores en un 59,1% de las cepas de estudio (13/22), siendo la combinación *fyuA*, *PAI*, *fimH* y *KpsMTII* la más frecuente (18,2%) (Tabla 12).

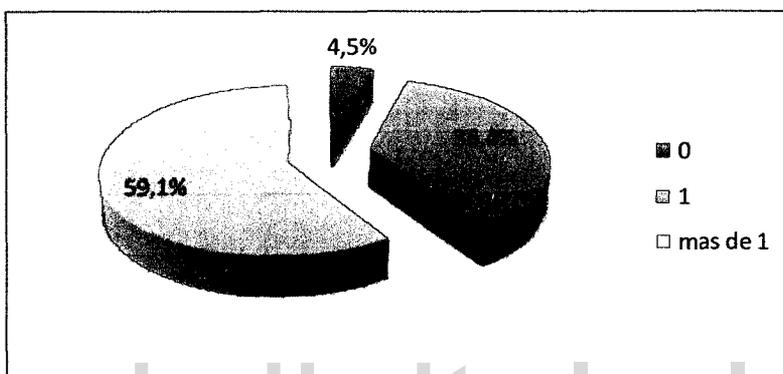
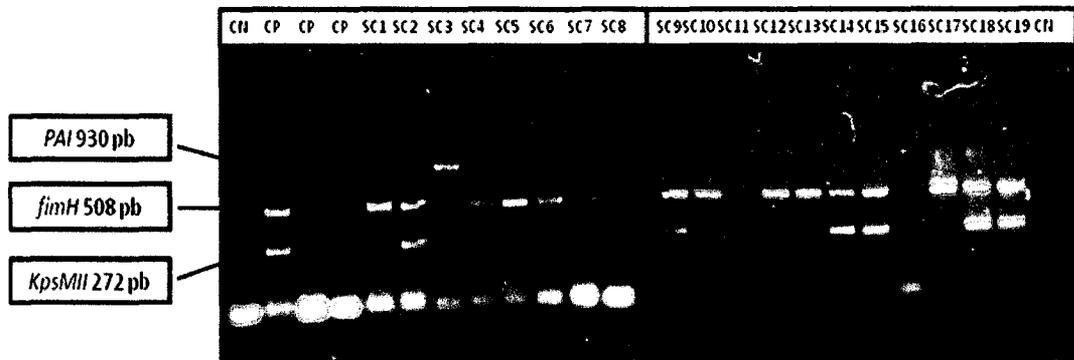


Figura 17. Distribución de los genes de virulencia de acuerdo al número presente en las cepas de estudio.

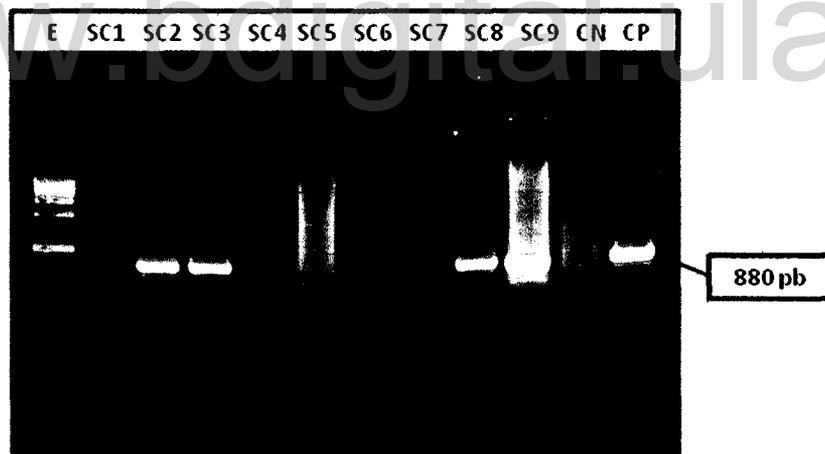
Tabla 11. Distribución de los genes de virulencia aislados en las cepas de *E. coli* en estudio.

Genes de virulencia	Numero de cepas positivas (%)
<i>fimH</i>	18 (81,8%)
<i>fyuA</i>	12 (54,5%)
<i>PAI</i>	8 (36,4%)
<i>KpsMTII</i>	8 (36,4%)
<i>papAH</i>	1 (4,5%)
<i>Usp</i>	1 (4,5%)

Fimbria tipo 1 (*fimH*); Yersiniabactina (*fyuA*); Isla de patogenicidad (*PAI*); Cápsula tipo II (*kpsMTII*); Adhesina (*papAH*); Proteína uropatógena específica (*usp*).



**Figura 18. Gel electroforético representativo de la amplificación por PCR múltiple de los genes que codifican los factores de virulencia *PAI*, *fimH* y *KpsMTII*. CN: control negativo; CP: control positivo. SC: cepas de estudio.**



**Figura 19. Gel electroforético representativo de la amplificación por PCR del gen que codifica el factor de virulencia *fyuA*. E: escalera 1kb; CN: control negativo; CP: control positivo. SC: cepas de estudio.**

**Tabla 12. Distribución de las asociaciones de genes de virulencia encontradas en las cepas *E. coli* en estudio.**

Asociaciones de factores de virulencia	Nº (%)
<i>fyuA- PAI- fimH – KpsMTII</i>	4 (18,2 %)
<i>fyuA – fimH – KpsMTII</i>	2 (9,1 %)
<i>fyuA - fimH</i>	2 (9,1 %)
<i>fimH - PAI</i>	2 (9,1 %)
<i>fyuA- PAI- fimH – KpsMTII - usp</i>	1(4,5 %)
<i>fyuA – PAI - papAH</i>	1(4,5 %)
<i>fyuA - KpsMTII</i>	1(4,5 %)

Fimbria tipo 1 (*fimH*); Yersiniabactina (*fyuA*); Isla de patogenicidad (*PAI*); Cápsula tipo II (*kpsMTII*); Adhesina (*papAH*); Proteína uropatógena específica (*usp*).

