

Prevalencia de β -lactamasa CTX-M-15 en grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena aisladas en pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela.

Erick Hernández^{1,2,3}, María Araque¹, Ysheth Millán¹, Beatriz Millán¹ y Silvana Vielma^{2,3}.

¹Laboratorio de Microbiología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioanálisis,

²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes.

³Laboratorio de Salud Pública del estado Mérida, Venezuela.

Palabras clave: *Escherichia coli*, uropatógeno, Beta-lactamasas, CTX-M-15, Venezuela.

Resumen. En este estudio se determinó la prevalencia de β -lactamasas de espectro extenso (BLEEs) en grupos filogenéticos de *E. coli* uropatógena (ECUP) aislados en pacientes de la comunidad. Durante Enero 2009 a Julio 2010, se coleccionaron 21 cepas de ECUP, con susceptibilidad disminuida a las cefalosporinas de amplio espectro, provenientes de pacientes que asistieron al Laboratorio de Salud Pública del estado Mérida, Venezuela con diagnóstico de infección del tracto urinario (ITU). La caracterización genotípica determinó que todas las cepas ECUP albergaban genes bla_{BLEEs} . En el 76,2% de las cepas se observó la presencia de un único gen productor de BLEE, representado por $bla_{CTX-M-15}$, mientras que el 23,8% estuvo conformado por ECUP con diversas combinaciones de genes bla ($bla_{CTX-M-15} + bla_{TEM-1}$, $bla_{CTX-M-15} + bla_{SHV}$ y $bla_{SHV} + bla_{TEM-1}$). El 61,9% de los aislados se ubicó en el filogrupa A y el resto de las cepas en el grupo B2 (38,1%). No se evidenció la diseminación de una clona de ECUP particular, solo 7 cepas demostraron pertenecer a un grupo clonal con un índice de similitud de más de 85%. De acuerdo a nuestro conocimiento, esta es la primera descripción de $bla_{CTX-M-15}$ en ECUP causantes de ITU en pacientes de la comunidad, lo que evidencia que Venezuela también forma parte de la llamada pandemia CTX-M-15. Los hallazgos obtenidos en este estudio y las implicaciones clínicas y epidemiológicas que de ello derivan, conllevan a la necesidad de controlar y vigilar la diseminación de ECUP productora de CTX-M-15 no sólo en el ámbito regional sino también nacional.

Prevalence of β-lactamase CTX-M-15 in phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients in the community of Merida, Venezuela.

Invest Clin 2014; 55(1): 32 - 43

Keywords: *Escherichia coli*, uropathogen, beta-lactamases, CTX-M-15, Venezuela.

Abstract. In this study we determined the prevalence of extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) in phylogenetic groups of uropathogenic *E. coli* (UPEC) isolated from patients in the community. Twenty one UPEC strains with reduced susceptibility to broad-spectrum cephalosporins were collected between January 2009 and July 2010, from patients with urinary tract infection who attended the Public Health Laboratory in Mérida, Venezuela. Genotypic characterization determined that all UPEC strains harbored *bla*_{BLEEs} genes: 76.2% of the strains showed the presence of a single ESBL-producer gene, represented by *bla*_{CTX-M-15}, whereas 23.8% of UPEC showed various combinations of *bla* genes (*bla*_{CTX-M-15} + *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15} + *bla*_{SHV} and *bla*_{SHV} + *bla*_{TEM-1}). In this study, 61.9% of the isolates were placed in phylogroup A and the remaining strains were assigned to group B2 (38.1%). There was no evidence of spread of a particular UPEC clone; only seven strains belonged to a clonal group with an index of similarity greater than 85%. To our knowledge, this is the first description of *bla*_{CTX-M-15} in UPEC from patients with community-acquired urinary tract infections, which shows that Venezuela is also part of the so-called CTX-M-15 pandemic. The findings in this study, as well as its clinical and epidemiological implications, lead to the need for monitoring and controlling the spread of CTX-M-15 producing UPECs, not only regionally, but also nationwide.

