

ARTÍCULO ORIGINAL

## Diversidad genética de cepas extraintestinales de *Escherichia coli* productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención en salud

Yasmin Varela<sup>1,2</sup>, Beatriz Millán<sup>1\*</sup>, María Araque<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

<sup>2</sup> Posgrado de Microbiología Clínica, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

**Introducción.** En Venezuela existen pocos reportes que describan las bases genéticas del potencial patogénico y filogenético de las cepas de *Escherichia coli* provenientes de hospitales.

**Objetivo.** Determinar la diversidad genética de cepas extraintestinales de *E. coli* productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención de salud.

**Materiales y métodos.** Se estudió una colección de 12 cepas extraintestinales de *E. coli* con sensibilidad disminuida a las cefalosporinas de amplio espectro. La sensibilidad antimicrobiana se determinó por concentración inhibitoria mínima. La detección de los grupos filogenéticos, de los factores de virulencia y de los genes que codifican la resistencia antimicrobiana se hizo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y la relación clonal se estableció mediante reacción en cadena de la polimerasa de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (*Repetitive Element Palindromic-PCR*, rep-PCR).

**Resultados.** Todas las cepas analizadas presentaron resistencia a las cefalosporinas, y resistencia conjunta a quinolonas y aminoglucósidos. La distribución filogenética evidenció que los grupos A y B1 fueron los más frecuentes, seguidos por D y B2; en este último, se detectaron todos los factores de virulencia evaluados, y el gen más frecuente fue el *fimH*. En todas las cepas analizadas, se encontró *bla*<sub>CTX-M</sub><sup>1</sup>, con predominio de las *bla*<sub>CTX-M-8</sub><sup>1</sup> y en dos de estas cepas se evidenció la presencia simultánea de *bla*<sub>CTX-M-9</sub><sup>1</sup>, variantes *bla*<sub>CTX-M-65</sub> y *bla*<sub>CTX-M-147</sub><sup>1</sup>.

**Conclusión.** Las cepas estudiadas demostraron diversidad genética y albergaron diferentes genes de virulencia y betalactamasas de espectro extendido (BLEE) sin predominio de ningún filogeno en particular. Este estudio constituye el primer reporte de la variante *bla*<sub>CTX-M-65</sub> en Venezuela y de la variante *bla*<sub>CTX-M-147</sub> en el mundo, en cepas no relacionadas genéticamente aisladas de hospitales, situación que merece atención y la racionalización del uso de los antimicrobianos.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*; infección hospitalaria; betalactamasas; filogenia; reacción en cadena de la polimerasa.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3324>

### Genetic diversity of extraintestinal *Escherichia coli* strains producers of beta-lactamases TEM, SHV and CTX-M associated with healthcare

**Introduction:** There are few reports from Venezuela describing the genetic basis that sustains the pathogenic potential and phylogenetics of *Escherichia coli* extraintestinal strains isolated in health care units.

**Objective:** To establish the genetic diversity of extraintestinal *E. coli* strains producers of beta-lactamases TEM, SHV and CTX-M associated with healthcare.

**Materials and methods:** We studied a collection of 12 strains of extraintestinal *E. coli* with diminished sensitivity to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrobial susceptibility was determined by minimum inhibitory concentration. We determined the phylogenetic groups, virulence factors and genes encoding antimicrobial resistance using PCR, and clonal characterization by repetitive element palindromic-PCR rep-PCR.

**Results:** All strains showed resistance to cephalosporins and joint resistance to quinolones and aminoglycosides. The phylogenetic distribution showed that the A and B1 groups were the most frequent, followed by D and B2. We found all the virulence factors analyzed in the B2 group, and *fimH*

#### Contribución de los autores:

Yasmin Varela y Beatriz Millán: caracterización fenotípica y molecular de las cepas estudiadas, análisis bioinformático

María Araque: diseño del estudio y discusión crítica

Todas las autoras participaron en la escritura del manuscrito.

gene was the most frequent among them. We found *bla*<sub>CTX-M</sub> in all strains, with a higher prevalence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub>; two of these strains showed coproduction of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> and were genetically identified as *bla*<sub>CTX-M-65</sub> and *bla*<sub>CTX-M-147</sub> by sequencing.

**Conclusion:** The strains under study showed genetic diversity, hosting a variety of virulence genes, as well as antimicrobial resistance with no particular phylogroup prevalence. This is the first report of *bla*<sub>CTX-M</sub> alleles in Venezuela and in the world associated to non-genetically related strains isolated in health care units, a situation that deserves attention, as well as the rationalization of antimicrobials use.