Cinco patrones genotípicos fueron generados cuando se estudio la relación de la presencia de los genes de virulencia y las BLEE identificadas en el conjunto de cepas analizadas. De estos patrones, el más frecuente fue el tipo II (36,5%; 8/22) conformado por la variante IIa y IIb, ambos constituidos por un solo factor de virulencia asociados a los diversos genes *bla* detectados (excepto *bla*<sub>CTXM-8</sub>). En segundo lugar se observó el patrón tipo III, con sus variantes IIIa, IIIb y IIIc (22,7%; 5/22), el cual se caracterizó por la presencia de dos factores de virulencia e indistintamente asociado a diversos genes *bla*. El patón V, se ubicó en el tercer lugar y se caracterizó por la presencia de 4 factores de virulencia y la detección de los genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> y *bla*<sub>CTX-M-9</sub> asociados o no con genes *bla*<sub>TEM</sub> (Tabla 13).

**Tabla 13. Distribución de los perfiles de genes de virulencia asociados a los genes BLEE en las cepas estudiadas.**

Nº genes de virulencia	Perfil de genes de virulencia	BLEE	Patrón Tipo	N (%)
0	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	I	1 (4,5%)
1	<i>fimH</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM</sub> <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	IIa	7 (32%)
	<i>fyuA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	IIb	1 (4,5%)
2	<i>fyuA-KpsMTII</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	IIIa	1 (4,5%)
	<i>fyuA-fimH</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	IIIb	2 (9,1%)
2	<i>fimH-PAI</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>	IIIc	2 (9,1%)
3	<i>fyuA-PAI-papAH</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	IVa	1 (4,5%)
	<i>fyuA-fimH-KpsMTII</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	IVb	2 (9,1%)
4	<i>fyuA-PAI-fimH-KpsMTII</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	V	4 (18,2%)
5	<i>fyuA-PAI-fimH-KpsMTII-usp</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	VI	1 (4,5%)

Fimbria tipo 1 (*fimH*); Yersiniabactina (*fyuA*); Isla de patogenicidad (*PAI*); Cápsula tipo II (*kpsMTII*); Adhesina (*papAH*); Proteína uropatógena específica (*usp*).

## **5. Análisis de la secuenciación de genes *bla* y de virulencia**

La secuenciación de los genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> permitió clasificar esta BLEE como tipo CTX-M-15. Los genes *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> serán secuenciados en estudios futuros. En relación a los genes de virulencia, todos los estudiados en este trabajo se sometieron al análisis de su secuencia, encontrándose una alta correspondencia (99%) con los datos registrados en el GenBank.

## **6. Tipificación de las cepas ExPEC por Rep-PCR.**

La tipificación mediante Rep-PCR permitió dividir las cepas estudiadas en dos grandes grupos A y B, siendo el "cluster" A el mayor conformado por más del 50% de las cepas (13/22). En ambos casos, se observó una alta diversidad clonal, en donde solo 6 cepas fueron agrupadas en clonas con un 100% de homología, 2 cepas en el cluster A (patrón: A2-1) y 4 en el B (patrones: B1-1 y B2-2). Los patrones: A1-1, A1-3 y A1-8 correspondieron a 6 cepas con una homología entre 92% a 95% (Fig. 21). La distribución de las características feno-genotípicas de las cepas ExPEC fueron independientes de su relación clonal (Tabla 14).

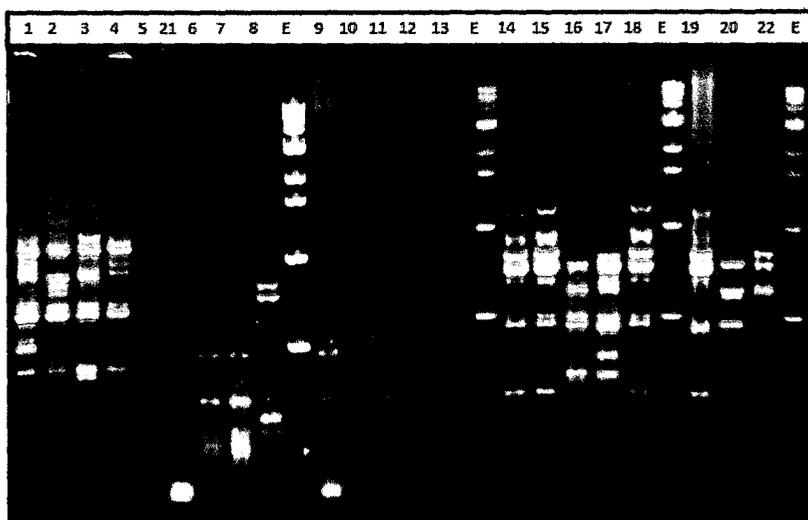


Figura 20. Gel electroforético representativo de la Rep-PCR de las cepas de ExPEC en estudio. E: escalera.