Recibido: 24-07-2013. *Aceptado:* 13-02-2014

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli uropatógena (ECUP) es el principal agente involucrado en las infecciones del tracto urinario (ITU) adquiridas en la comunidad (1). Las cepas de *E. coli* son genéticamente diversas y desde el punto de vista filogenético, las pertenecientes a los grupos A y B1 son consideradas de bajo poder virulento, mientras que las cepas de ECUP que derivan principalmente de los filogrupos B2 y D albergan genes que codifican factores extraintestinales de virulencia (2). ECUP del grupo B2 producen el 69% de las cistitis, el 67% de las pielonefritis y el

72% de las sepsis con punto de partida en el tracto urinario (1, 2).

Tradicionalmente, los antibióticos β-lactámicos han sido utilizados para el tratamiento de las infecciones producidas por ECUP. Sin embargo, en los últimos años la efectividad de estos agentes antimicrobianos ha estado amenazada por el incremento de la prevalencia de *E. coli* productora de β-lactamasa de espectro extenso (BLEE) (3, 4). Entre la variedad de BLEEs producida por ECUP, la familia CTX-M es la más frecuente, sustituyendo en la actualidad las clásicas β-lactamasas TEM y SHV (5).

Hasta el momento, se conocen más de 140 variantes de CTX-M, identificadas sobre la base de la diversidad de su secuencia de aminoácidos, las cuales han sido clasificadas en 6 grupos principales: CTX-M-1, -2, -8, -9, -25 y -45 (www.lahey.org/studies/webt.stm) (5, 6). Estas β -lactamasas hidrolizan principalmente a cefotaxima y la mayoría son débilmente activas contra ceftazidima. Sin embargo, algunas variantes del grupo CTX-M-1, tales como: CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-27 y CTX-M-32, presentan una fuerte actividad catalítica sobre ceftazidima, gracias a que en su secuencia se encuentra una sustitución de Asp240→Gly (6).

En 1999 se reportó por primera vez *bla*_{CTX-M-15} en una cepa de *E. coli*, desde entonces, su alta diseminación mundial se ha relacionado con los clones internacionales ST131 y ST405, así como a los grupos filogenéticos virulentos B2 y D (7).

A pesar de que el año 2000 marca la apertura de la pandemia de *E. coli* productora de CTX-M-15 (1, 5), es en el año 2004 cuando en Sur América, específicamente en Bolivia y Perú, se reporta por primera vez CTX-M-15 en cepas de *E. coli* provenientes de heces de niños sanos (8). Posteriormente, en Colombia, Ruiz y col. (9) realizan la primera descripción de cepas de *E. coli* pertenecientes a los filogrupos A, B2 y D, productoras de CTX-M-15 asociada a los clones ST131 y ST405 en pacientes con cistitis y pielonefritis adquiridas en la comunidad. Recientemente, en Venezuela, Redondo y col. (10) registran la presencia de *E. coli* y de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* productores de CTX-M-15 en varios hospitales de Caracas. Asimismo, otras variantes de CTX-M se han identificado en varias regiones del país, tal es el caso de CTX-M-1 y CTX-M-2 en cepas de *Klebsiella pneumoniae* en hospitales de Caracas, Sucre y Mérida (10-12) y de CTX-M-14 y CTX-M-32 en *Citrobacter freundii* y *E. coli*,

respectivamente, en pacientes con ITU en Mérida (13, 14).