**Key words:** *Escherichia coli*; cross infection; beta-lactamases; phylogeny; clonal diversity; polymerase chain reaction.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3324>

*Escherichia coli* constituye parte de la microbiota habitual del intestino de muchos animales, incluidos los humanos. Según su relación con el huésped se agrupa en cepas comensales, patotipos intestinales y patógenas extraintestinales (*Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli*, ExPEC) (1). Este último grupo es la causa principal de infecciones urinarias, abdominales y de tejidos blandos, así como de meningitis, neumonía, bacteriemias y osteomielitis (2).

Las cepas de *E. coli* son genéticamente diversas y las diferencias entre las patógenas y las comensales se fundamentan en sus antecedentes filogenéticos, con base en los cuales se clasifican en cuatro grupos principales: A, B1, B2 y D (3). Las cepas A y B1 se consideran de bajo poder virulento, en tanto que las patógenas extraintestinales albergan genes que codifican factores de virulencia responsables de promover las etapas de colonización, adherencia, invasión y evasión de los mecanismos de defensa del huésped humano, y pertenecen principalmente a los filogrupos B2 y D (1,4,5).

Tradicionalmente, los antibióticos betalactámicos se han utilizado para el tratamiento de las infecciones producidas por *E. coli*. Sin embargo, en los últimos años su efectividad se ha visto amenazada por el incremento en la prevalencia de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (6). La mayoría de las BLEE producidas por miembros de la familia Enterobacteriaceae son variantes alélicas de las conocidas betalactamasas TEM y SHV (7), pero desde los años 90, otras

enzimas identificadas como CTX-M de la clase A de Ambler, se han diseminado rápidamente en todo el mundo (6).

La relación entre los genes que median la resistencia antimicrobiana, los grupos filogenéticos y la presencia de factores determinantes de virulencia como indicadores de patogenicidad es controversial (2,8). No obstante, Lee, *et al.* (9), encontraron una estrecha relación entre los genes involucrados en el transporte del hierro (*iutA*), la supervivencia en el suero (*traT*) y la presencia de CTX-M-1 y CTX-M-9 en aislamientos de *E. coli* extraintestinales del grupo B2.

En este contexto, recientemente se reportó por primera vez en Latinoamérica la presencia de cepas de *E. coli* uropatógenas productoras de CTX-M-15, filogrupo B2, provenientes de la comunidad, que portaban por lo menos cinco genes asociados a virulencia (*fimH*, *kpsMTII*, *papAH*, *fyuA* y *usp*), así como islas de patogenicidad (10). La diseminación mundial de la CTXM-15 y de clones patógenos, como el tipo ST131, parece responder a una eficiente plataforma genética de transferencia horizontal de genes de resistencia y virulencia mediante la inserción de secuencias genéticas específicas, transposones y plásmidos (11).

Las técnicas de genotipificación se han convertido en herramientas valiosas para el análisis de bacterias, especialmente, las involucradas en infecciones hospitalarias. Entre dichas técnicas se encuentra la amplificación de elementos repetitivos palindrómicos por PCR (*repetitive element palindromic-PCR*, rep-PCR), la cual tiene una gran capacidad de discriminación y puede emplearse para la detección rápida de la diversidad y la evolución de los genomas bacterianos (12).

En Venezuela son pocos los reportes que describen las bases genéticas que sustentan el potencial patológico de los grupos filogenéticos y la relación clonal de *E. coli* extraintestinales (ExEC) productoras de BLEE asociadas a la atención en salud (13).

Correspondencia:

Beatriz Millán, Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Sector Campo de Oro, Mérida 5101, Venezuela  
Telefax: (58) (274) 266 7601  
bmillanm@ula.ve

Recibido: 23/04/16; aceptado: 23/08/16

En este sentido, en el presente estudio se determinó la diversidad genética de cepas aisladas de pacientes recluidos en el Servicio de Medicina Interna del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA) de Mérida, Venezuela.

## Materiales y métodos

### Cepas bacterianas

Se estudió una colección de 12 cepas extraintestinales de *E. coli* con sensibilidad disminuida a las cefalosporinas de amplio espectro, provenientes de aislamientos de adultos hospitalizados en el Servicio de Medicina Interna del IAHULA con infección asociada a la atención en salud, de marzo a julio de 2013.

La edad promedio de los pacientes incluidos en el estudio fue de 39,25 años (rango de 20 a 82) y la distribución de las cepas aisladas fue igual para ambos sexos. En cuatro casos, se diagnosticó neumonía adquirida en el hospital, en tres, infecciones de heridas no quirúrgicas, en dos, infección de las vías urinarias, y en cada uno de los tres casos restantes, sepsis, absceso e infección de la herida quirúrgica, respectivamente. Los aislamientos habían sido caracterizados parcialmente en un estudio previo (14).

### Prueba de sensibilidad antimicrobiana

La sensibilidad antimicrobiana se determinó con la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante el método de dilución en agar, según lo establecido por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (15). Los antibióticos probados fueron cefotaxima, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, aztreonam, imipenem, ertapenem, meropenem, gentamicina, tobramicina, amikacina, ácido nalidíxico y ciprofloxacino.