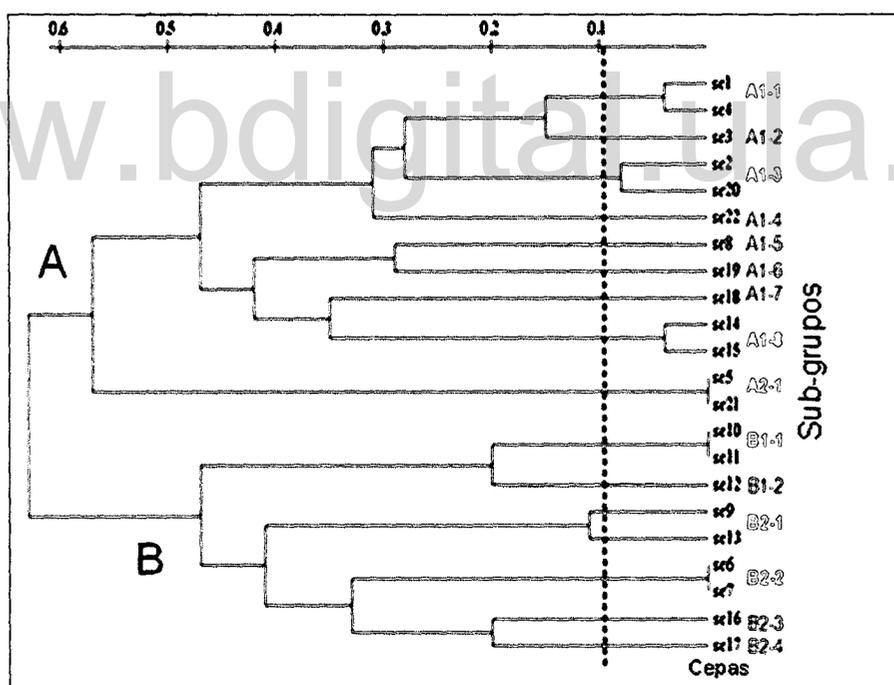


Figura 21. Dendrograma que muestra la relación genética de las 22 cepas de ExPEC incluidas en el estudio. Cada grado en la escala representa un 10% de diferencias en el índice de similitud. Hacia la derecha de la línea punteada se encuentra un índice de similitud por encima del 90%.

**Tabla 14. Diversidad clonal y características fenotípicas y genéticas de las cepas ExPEC estudiadas.**

Patrón Rep-PCR	Nº de Cepas	BLEE	Patrón de resistencia		Genes de virulencia
A1-1	2	CTX-M-2	III	TOB <sup>R</sup> -GTM <sup>R</sup>	<i>fimH</i> , <i>fyuA</i> <i>fimH</i>
A1-2	1	CTX-M-9	III	TOB <sup>R</sup> -GTM <sup>R</sup>	<i>fyuA</i> , <i>papAH</i> , <i>PAI</i>
A1-3	2	CTX-M-1/TEM CTX-M-1	I	TOB <sup>R</sup>	<i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>PAI</i> , <i>KpsMTII</i> <i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>KpsMTII</i>
A1-4	1	TEM	II	TOB <sup>R</sup> -GTM <sup>I</sup>	<i>fimH</i>
A1-5	1	CTX-M-1	III	TOB <sup>R</sup> -GTM <sup>R</sup>	<i>fyuA</i> , <i>KpsMTII</i>
A1-6	1	CTX-M-1	III	TOB <sup>R</sup> -GTM <sup>R</sup>	<i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>PAI</i> , <i>KpsMTII</i>
A1-7	1	CTX-M-1	III	TOB <sup>R</sup> -GTM <sup>R</sup>	<i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>PAI</i> , <i>KpsMTII</i>
A1-8	2	CTX-M1 CTX-M-9/TEM	III	TOB <sup>R</sup> -GTM <sup>R</sup>	<i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>KpsMTII</i> <i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>PAI</i> , <i>KpsMTII</i>
A2-1	2	CTX-M-9/TEM CTX-M-1	III I	TOB <sup>R</sup> /GTM <sup>R</sup> TOB <sup>R</sup>	<i>fimH</i>
B1-1	2	CTX-M-2	III I	TOB <sup>R</sup> /GTM <sup>R</sup> TBO <sup>R</sup>	<i>fimH</i> <i>fyuA</i>
B1-2	1	CTX-M-2	III	TOB <sup>R</sup> -GTM <sup>R</sup>	<i>fimH</i> , <i>PAI</i>
B2-1	2	CTX-M-2	I III	TOB <sup>R</sup> TOB <sup>R</sup> /GTM <sup>R</sup>	<i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>PAI</i> , <i>KpsMTII</i> , <i>usp</i> <i>fimH</i>
B2-2	2	CTX-M-1 CTX-M-2	III	TOB <sup>R</sup> -GTM <sup>R</sup>	<i>fimH</i> <i>fimH</i> , <i>fyuA</i>
B2-3	1	CTX-M-2	I	TOB <sup>R</sup>	N
B2-4	1	CTX-M-8	III	TOB <sup>R</sup> -GTM <sup>R</sup>	<i>fimH</i> , <i>PAI</i>

(R): resistente; (I): intermedia; TBO: tobramicina; GTM: gentamicina; Fimbria tipo 1 (*fimH*); Yersiniabactina (*fyuA*); Isla de patogenicidad (*PAI*); Cápsula tipo II (*kpsMTII*); Adhesina (*papAH*); Proteína uropatógena específica (*usp*); N: Negativo para los genes de virulencia investigados.

## DISCUSIÓN

*E. coli* es uno de los principales patógenos nosocomiales que con frecuencia produce infecciones graves, especialmente en la población pediátrica recluida en las unidades de cuidado intensivo neonatal. Esto es debido a su elevada multirresistencia a los agentes antimicrobianos, especialmente por la producción de enzimas BLEE, considerado como uno de los principales mecanismos de resistencia observado durante las últimas décadas en este patógeno. Por tanto, este hecho supone un reto a la hora de instaurar un tratamiento antimicrobiano eficaz y al mismo tiempo que evite y no favorezca el desarrollo de resistencia asociada a otros mecanismos (Araya y col., 2007; Chang y col., 2008; Castro y col., 2008; Tafur y col., 2008; Díaz y col., 2009; Mantilla y col., 2009; Rodríguez y col., 2010; Martínez y Calvo, 2010).

En este estudio se analizaron 22 cepas de *E. coli* provenientes de neonatos con septicemia nosocomial recluidos en el Hospital Central Universitario "Dr. José María Vargas" de San Cristóbal Edo. Táchira. El estudio de la susceptibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en las cepas ExPEC, reveló un perfil compatible con la producción de BLEE. Observándose además resistencia asociada a otros antimicrobianos, principalmente los aminoglucósidos. Estos resultados avalan lo reportado en la literatura, donde se describe que las cepas de *E. coli* productoras de BLEE son frecuentemente más resistente a los aminoglucósidos que aquellas que no producen esta enzima (Hernández y col., 2006; Gaitán y Espinal, 2009; Mirzaee y col., 2009; Ruppé y col., 2009; Martínez y Calvo, 2010; García y col., 2011). Esta

característica podría suponer la presencia de otros mecanismos de resistencia asociados a la producción de BLEE, como lo son: enzimas modificadoras de aminoglucósidos, bombas de eflujo, alteraciones de la permeabilidad de la pared celular, entre otros (Perozo y col., 2007; Martínez y Calvo, 2010).