Se hizo el estudio fenotípico de todas las cepas para determinar la presencia de BLEE mediante la prueba de sinergia de doble disco, según lo establecido por el CLSI (15).

### Preparación del ADN genómico

El ADN total se extrajo mezclando varias colonias provenientes de cultivos frescos en 200 µl de agua destilada estéril. Estas suspensiones se congelaron a -20 °C durante 30 minutos y luego se sometieron a ebullición durante 15 minutos. Los residuos celulares se separaron por centrifugación (13.000 rpm durante cinco minutos a temperatura ambiente) y el ADN disuelto en el sobrenadante se recuperó en un tubo Eppendorf estéril, el cual se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

### Detección de los grupos filogenéticos

Los aislamientos se clasificaron en los filogrupos A, B1, B2 y D con base en la presencia de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento génico TspE4.C2, mediante amplificación por PCR en las condiciones previamente establecidas (16) y utilizando los iniciadores descritos en el cuadro 1.

Los resultados se interpretaron con base en el esquema de Clermont, *et al.* (4), estableciendo la ausencia (-) o presencia (+) de los elementos ya mencionados, así: grupo A: *chuA*(-) y TspE4.C2 (-); B1: *chuA*(-) y TspE4.C2 (+); B2: *chuA*(+) y *yjaA* (+), y D: *chuA*(+) y *yjaA* (-). En estos ensayos se utilizaron como cepas de control *E. coli* LMM36-ULA (*chuA*+ y *yjaA* +) y *E. coli* LMM32-ULA (TspE4.C2 +).

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

En la detección de los genes codificantes para TEM, SHV y CTX-M en las cepas estudiadas, se utilizaron los iniciadores señalados en el cuadro 1 y las condiciones de amplificación descritas en estudios previos (17-20).

En los ensayos se utilizaron las siguientes cepas de control: *Klebsiella pneumoniae* AMKP135-ULA (TEM-1 y SHV-5), *K. pneumoniae* LMM28-ULA (CTX-M-1), *K. pneumoniae* LMM29-ULA (CTX-M-2), *K. pneumoniae* Kpn206-ULA (CTX-M-8) y *Citrobacter freundii* LMM07/10-ULA (CTX-M-9).

Los amplicones se purificaron utilizando el sistema PCR-Accuprep (Bioneer) y se secuenciaron utilizando los servicios de Macrogen, Inc. (Seúl, Corea) mediante electroforesis capilar en un secuenciador modelo ABI3730XL (Applied Biosystems, CA, USA), con los mismos iniciadores usados en la reacción de PCR. Las secuencias de nucleótidos resultantes se analizaron con el programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y se compararon con las secuencias genéticas incluidas en las bases de datos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### Detección de genes de virulencia

Se estudiaron seis genes de virulencia: la cápsula polisacárida específica del grupo II (*kpsMTII*), la adhesina de la fimbria de tipo 1 (*fimH*), la fimbria P (*papAH*), el marcador de isla de patogenia, la yersiniabactina (sideróforo *fyuA*) y la proteína específica uropatógena (*usp*). Los genes *kpsMTII* y *fimH* y la isla de patogenia se detectaron mediante una PCR múltiple y, el resto de genes estudiados mediante PCR simple, utilizando los iniciadores

**Cuadro 1.** Iniciadores utilizados en este estudio

Gen	Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Referencia
<i>chuA</i>	Fw- <i>chuA</i> Rv- <i>chuA</i>	GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA	(4)
<i>yjaA</i>	Fw- <i>yjaA</i> Rv- <i>yjaA</i>	TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC	(4)
TspE4.C2	Fw-TspE4C2 Rv-TspE4C2	GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG	(4)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC CCG CTG CCG GTY TTA TCV CCB AC	(17)
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	ATG GTT AAA AAA TCA CTG C GGT GAC GAT TTT AGC CGC	(18)
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	TTA ATG ATG ACT CAG AGC ATT C GAT ACC TCG CTC CAT TTA TTG C	(19)
<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>	TGA ATA CTT CAG CCA CAC G TAG AAT TAA TAA CCG TCG GT	(17)
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	AAC ACG GAT TGA CCG TCT TG TTA CAG CCC TTC GGC GAT	(17)
<i>bla</i> <sub>CTX-M-25</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>CTX-M-25</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>CTX-M-25</sub>	CGC CGA TAA CAC GCA GAC CGG CTC CGA CTG GGT GAA GTA	(17)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>SHV</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC TTA GCG TTG CCA GTG CTC	(20)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>TEM</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC A	(20)
<i>kpsMTII</i>	Fw- <i>kpsMTII</i> Rv- <i>kpsMTII</i>	GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG CATC CAG ACG ATA AGC ATG AGC A	(21)
<i>fimH</i>	Fw- <i>fimH</i> Rv- <i>fimH</i>	TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA	(21)
PAI	Fw-PAI Rv-PAI	GGA CAT CCT GTT ACA GCG CGC A TCG CCA CCA ATCA CAG CCG AAC	(21)
<i>papAH</i>	Fw- <i>papAH</i> Rv- <i>papAH</i>	ATG GCA GTG GTG TCT TTT GGT G CGT CCC ACC ATA CGT GCT CTT C	(21)
<i>fyuA</i>	Fw- <i>fyuA</i> Rv- <i>fyuA</i>	TGA TTA ACC CCG CGA CGG GAA CGC AGT AGG CAC GAT GTT GTA	(21)
<i>usp</i>	Fw- <i>usp</i> Rv- <i>usp</i>	ATG CTA CTG TTT CCG GGT AGT GTG T CAT CAT GTA GTC GGG GCG TAA CAA T	(22)
	FwREP-PCR RvREP-PCR	IIIG CGC CGI CAT CAG GC ACG TCT TAT CAG GCC TAC	(23)

señalados en el cuadro 1 y las condiciones de amplificación previamente establecidas (16). Las cepas de control utilizadas en estos ensayos fueron *E. coli* LMM/E02-ULA (*fimH*+, *fyuA*+, *kpsMTII* + y PAI +), *E. coli* LMM/Sc03-ULA (*papAH*+) y *E. coli* LMM/E02-ULA (*usp*+).

### Relación clonal de *E. coli* mediante rep-PCR

La relación clonal de esta colección de cepas se determinó mediante la amplificación de secuencias repetitivas por PCR (rep-PCR) a partir del ADN total, utilizando los iniciadores señalados en el cuadro 1 y las condiciones previamente descritas (23). La mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 25 µl. Los patrones obtenidos en la rep-PCR se analizaron con el programa TREECON 1.3b, el cual generó el dendrograma, o árbol de similitud, para establecer las relaciones entre las cepas estudiadas. Los patrones con coeficientes de similitud superiores a 90 % se consideraron relacionados a nivel clonal.

Todos los ensayos de PCR se hicieron en un termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400®, USA), los productos amplificados se separaron en geles de agarosa (Sigma-Aldrich Co.®, St. Louis, MO, USA) al 1 %, se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/ml; Sigma-Aldrich) y se fotografiaron con un equipo UVP Biodoc-ItSystem®, USA. Como marcadores de peso molecular se utilizaron escaleras de 50 y 100 pb (Bioneer).

### Resultados

Las aislamientos evaluados en este estudio, provenientes de pacientes con infecciones asociadas a la atención en salud, fueron resistentes a las cefalosporinas de amplio espectro en rangos que oscilaron entre 4 y >128 µg/ml. Nueve (75 %) de las 12 cepas demostraron sensibilidad a piperazilina-tazobactam, con una CIM entre 2 y 16 µg/ml, mientras que el 100 % fue sensible a los carbapenémicos (CIM: 0,008-0,125 µg/ml). Estos resultados y los obtenidos al utilizar la prueba

SDS evidenciaron que las cepas estudiadas eran productoras de BLEE. Por otra parte, ocho (66,6 %) de las 12 cepas presentaron resistencia conjunta a las quinolonas y los aminoglucósidos, y en el resto (4/12; 33,3 %) se encontró una disminución de la sensibilidad a un solo grupo de estos antibióticos (cuadro 2).

Las características genéticas de las cepas ExEC se muestran en la figura 1. Cuatro de las cepas pertenecían a los grupos A (33,3%) y B1 (33,3 %), tres al D (25 %) y una al B2 (8,3 %). En relación con la distribución del número y el tipo de betalactamasas, se pudo observar que el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> fue el más frecuente al detectarse en todas las cepas estudiadas; la CTX-M-8 fue la variante más común, seguida por CTX-M-15 y CTX-M-2. La presencia asociada de, por lo menos, dos