La investigación de genes codificadores de BLEE por amplificación a través de PCR en las cepas de *E. coli*, reveló la presencia de enzimas de la familia TEM y CTX-M, siendo esta última la de mayor frecuencia (95,4%), destacando el subgrupo CTX-M-1, sobre los subgrupos CTX-M-2, CTX-M-8 y CTX-M-9. La secuenciación de los genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> permitió su clasificación como BLEE tipo CTX-M-15. Estos resultados son respaldados por la tendencia mundial actual donde los aislados de *E. coli* con BLEE expresan enzimas de tipo CTX-M principalmente la CTX-M-15 (Al-Agamy y col., 2006; Sonnevend y col., 2006; Dubois y col., 2009; Rodríguez y col., 2010). Esta enzima se considera como la BLEE de mayor diseminación en el mundo especialmente en Latinoamérica. (Morales y col., 2005; Andrade y col., 2006; Vignoli y col., 2006; Castro y col., 2008; Gaitán y Espinal, 2009; McGettigan y col., 2009; Mantilla y col., 2009; Mizaee y col., 2009; Pitout, 2010; García y col., 2011; Al y col., 2011; Nazik y col., 2011; Pitout, 2012).

Otra particularidad observada en las cepas estudiadas es que el 18,2% presentó asociaciones o combinaciones de distintas  $\beta$ -lactamasas (*bla*<sub>TEM</sub>+*bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>+*bla*<sub>CTX-M-2</sub> y *bla*<sub>TEM</sub>+*bla*<sub>CTX-M-1</sub>). Estas asociaciones han sido descritas ampliamente en la literatura y obedecen principalmente a la naturaleza transponible y de recombinación de los

genes *bla* (Araque y Rivera, 2004; Pournaras y col., 2004; Cantón y Coque, 2006; Goyal y col., 2009; Gaitán y Espinal, 2009; Espinal y col., 2010; Al y col., 2011; Hernández y Araque, 2011).

En Venezuela son pocos los estudios de caracterización genética en cepas de enterobacterias productoras de BLEE, los reportes que se conocen se han realizado principalmente en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae* (Araque y col., 2000; Araque y Rivera, 2004; Torres y col., 2006; Guzmán y Alonso., 2009), *Shigella sonnei* (Torres y col., 2005) *Citrobacter freundii* (Millán y col., 2011) y *Salmonella enterica* obtenidas de muestras clínicas y alimentos (González y col., 2012). Sin embargo, destaca el estudio llevado a cabo en Mérida por Hernández y Araque (2011), quienes determinaron la presencia de BLEE SHV, TEM y CTX-M-1 en cepas UPEC aisladas de pacientes de la comunidad, donde el 95,2% de las cepas eran productoras de CTX-M.

La masiva diseminación denominada pandemia CTX-M, es uno de los mejores ejemplos de la rápida dispersión de los genes de resistencia bacteriana mediada por elementos genéticos extracromosomales (Cantón y Coque, 2006; Díaz y col., 2009; Espinal y col., 2010; Rajesh y col., 2010; Nazik y col., 2011; García y col., 2011). Este fenómeno se evidenció en los ensayos de conjugación donde el 36,4% de las cepas transfirieron los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>TEM</sub>. De este modo, se infiere que la transmisión de genes *bla*<sub>BLEE</sub> están codificados en plásmidos conjugables (Pournaras y col., 2004; Torres y col., 2005; Sonnevend y col., 2006; Valenzuela y col., 2006; Khalaf y col., 2009; Guzmán y Alonso, 2009). Este hallazgo debe ser considerado como un factor favorecedor de la

diseminación de genes *bla* en el centro hospitalario, ya que esta condición genética pudiera ocasionar el surgimiento de brotes de infección nosocomial en determinadas áreas clínicas de alto riesgo (Valenzuela y col., 2006). Sin embargo, no se descarta la posibilidad que en las cepas donde la conjugación no pudo ser comprobada, existan otros mecanismos de transferencia genética, como la transformación o la presencia de otras estructuras genéticas que requieren mecanismos de transferencia o recombinación específicos (integrones y/o transposones).

Otro de los factores que favorecen la producción y diseminación de infecciones por *E. coli*, además de la producción de BLEE y resistencia asociada a otros antimicrobianos, es la presencia de múltiples factores de virulencia y/o patogenicidad, los cuales permiten a este microorganismo evitar o sobrevivir a los mecanismos de defensa del hospedero y ocasionar infecciones en áreas anatómicas distintas a la intestinal. Para este estudio se seleccionaron 6 de los 20 principales genes de virulencia descritos para ExPEC (Ananias y Yano, 2008; De Mello y col., 2009). Observándose que los genes de virulencia relacionados con la fimbria tipo 1 (*fimH*), sideróforos (*fyuA*), capsulares (*KpsMTII*) e islas de patogenicidad (*PAI*), mostraron un mayor predominio en las cepas estudiadas, en comparación con los genes asociados a la proteína uropatógena específica (*usp*) y la adhesina (*papAH*). Estos hallazgos son similares a los reportados, por Johnson y Stell, (2000) y Ribeiro y col., (2008) en cepas UPEC, así como los descritos por Ananias y Yano, (2008) en cepas ExPEC provenientes

de pacientes con sepsis. Por otra parte, adicionalmente este estudio permitió evidenciar la importancia que poseen la asociación de los genes de virulencia y las enzimas BLEE en la instauración del proceso infeccioso, donde el patrón II conformado por los genes *fimH* o *fyuA* asociados a los diversos genes *bla* detectados (excepto *bla*<sub>CTXM-8</sub>), resultó ser el de mayor frecuencia (36,5%). Otro aspecto importante de destacar es que los genes de virulencia al igual que las BLEE se encuentran localizados en plásmidos o islas de patogenicidad que pueden ser transmitidos de una cepa a otra junto a otros mecanismos de resistencia, representando un factor de riesgo importante, al circular cepas con una gran carga de información genética (Soto, 2006; Ananias y Yano, 2008; Karisik y col., 2008; Ribeiro y col., 2008; Zalewska y col., 2009; Dubois y col., 2009).