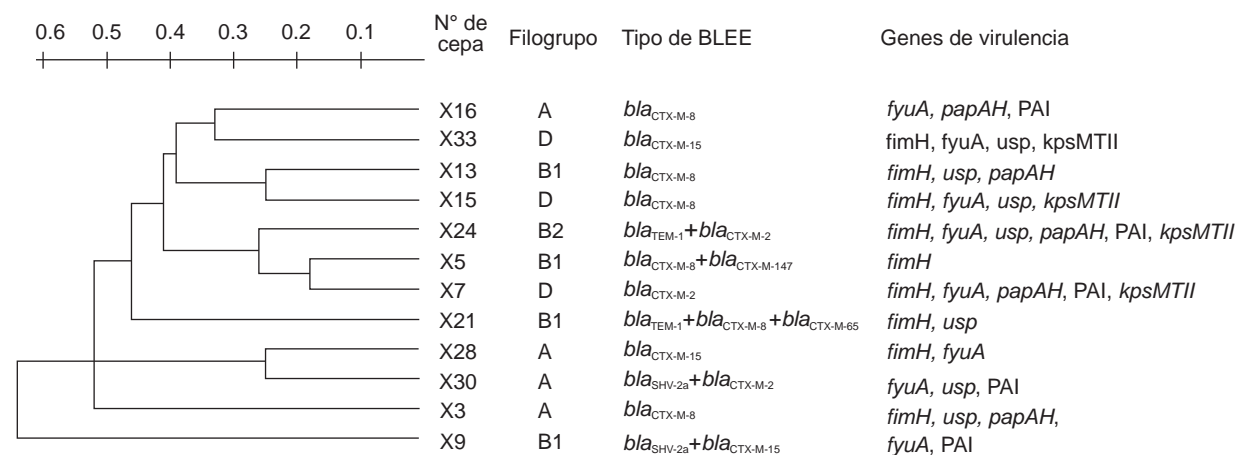
tipos de betalactamasas se demostró en cinco cepas, de las cuales tres pertenecían al filogrupa B1 y, las dos restantes, a los grupos A y B2, respectivamente. Dos de las cepas pertenecientes al filogrupa B1 eran productoras de CTX-M-9 y de CTX-M-8, y una de ellas se asoció, además, a una betalactamasa del tipo TEM-1. Mediante el análisis de la secuencia genética de estas cepas, se determinó la presencia de dos alelos de CTX-M-9: *bla*<sub>CTX-M-65</sub>, con un porcentaje de identidad de 98 % con el patrón de referencia KC121030.1 (GenBank), y *bla*<sub>CTX-M-147</sub>, con un 83 % de identidad con el patrón KF513180.1 (GenBank).

En dos cepas pertenecientes a los filogrupos A y B1, se observó la producción de SHV-2a y de *bla*<sub>CTX-M</sub>; en ambos grupos filogenéticos, esta BLEE se asoció específicamente con la CTX-M-2 y la

**Cuadro 2.** Perfil de sensibilidad antimicrobiana de cepas ExEC productoras de betalactamasas

Número de cepa	CIM (µg/ml)								Resistencia asociada a otros antibióticos
	PIP/TZ	CTX	CAZ	AZT	ERT	IMP	MER	PSDD	
X3	8	8	8	32	0,016	0,125	0,064	+	ACN, CIP, GEN
X5	2	32	32	32	0,016	0,125	0,064	+	ACN, GEN
X7	4	16	16	32	0,016	0,125	0,125	+	ACN
X9	32	32	32	> 64	0,032	0,025	0,032	+	ACN, GEN, TOB
X13	4	16	16	32	0,064	0,125	0,064	+	ACN, CIP, GEN, TOB
X15	16	128	8	64	0,016	0,064	0,032	+	ACN, CIP, GEN, TOB
X16	32	> 128	64	64	0,008	0,064	0,125	+	ACN, CIP, GEN, TOB
X21	4	128	8	32	0,064	0,064	0,064	+	GEN
X24	2	4	8	16	0,008	0,032	0,032	+	ACN, CIP, GEN, TOB
X28	> 32	> 128	64	> 64	0,008	0,032	0,032	+	ACN, CIP, GEN
X30	16	> 128	32	> 64	0,064	0,125	0,064	+	ACN, CIP
X33	8	64	16	> 64	0,064	0,064	0,064	+	ACN, CIP

CIM: concentración inhibitoria mínima; PIP/TZ: piperacilina-tazobactam; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; AZT: aztreonam; ERT: ertapenem; IMP: imipenem; MER: meropenem; ACN: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacina; AMK: amikacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; PSDD: prueba de sinergia de doble disco



**Figura 1.** Dendrograma de los patrones obtenidos mediante rep-PCR que muestran la diversidad clonal y las características genéticas de las cepas ExEC

CTX-M-15, respectivamente. En cuanto a los factores determinantes de virulencia, 11 (91,7 %) de las 12 cepas presentaron, por lo menos, dos de los seis genes estudiados, y el *fimH* (9/12; 75 %) fue el más frecuente. No obstante, el *kpsMTII* solo se detectó en las cepas pertenecientes a los filogrupos B2 y D. Independientemente del filogrupo y del perfil de betalactamasas, los genes de virulencia se distribuyeron en distintos patrones; es de resaltar que en la única cepa del grupo B2 se expresaron los seis genes en estudio. Esta cepa y las que conformaron el filogrupo D, albergaron el mayor número de los factores determinantes de patogenia analizados en este trabajo.