Desde el punto de vista clínico-epidemiológico, las BLEE continúan generando importantes problemas terapéuticos debido a la inactivación de casi todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos exceptuado las cefamicinas y los carbapenemos, considerados estos últimos la principal alternativa terapéutica en las infecciones producidas por bacterias productoras de BLEE (Hernández y col., 2006; Tamayo y col., 2007; Pitout y Laupland, 2008; Gaitán y Espinal, 2009; Oteo y col., 2010; Martínez y Calvo, 2010; García y col., 2011; Nazik y col., 2011). Sin embargo, se suma a la presencia de BLEE la co-resistencia a otros antimicrobianos cada vez con mayor frecuencia, lo que dificulta la instauración de una terapia antibiótica adecuada. Por tanto, es indispensable llevar a cabo estudios de los patrones clínico-epidemiológicos en las septicemias por *E. coli* con BLEE que permita

estructurar protocolos tanto para el diagnóstico y detección precoz de estas enzimas como para prevenir y contener la diseminación de genes de resistencia.

En este contexto, es importante señalar que la tipificación molecular es una herramienta indispensable para el estudio y control epidemiológico de las infecciones producidas ExPEC. La relación clonal establecida por Rep-PCR en las cepas analizadas, evidenció una gran variabilidad genética dentro de los aislados de *E. coli*, lo cual sugiere la aparición de cepas resistentes específicas más que la circulación y transmisión de una clona habitual entre los neonatos con septicemia nosocomial. La policlonalidad observada no demostró la presencia de cepas endémicas en la institución ni tampoco la asociación con brotes epidémicos. Sin embargo, 95,5% de las cepas fueron productoras de BLEE y presentaron por lo menos un factor de virulencia.

Los hallazgos de este estudio representan un aporte importante, ya que, por primera vez en Venezuela se reportan las características genéticas que determinan el comportamiento multirresistente y la potencialidad patogénica de cepas ExPEC, productoras de septicemia nosocomial en neonatos. En este sentido, es necesario continuar profundizando los estudios epidemiológicos de prevalencia y caracterización de las BLEE, su asociación con la resistencia a otros antimicrobianos, así como el establecer la relación genética con diversos factores de virulencia con la

finalidad de reducir el surgimiento y diseminación de clonas altamente patógenas en áreas de alto riesgo, especialmente las destinadas a los cuidados en pediatría.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CONCLUSIONES

1. Se evidenció la alta prevalencia de BLEE CTX-M en cepas de ExPEC aisladas de hemocultivos, corroborando el predominio de esta enzima en aislados de *E. coli*. Además, se comprobó genéticamente la presencia de genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub> y *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, que en algunos casos se asoció a genes *bla*<sub>TEM</sub>. Este es el primer reporte que señala la circulación de cepas ExPEC productoras de CTX-M provenientes de pacientes con septicemia nosocomial del Hospital Central Universitario “Dr. José María Vargas” de San Cristóbal Estado Táchira.
2. Las cepas de ExPEC expresaron fenotípicamente diversos patrones de resistencia. Destacando la asociación de genes *bla* con resistencia a los aminoglucósidos.
3. La tipificación por Rep-PCR reveló la circulación de dos cluster principales con una gran diversidad genética entre las cepas productoras de BLEE, no encontrándose evidencia de diseminación clonal.
4. Este es el primer estudio de caracterización molecular de cepas ExPEC basado en los genes de virulencia en pacientes con

septicemia nosocomial en Venezuela. Donde los genes *fimH*, *fyuA*, *KpsMTII* y *PAI* fueron los más frecuentes.

5. Las septicemia por *E. coli* con BLEE CTX-M, constituye una entidad clínica grave que supone un reto terapéutico, debido a la multirresistencia observada por este patógeno bacteriano, por el uso inadecuado e indiscriminado de los antimicrobianos lo que favorece el desarrollo de resistencia por otros mecanismos.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## RECOMENDACIONES

1. La prevalencia de BLEE en ExPEC, sugiere el establecimiento de estrategias epidemiológicas destinadas a contribuir con el uso adecuado de los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro e implementar medidas de higiene para el control de las infecciones y la prevención de la diseminación de microorganismos productores de BLEE.
2. Realizar una vigilancia estricta desde el laboratorio, mediante la implementación de manera rutinaria de la lectura interpretada del antibiograma, a fin de posibilitar un abordaje terapéutico adecuado.
3. Continuar con los estudios de caracterización genética en las cepas ExPEC productoras de BLEE, con el fin de conocer la diversidad de genes *bla*, especialmente los relacionados a la BLEE CTX-M y sus subgrupos.
4. Complementar el estudio de caracterización genética de los genes de virulencia en las cepas ExPEC productoras de BLEE.
5. Mantener bajo vigilancia epidemiológica las cepas ExPEC aisladas en el Hospital Central Universitario "Dr. José María Vargas" de San Cristóbal Estado Táchira.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA

1. Al, G.; Al, N.; Jamal, W. y Rotimi, V. (2011). Sequence Analysis of *bla*<sub>CTX-M</sub> Genes Carried by Clinically Significant *Escherichia coli* Isolates in Kuwait Hospitals. *Med Princ Pract*, 20:213-219.
2. Al-Agamy, M.; El-Din, M. y Wiegand, I. (2006). First description of CTX-M  $\beta$ -lactamase-producing clinical *Escherichia coli* isolates from Egypt. *Int J Antimicrob Agents*, 27 (6): 545-548.
3. Alvarez, D. (2010). Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. *Rev Haban Cienc Méd*, 9 (4): 516-524.
4. Ananias, M. y Yano, T. (2008). Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Braz J Med Biol Res*, 41 (10): 877-883.
5. Andrade, S.; Sader, H.; Jones, R.; Pereira, A.; Pignatari, A. y Gales, A. (2006). Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: Time for local guidelines?. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 101 (7): 741-748.
6. Andreu, A. (2005). Patogenia de las infecciones del tracto urinario. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 23 (Supl 4),15-21.
7. Araque, M.; Nieves, B.; Lauretti, L. y Rossolini, G. (2000). Molecular basis of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Mérida, Venezuela. *Int J Antimicrob Agents*, 15 (1): 37-42.