La relación clonal establecida mediante rep-PCR permitió demostrar que más de la mitad de las cepas estudiadas se distribuyeron en tres grupos principales, aproximadamente, con 72 % de similitud (figura 1), aunque se destacó un subgrupo conformado por dos cepas (LMM-X5 y LMM-X7) con una relación cercana al 82 %. Las cepas con relaciones distantes no superaron un índice de similitud de 40 %. La distribución clonal fue diversa e independiente de las características fenotípicas y genéticas de cada cepa.

## Discusión

En este trabajo se demostró que el 100 % de las cepas analizadas provenientes de hospitales eran resistentes a las cefalosporinas de amplio espectro y a los monobactámicos. Este perfil fenotípico era congruente con la detección de varios genes de BLEE, como el *bla*<sub>TEM</sub>, el *bla*<sub>SHV</sub> y el *bla*<sub>CTX-M</sub>, y, además, en el análisis fenotípico todas las cepas demostraron resistencia a otros grupos de antimicrobianos, como los aminoglucósidos y las quinolonas. Guzmán, *et al.* (24), obtuvieron resultados similares a partir de aislamientos de enterobacterias de pacientes con infecciones asociadas a la atención en salud en el Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" de Cumaná en Venezuela, ya que se encontraron los genes *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>SHV-1</sub>, *bla*<sub>SHV-5</sub>, *bla*<sub>SHV-5-2a</sub> y *bla*<sub>CTX-M-1</sub>. Por otra parte, en otros estudios se ha reportado el aislamiento de *E. coli* productoras de BLEE en heces de niños asintomáticos residentes en zonas urbanas de Bolivia, lo cual demuestra la amplia diseminación de ExEC portadora de genes BLEE en la comunidad (25).

El empleo de técnicas moleculares ha permitido la caracterización de las diferentes betalactamasas, así como determinar su distribución y sus variantes alélicas. Se han reportado seis grupos principales en la CTX-M: *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>,

*bla*<sub>CTX-M-25</sub> y *bla*<sub>CTX-M-45</sub>; *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ha sido el de mayor diseminación, con un comportamiento pandémico. En los últimos años, se ha reportado en Argentina, Bolivia, Colombia, Perú y Venezuela (24-29) la presencia de otras variantes: *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub> y *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (variante *bla*<sub>CTX-M-65</sub>), además de la asociación con *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub>, y la resistencia simultánea a otros grupos de antimicrobianos en aislamientos provenientes de hospitales y de la comunidad (8-9,30). Dichos hallazgos coinciden con los de la presente investigación, en la cual se evidenció un predominio de aislamientos productores de *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, a pesar del número reducido de cepas no relacionadas a nivel clonal que se analizaron.

Es importante destacar que en este estudio se detectaron dos variantes alélicas infrecuentes, la *bla*<sub>CTX-M-65</sub> y la *bla*<sub>CTX-M-147</sub>, asociadas a otras BLEE. No hay descripciones de *bla*<sub>CTX-M-147</sub> a nivel clínico o veterinario, y solo se conoce el registro de la secuencia genética en el Genbank (KF513180.1), en tanto que la *bla*<sub>CTX-M-65</sub> se ha reportado en China en aislamientos provenientes de heces de animales sanos de granja y de mascotas, así como en muestras humanas (31-33). La primera descripción de *bla*<sub>CTX-M-65</sub> en Suramérica se hizo en Bolivia en el 2012, a partir de hisopados rectales de niños sanos (25).

En cuanto a los grupos filogenéticos, los grupos A y B1 fueron los más frecuentes seguidos por el grupo D y, en menor proporción, el B2. Estos resultados difieren de los datos reportados en diversos países, donde el filogrupo B2 se ha reportado como el más prevalente en infecciones asociadas a la atención en salud (34-39).

A pesar de que los grupos A y B1 se caracterizan por la presencia de pocos genes de virulencia, dicha condición no constituye un impedimento para la producción de infecciones extraintestinales (5,21,40); de hecho, los factores que median la adhesión bacteriana y los sistemas de captación de hierro (*fimH* y *fyuA*), se han detectado en todos los grupos filogenéticos investigados, lo que evidencia el papel fundamental que desempeñan estos genes en la colonización, la supervivencia, el desarrollo y la instauración de un proceso infeccioso (41-43).

La relación de los genes que median la resistencia a los betalactámicos y la carga conjunta de factores de virulencia no demostraron ser específicas de un filogrupo en particular, lo cual coincide con lo descrito por Yun, *et al.* (44). Por el contrario,

Johnson, *et al.* (21), determinaron la existencia de una relación inversamente proporcional entre el número de factores de virulencia y la presencia de genes de resistencia en cepas de *E. coli* de filogrupos diferentes. Es probable que la coexistencia de factores determinantes de virulencia y de mecanismos de resistencia en cepas de *E. coli* sea el resultado de un proceso de evolución gradual concertada; además, la asociación de estas características depende del nicho ecológico, la presión selectiva del ambiente, las características bacterianas en diferentes regiones geográficas y de la reacción del sistema inmunitario del huésped sensible (2,8,44).