8. Araque, M. y Rivera, I. (2004). Simultaneous presence of *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> genes on a large conjugative plasmid carried by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Am J Med Sci*, 327 (3): 118-22.
9. Araya, C.; Boza, R.; Arguedas, L.; Badilla, G. y García, F. (2007). Infecciones nosocomiales por bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasa de espectro ampliado: prevalencia, factores de riesgo y análisis molecular. *AMC*, 49 (2): 90-96.
10. Barrios, A. (1988). *Bacteriología y virología básicas* (1<sup>ra</sup> ed). Editorial Venezolana C.A., Mérida Venezuela.
11. Blanco, M.; Blanco, J.; Blanco, J.; Alonso, M.; Abalia, I.; Rodríguez, E.; Bilbao, J. y Umaran, A. (1995). Factores de virulencia y serogrupos O de *Escherichia coli* causantes de infecciones urinarias comunitarias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 13 (4): 236-241.
12. Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *AAC*, 48 (1): 1-14.
13. Castro, N.; Carreón, D.; Moreno, M. y Alarcón, L. (2008). Caracterización molecular de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28 (3): 114-120.
14. Cantón, R. y Coque, T. (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*, 9: 466-475.
15. Chang, D.; Arias, J., Arroyo, G.; Cavenago, A.; Cavenago, E.; Málaga, G. y Tapia, E. (2008). Perfil de resistencia de las bacterias aisladas de

- hemocultivos en un hospital general. *Rev Soc Perú Med Interna*, 21 (2): 62-65.
16. CLSI. (2011). Clinical and laboratory Standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21<sup>th</sup> informational supplement. Document M100-S19. Wayne, PA.
17. Comegna, M.; Guzmán, M.; Carmona, O.; Molina, M. y Grupo Colaborativo del Grupo Venezolano de Resistencia Bacteriana. (2000). Resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela-Nuevos hallazgos. *Rev Soc Ven Microbiol*, 20 (1): 88-88.
18. Cortés, J.; Urdaneta, A.; Potdevin, G.; Cuervo, S. Bermúdez, D.; Molina C. y Arroyo, P. (2006). Impacto de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en pacientes con cáncer. *Rev Colomb Cancerol*, 10 (3): 183-196.
19. De Mello, A.; Campos, A.; Silva, R.; Matos, A. y Gales, A. (2009). A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação á idade e ao sexo do hospedeiro. *O Mundo Da Saúde, São Paulo*, 33 (4): 392-400.
20. De Oliveira, C.; Frazzon, N.; Almeida, I.; Horta, J.; Rieger, A. y Hartz, S. (2009). Prevalência das familias TEM, SHV e CTX-M de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp no Hospital Universitário de Santa María, Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*, 42 (5): 556-560.
21. Di Conza, J.; Ayala, J.; Power, P.; Mollerach, M y Gutkind, G. (2002). Novel class 1 integron (InS21) carrying *bla*<sub>CTX-M-2</sub> in *Salmonella*

- enterica* serovar Infantis. *Antimicrob Agents Chemother*, 46 (7): 2257-2261.
22. Díaz, M.; Hernández, J.; Martínez, L.; Rodríguez, J.; Pascual, A.; y Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). (2009). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27 (9): 503-510.
23. Dubois, D.; Prasadarao, N.; Mittal, R.; Bret, L.; Roujou, M. y Bonnet, R. (2009). CTX-M  $\beta$ - lactamase production and virulence of *Escherichia coli* K1. *Emerg Infect Dis*, 15 (12): 1988-1990.
24. Eckert, C.; Gautier, V. y Arlet G. (2006). DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. *J Antimicrob Chemother*, 57 (1):14-23.
25. Espinal, P.; Garza, U.; Reyna, F.; Rojas, T.; Sanchez, A.; Carrillo, B.; Martinez, P.; Mattar, S. y Silva, J. (2010). Identification of SHV-type and CTX-M-12 Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in Multiresistant *Enterobacteriaceae* from Colombian Caribbean Hospitals. *J Chemother*, 22 (3): 160-164.
26. Emödy, L.; Kerényi, M. y Nagy, G. (2003). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*, 22, 29-33.
27. Fernández, F. (2004). Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22(6): 355-360.

28. Gaitán, S. y Espinal, M. (2009). Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *klebsiella pneumoniae* productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en Hospitales de la Región Caribe, Colombia. *Rev Chil Infect*, 26 (3): 239-246.
29. García, A; García, E.; Hernández, A.; Ruiz, J.; Yagüe, G.; Herrero, J. y Gómez, J. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter*, 24 (2): 57-66.
30. Ghiglione, B.; Millán, B.; González, A.; Gutkind, G. y Araque, M. (2010) *klebsiella pneumoniae* productora de CTX-M-2 aislada en una unidad de alto riesgo neonatal en Venezuela. *Memorias del XX Congreso Latinoamericano de Microbiología* (pp. 178). Uruguay.
31. González, L.; Ramos, A.; Nadal, L.; Morffi, J.; Hernández, E.; Álvarez, A.; Marchena, J.; González, M. y Vallin, C. (2007). Identificación fenotípica y molecular de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido TEM y SHV producidas por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. aislados clínicos en hospitales. *Rev Cubana Med Trop*, 59 (1): 52-58.
32. González, F.; Pallecchi, L.; Rossolini, G. y Araque, M. (2012). Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrB19 in non-typhoidal *Salmonella enterica* strains isolated in Venezuela. *J Infect Dev Ctries*, 6 (5): 462-464.
33. Goyal, A.; Prasad, K.; Prasad, A.; Gupta, S.; Ghoshal, U. y Ayyagari, A. (2009). Extended spectrum  $\beta$ -lactamasas in *Escherichia coli* &