Los resultados permiten concluir que, en las diferentes áreas del Servicio de Medicina Interna del IAHULA, circulan cepas de *E. coli* extraintestinales con una diversidad genética amplia y sin relación clonal estrecha. Esta característica se evidenció por la presencia de todos los filogrupos en los aislamientos de *E. coli* estudiados, en los cuales se expresaban diversos factores de virulencia y factores determinantes de resistencia antimicrobiana.

Es importante destacar, además, que en este trabajo se describen por primera vez variantes alélicas emergentes de BLEE del tipo CTX-M desconocidas en Venezuela, la *bla*<sub>CTX-M-65</sub> y la *bla*<sub>CTX-M-147</sub>.

Estos hallazgos indican que es imperativo mantener las medidas básicas de higiene, asepsia y antisepsia, con el fin de evitar la transmisión horizontal de microorganismos potencialmente patógenos, así como implementar programas de vigilancia epidemiológica que permitan racionalizar el uso de los antimicrobianos de amplio espectro, y reforzar los protocolos para prevenir y controlar las infecciones asociadas a la atención en salud.

### Conflicto de intereses

Las autoras declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Financiación

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela (CDCHTA-ULA), códigos: ADG FA-02-97-07 y FA-554-14-03EM.

### Referencias

1. **Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U.** *E. coli* as an all-rounder: The thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;358:3-32. [http://dx.doi.org/10.1007/82\\_2012\\_303](http://dx.doi.org/10.1007/82_2012_303)
2. **Pitout JD.** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. *Front Microbiol.* 2012;3:1-7. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00009>
3. **Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, Hall RM.** Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: A reservoir for antibiotic-resistance determinants. *J Med Microbiol.* 2010;59:1331-9. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.022475-0>
4. **Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E.** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:4555-8. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>
5. **Moreno E, Prats I, Planells I, Planes A, Pérez T, Andreu A.** Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;28:483-9. <http://dx.doi.org/10.1157/13092463>
6. **Cantón R, González JM, Galán JC.** CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Front Microbiol.* 2012;3:1-19. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>
7. **Bush K, Jacoby GA.** Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:969-76. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
8. **Beceiro A, Tomas M, Bou G.** Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:185-230. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00059-12>
9. **Lee S, Yu JK, Park K, Oh EJ, Kim SY, Park YJ.** Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with *bla* CTX-M. *Ann Clin Lab Sci.* 2010;40:361-7.
10. **Millán Y, Hernández E, Millán B, Araque M.** Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46:175-81. [http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70069-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70069-0)
11. **Nicolás MH, Blanco J, Leflon V, Demarty R, Alonso M, Canica M, et al.** Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:273-81. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm464>
12. **Guillén L, Millán B, Araque M.** Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio.* 2014;18:100-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>
13. **Araque M, Millán B, Mendoza E, Salas M.** CTX-M-32 beta-lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated in Latin America. *J Infect Dev Ctries.* 2013;7:432-35. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.3488>
14. **Abreu S, Varela Y, Millán B, Araque M.** *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de beta-lactamasas de espectro extenso aisladas en pacientes con infección asociada a los cuidados de la salud en un hospital universitario. *Enf Inf Microbiol.* 2014;34:92-9.
15. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test; 26th informational supplement. Wayne: CLSI; 2016.

16. **Millán Y.** Genotipificación y distribución de los grupos filogenéticos y factores de virulencia en *Escherichia coli* uropatógena productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extenso (tesis). Mérida: Universidad de Los Andes; 2013.
17. **Ma L, Chang FY, Fung CP, Chen TL, Lin JC, Lu PL, et al.** Variety of TEM-, SHV-, and CTX-M-type  $\beta$ -lactamases present in recent clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* from Taiwan. *Microb Drug Resist.* 2005;11:31-9. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2005.11.31>
18. **Eckert C, Gautier V, Arlet G.** DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:14-23. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki398>
19. **Di Conza J, Ayala JA, Power P, Mollerach M, Gutkind G.** Novel class 1 integron (InS21) carrying *bla*<sub>CTX-M-2</sub> in *Salmonella enteric* serovar infantis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2257-61. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.7.2257-2261.2002>
20. **Chang FY, Siu LK, Fung CP, Huang MH, Ho M.** Diversity of SHV and TEM  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: Gene evolution in Northern Taiwan and two novel  $\beta$ -Lactamases, SHV-25 and SHV-26. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:2407-13. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.9.2407-2413.2001>
21. **Johnson JR, Stell AL.** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis.* 2000;181:261-72. <http://dx.doi.org/10.1086/315217>
22. **Nakano M, Yamamoto S, Terai A, Ogawa O, Makino S, Hayashi H, et al.** Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;205:71-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10927.x>
23. **Lozano DM, Cisneros JM, Becerril B, Cuberos L, Prados T, Ortiz CL, et al.** Comparison of a repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR method and clinical and microbiological methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4571-5. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.12.4571-4575.2002>
24. **Guzmán M, Rodríguez E, Antón K, Silva S, Navarro J, Lastra E, et al.** Genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> en enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria. *Invest Clin.* 2013;54:235-45.
25. **Bartoloni A, Pallecchi L, Riccobono E, Matella A, Magnelli E, Di Maggio T, et al.** Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded spectrum cephalosporins in *Escherichia coli*: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:356-61. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03807.x>
26. **Guzmán M, Labarca J, Villegas M, Gotuzzo E.** On behalf of the Latin America Working Group on Bacterial Resistance. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *Braz J Infect Dis.* 2014;18:421-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.10.005>
27. **Gaitán S, Espinal P, Grupo de Investigación en Resistencia Bacteriana Región Caribe.** Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. *Rev Chil Infectol.* 2009;26:239-46. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182009000400006>
28. **Hernández E, Araque M, Millán Y, Millán B, Vielma S.** Prevalencia de  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 en grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena aisladas en pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Invest Clin.* 2014;55:32-43.
29. **Torres L, Benítez M, Domínguez M, Torres O, Gagliotta V, Calvo A, et al.** Detección de integrones clase I en cepas de enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro expandido tipo SHV y CTX-M grupo-2. *Vitae.* 2005;1:1-16.
30. **Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, et al.** Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:2720-25. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00026-07>
31. **He L, Partridge SR, Yang X, Hou J, Deng Y, Yao Q, et al.** Complete nucleotide sequence of pHN7A8, an F33:A-B-type epidemic plasmid carrying *bla*<sub>CTX-M-65</sub>, *fosA3* and *rmtB* from China. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:46-50. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks369>
32. **Xia S, Fan X, Huang Z, Xia L, Xiao M, Chen R, et al.** Dominance of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset and hospital-onset infection in China. *PLoS ONE.* 2014;9:1-7. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0100707>
33. **Yin J, Cheng J, Sun Z, Ye Y, Gao YF, Li L, et al.** Characterization of two plasmid-encoded cefotaximases found in clinical *Escherichia coli* isolates: CTX-M-65 and a novel enzyme, CTX-M-87. *J Med Microbiol.* 2009;58:811-5. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.006007-0>
34. **Da Silva G, Mendonça N.** Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence.* 2012;3:18-28. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.3.1.18382>
35. **Cooke N, Smith S, Kelleher M, Rogers T.** Major differences exist in frequencies of virulence factors and multidrug resistance between community and nosocomial *Escherichia coli* bloodstream isolates. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1099-104. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02017-09>
36. **Santos A, Zidko A, Pignatari A, Silva R.** Assessing the diversity of the virulence potential of *Escherichia coli* isolated from bacteremia in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2013;46:968-73. <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20133184>
37. **Alizade H, Ghanbarpour R, Afatoonian MR.** Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from diarrheic and urinary tract infections in relation to phylogeny in southeast of Iran. *Trop Biomed.* 2014;31:174-82.
38. **Bukh AS, Schønheyder HC, Emmersen JM, Søgaard M, Bastholm S, Roslev P.** *Escherichia coli* phylogenetic groups are associated with site of infection and level of antibiotic resistance in community-acquired bacteraemia: A 10 year population-based study in Denmark. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:163-8. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp156>



39. **Bert F, Johnson JR, Ouattara B, Leflon V, Johnston B, Marcon E, et al.** Genetic diversity and virulence profiles of *Escherichia coli* isolates causing spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in patients with cirrhosis. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2709-14. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00516-10>
40. **Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL.** Distribution of phylogenetic groups, sequence type ST131, and virulence associated traits among *Escherichia coli* isolates from men with pyelonephritis or cystitis and healthy controls. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:E173-80. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12123>
41. **Soto SM.** Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:479-80. <http://dx.doi.org/10.1157/13092461>
42. **Lobos O, Padilla A, Padilla C.** Análisis genético y propiedades virulentas de cepas de *Escherichia coli* aisladas desde infección vaginal. *Rev Chil Infectol.* 2013;30:381-7. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000400005>
43. **Spurbeck RR, Dinh PC, Walk ST, Stapleton AE, Hooton TM, Nolan LK, et al.** *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. *Infect Immun.* 2012;80:4115-22. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00752-12>
44. **Yun KW, Kim HY, Park HK, Kim W, Lim IS.** Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *J Microbiol Immunol Infect.* 2014;47:455-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2013.07.010>