- Klebsiella pneumoniae* & associated risk factors. *Indian J Med Res*, 129. 695-700.
34. Guzmán, M. y Alonso, G. (2009). Caracterización de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae* Sucre-Venezuela. *Invest Clin*, 50 (4): 419-431.
35. Harada, S.; Ishii, Y. y Yamaguchi, k. (2008). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamasas: Implications for the Clinical Laboratory and Therapy. *Korean J Lab Med*, 28: 401-412.
36. Hernández, W.; Ramos, A.; Nodarse, R.; Padrón, A. y De Armas, E. (2006). Resistencia bacteriana en las bacterias productoras de Betalactamasas extendidas (BLEE). *Rev Cub Med Int Emerg*, 5 (1): 256-264.
37. Hernández, E. y Araque, M. (2011). Perfil fenotípico y molecular de *Escherichia coli* uropatógena productora de  $\beta$ -lactamasa de espectro expandido. Tesis de grado (datos no publicados).
38. Johnson, J y Stell, A. (2000). Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *J Infect Dis*, 181 (1): 261-272.
39. Jure. M.; Presti, C.; Cudmani, N.; Grellet, L.; López, C.; Musa, E.; Aulet, O.; Nieto, C.; Saavedra, L. y De Castillo, M. (2011).  $\beta$ -lactamasas AmpC plasmídicas tipo CMY-2 emergentes en Tucumán, Argentina. *Rev Argent Microbiol*, 43: 24-27.
40. Karisik, E.; Ellington, M.; Livermore, D. y Woodford, N. (2008). Virulence factors in *Escherichia coli* with CTX-M-15 and other

- extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother*, 61: 54-58.
41. Khalaf, N.; Eleteby, M. y Hanson, N. (2009). Characterization of CTX-M ESBLs in *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Cairo, Egypt. *BMC Infect Dis*, 9: 84.
42. Lezameta, L.; Gonzáles, E. y Tamariz, J. (2010). Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 27 (3): 345-351.
43. Lozano, D.; Cisneros, J.; Becerril, B.; Cuberos, L.; Prados, T.; Ortiz, C.; Cañas, E.; Pachón, J.; Mahillon, J.; Chandler, M. (2002). Comparison of repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR clinical and microbiological methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Clin Microbiol*. 40 (12): 4571-4575.
44. Mantilla, J.; Barreto, E.; Reguero, M. y Velandia, D. (2009). Identificación por PCR-SSCP de genes de cefotaximasas en aislamientos hospitalarios de *Enterobacteriaceae*. *Rev colomb. Biotecnol*, 11 (2): 57-65.
45. Martínez, M.; Azuara, J.; Castillo, B.; Cruz, W.; Rivera, G. y Bocanegra, V. (2007). Detección de factores de patogenicidad de *E. coli* enteropatógena y enterohemorrágica a partir de muestras de alimentos mediante PCR. *Bioquímica*, 32: 116.

46. Martínez, L. y Calvo, J. (2010). El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28 (supl 2): 25-31.
47. Máttar, S.; Visbal, J. y Arrieta, G. (2001). *E. coli* 0157:H7 Enterohemorrágico: un agente etiológico de diarrea y zoonosis en Colombia subestimado. Parte I. *MVZ-Córdoba*, 6 (1): 15-23.
48. Máttar, S. y Martínez, P. (2007). Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología. *Infection*, 11(1): 23-35.
49. McGettigan, Sh.; Hu, B.; Andreacchio, K.; Nachamkin, I. y Edelstein, P. (2009). Prevalence of CTX-M  $\beta$ -lactamasas in Philadelphia, Pennsylvania. *J Clin Microbiol*, 47: 2970-2974.
50. Millán, B.; Ghiglione, B.; Díaz, T.; Gutkind, G. y Araque, M. (2011). CTX-M-14  $\beta$ -lactamase producing *Citrobacter freundii* isolated in Venezuela. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 10 (22).
51. Mirzaee, M.; Owlia, P. y Mansouri, S. (2009). Distribution of CTX-M  $\beta$ -lactamase Genes Among *Echerichia coli* Strains Isolated from Patients in Iran. *Labmedicine*, 40 (12).
52. Morales, R. (2003). Terapia de bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. *Rev Chil Infect*, 20 (Supl 1): 24-27.
53. Morales, J.; Reyes, K.; Monteghirfo, M.; Roque, M. y Irey, J. (2005). Presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en dos Hospitales de Lima, Perú. *An Fac Med Lima*, 66 (1): 24-32.

54. Moreno, E.; Planells, I.; Prats, G.; Planes, A.; Moreno, G. y Andreu, A. (2005). Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 53: 93-99.
55. Moreno, C.; González, R. y Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Rev Otorrinolaringol*, 69: 185-192.
56. Murray, P.; Rosenthal, K.; Kobayashi, G. y Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica* (4ta ed). Editorial Elsevier, Madrid España.
57. Nazik, H.; Öngen, B.; Erdogan, E. y Ermis, F. (2011). High prevalence of CTX-M-type beta-lactamase in *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and displaying antibiotic co-resistance. *African J Microbiol Research*, 5 (1): 44-49.
58. NCBI. (S/F). Disponible en: [www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy)
59. NCBI. (S/F). Disponible en: [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)
60. Oteo, J.; Pérez, M. y Campos, J. (2010). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. *Curr Opin Infect Dis*, 23 (4): 320-326.
61. Pacheco, C. y Felipe, I. (1991). Características patogénicas de *Escherichia coli*. *Semina*, 12 (2): 83-90.
62. Perozo, A.; Castellano, M.; Ginestre, M. y Harris, B. (2007). Caracterización Molecular y Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en Cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas en las

- Unidades de Cuidados Intensivos de un Hospital Universitario.  
*Kasmera*, 35 (2): 91-106.
63. Perozo, A. y Castellano, M. (2009). Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en cepas de la familia *Enterobacteriaceae*.  
*Kasmera*, 37 (1): 25-37.
64. Pitout, J. (2010). Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs*, 70 (3): 313-33.
65. Pitout, J. (2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Front Microbio*, 3 (9).
66. Pitout, J. y Laupland, K. (2008). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*, 8: 159-166.
67. Pournaras, S.; Ikonomidis, A.; Kristo, I.; Tsakris, A. y Maniatis, A. (2004). CTX-M enzymes are the most common extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Escherichia coli* in a tertiary Greek hospital. *J Antimicrob Chemother*, 54 (2): 574-575.
68. Rajesh, K.; Mathavi, S. y Indra, R. (2010). Molecular typing of *bla*<sub>CTX-M</sub>  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* from clinical isolates. *International Journal of Medical and Clinical Research*, 1: 03-05.
69. Ribeiro, M.; Yano, T. y Da Silva, D. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 50 (5): 255-260.

70. Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública Mex*, 44 (5): 464-475.
71. Rodríguez, J.; Picón, E., Gijón, P.; Hernández, J.; Cisneros, J., Peña, C.; Almela, M.; Almirante, B.; Grill, F.; Colomina, J.; Molinos, S.; Oliver, A.; Fernández, C.; Navarro, G., Coloma, A.; López, L. y Pascual, A. (2010). Risk Factors and Prognosis of Nosocomial Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum- $\beta$ -lactamase-Producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 48 (5): 1726-1731.
72. Ruppé, E.; Hem, S.; Lath, S., Gautier, V., Arieu, F.; Sarthou, J.; Monchy, D. y Arlet, G. (2009). CTX-M  $\beta$ -Lactamases in *Escherichia coli* from Community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. *EID*, 15 (5): 741-748.
73. Sandra, L.; Paz, A.; Piña, E. y Perozo, A. (2007). Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido aisladas de hemocultivos en un Hospital Universitario de Venezuela. *Kasmera*, 35 (1): 15-25.
74. Sidjabat, H.; Paterson, D.; Adams, J.; Ewan, L.; Pasculle, A.; Muto, C.; Tian, G. y Doi, Y. (2009). Molecular epidemiology of CTX-M- producing *Escherichia coli* isolates at a tertiary medical center in Western Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 4733-4739.
75. Snelling, A.; Gener, P.; Hawkey, P.; Heritage, J.; Parnell, P.; Porter, C.; Bodenham, A. y Ingils, T. (1996). Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for

- typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of method to the investigation of a hospital outbreak. *J Clin Microbiol*, 34 (5): 1193-1202.
76. Soto, S. (2006). Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 24 (8): 479-480.
77. Sousa, C. (2006). The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 12 (3): 363-373.
78. Sonnevend, A., Al, K.; Mag, T.; Herpay, M.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N.; Usmani, A., Sheikh, F. y Pál, T. (2006). CTX-M-15-producing multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli* in the United Arab Emirates. *Clin Microbiol Infect*, 12: 582-585.
79. Tafur, J.; Torres J. y Villegas, M. (2008). Mecanismos de Resistencia a los antibióticos en bacterias gramnegativas. *Asoc Col Infec*, 12 (3): 223-233.
80. Tamayo, J., Orden, B.; Cacho, J.; Cuadros, J.; Gómez, J. y Alós, J. (2007). Activity of ertapenem and other antimicrobials against ESBL-producing enterobacteria isolated from urine in patients from Madrid. *Rev Esp Quimioterap*, 20 (3): 234-238.
81. Técnico de Enfermería. (2009). Disponible en: [www.tecnicoenfermeria.com/2009/09/uso-de-tincionesenmicroorganismos.php](http://www.tecnicoenfermeria.com/2009/09/uso-de-tincionesenmicroorganismos.php)
82. Torres, L.; Rodríguez, D.; Machado, Y.; Cova, L.; Comegna, M.; Calvo, A. y Pedroza, R. (2005). Detección de B-lactamasas de espectro

- expandido CTX-M grupo-1 en *Shigella sonnei* aislada de un coprocultivo en el Laboratorio de Microbiología de la Policlínica Santiago de León. <http://caibco.ucv.ve>.
83. Torres, L.; Gagliotta, V.; Torres, O.; Benítez, M.; Domínguez, M. y Pedroza, R. (2006).  $\beta$ -Lactamasas de Espectro Expandido en Enterobacterias aisladas en Centros de Salud de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol*, 26 (2): 80-88.
84. TUM (Technische Universität München). (S/F). Disponible en: <http://www.doping-prevention.de/es/human-body/>
85. Valenzuela, E.; Mantilla, J.; Reguero, M.; González, E.; pulido, I.; Llerena, I.; y Velandia, D. (2006). Detection of CTX-M-1, CTX-m-15, and CTX-M-2 in Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* in Bogota, Colombia. *J Clin Microbiol*, 44 (5): 1919-1920.
86. Vergara, V.; Rodríguez, Y.; Benítez, E.; Garmendia, Y.; Morales, M. López, R. y Torres, L. (2007). Enterobacterias productoras de Beta Lactamasa de espectro expandido en pacientes críticos de la Maternidad «Concepción Palacios» *Act Cient de la Soc Venz de Bioanal Espec*, 10 (1): 33-38.
87. Vignoli, R.; Cordeiro, N.; Seija, V.; Schelotto, F.; Radice, M.; Ayala, A.; Power, P. Y Gutkind, G. (2006). Entorno genético de CTX-M-2 en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes hospitalizados en Uruguay. *Rev Argent Microbiol*, 38: 84-88.
88. Weintraub, A. (2007). Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J Med Microbiol*, 56: 4-8.

89. Winn, C.; Allen, S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P. y Woods, G. (2008). *Diagnóstico Microbiológico* (6<sup>ta</sup> ed). Editorial Panamericana, Madrid España.
90. Zalewska, B.; Wilkanowicz, S.; Piatek, R. y Kur, J. (2009). Biofilm formation as a virulence determinant of uropathogenic *Escherichia coli* Dr Strains. *Pol J microbiol*, 58 (3): 223-229.
91. Zemelman, R.; Valenzuela, L.; Domínguez, M.; Bello, H.; González, G. y Zemelman, C. (2002). Detección de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en el laboratorio de microbiología. *Rev Chil Infect*, 19 (Supl 2):92-95.

www.bdigital.ula.ve