De acuerdo a nuestro conocimiento, y luego de una exhaustiva revisión de la bibliografía nacional, hasta el momento no se conocen datos sobre la presencia de ECUP productora de CTX-M-15 en pacientes no hospitalizados en Venezuela. Por tal motivo, en este estudio se determinó por primera vez la prevalencia de BLEE de tipo CTX-M-15 en grupos filogenéticos de ECUP aislados en pacientes de la comunidad de Mérida, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudió una colección de 21 cepas de *E. coli* uropatógena con sensibilidad disminuida a las cefalosporinas de amplio espectro (crecimiento en agar MacConkey suplementado con 4 μ g/mL de cefotaxima), aisladas de muestras de orina provenientes de pacientes que asistieron al Laboratorio de Salud Pública del estado Mérida, Venezuela, con diagnóstico de infección urinaria, durante el período Enero 2009 a Julio 2010. Estas cepas fueron identificadas mediante el sistema de galerías API 20E (bioMérieux) y la condición uropatógena fue confirmada por la detección del gen *fimH* mediante PCR en un estudio anterior (15). En la Tabla I se muestran las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes en quienes se aislaron las cepas analizadas en este estudio. En este estudio se consideró como ITU recurrente, la presentación de 2 episodios de infección urinaria no complicada en los últimos 6 meses o 3 urocultivos positivos reportados en el año anterior.

La susceptibilidad antimicrobiana se analizó determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante el método de dilución en agar, de acuerdo a lo establecido por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013) (16). Los antibióticos probados fueron: ceftazidima

TABLA I
 DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS PACIENTES CON INFECCIÓN URINARIA
 POR *Escherichia coli* UROPATÓGENA

Fecha de aislamiento	Cepa N°	Edad	Sexo	Impresión diagnóstica
14/02/2009	ECUP01	14a	F	ITU recurrente
18/02/2009	ECUP02	67a	F	ITU recurrente-Prolapso genital
18/03/2009	ECUP03	18a	F	ITU-Embarazo
16/04/2009	ECUP04	67a	F	ITU recurrente
20/04/2009	ECUP05	86a	F	ITU
04/05/2009	ECUP06	68a	F	ITU recurrente-Diabetes mellitus
04/05/2009	ECUP07	33a	F	ITU recurrente-Litiasis Renal
03/05/2009	ECUP08	47a	F	ITU
15/06/2009	ECUP09	39a	M	ITU recurrente-Vejiga neurogénica
01/07/2009	ECUP10	24a	F	ITU recurrente
07/07/2009	ECUP11	28a	F	ITU recurrente
13/07/2009	ECUP12	74a	F	ITU recurrente
15/07/2009	ECUP14	60a	M	ITU recurrente-Litiasis renal
13/10/2009	ECUP15	75a	F	ITU recurrente-Prolapso genital
02/12/2009	ECUP16	26a	F	IU recurrente-Prolapso genital
20/01/2010	ECUP17	44a	F	ITU recurrente-Litiasis renal
02/03/2010	ECUP18	8a	F	ITU recurrente-Atrofia renal izquierda
13/04/2010	ECUP19	48a	F	ITU
14/04/2010	ECUP20	70a	F	ITU recurrente-Diabetes mellitus
01/06/2010	ECUP21	75a	F	ITU recurrente-Prolapso genital
21/06/2010	ECUP22	75a	F	IU recurrente-Prolapso vesical

F: femenino; M: masculino; ITU: infección urinaria.

(Merck Sharp), cefotaxima (Genven), ceftazidima (Distriquímica S.A), piperacilina/tazobactam (Wyeth), aztreonam (Bristol Myers Squibb, SL), ertapenem (Merck Sharp and Dohme), meropenem (Richet), gentamicina (Quim-Farm C.A), tobramicina (Eurofarm Limited), amikacina (SM Pharma) y ciprofloxacina (PlusAndex). Todas las cepas fueron evaluadas fenotípicamente para determinar la presencia de BLEE mediante la prueba de sinergismo del doble disco (SDD) de acuerdo a lo descrito por el

CLSI (16). Se utilizó como cepa control para estos ensayos *E. coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* LMM-ULA29 (BLEE+).

La extracción del ADN total se realizó mezclando varias colonias provenientes de cultivos frescos en 200 μ L de agua destilada estéril. Estas suspensiones se congelaron a -20°C durante 30 min y luego se sometieron a ebullición durante 15 min. Los residuos celulares se separaron por centrifugación (13.000 g durante 5 min a temperatu-

ra 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.

La detección de genes codificantes para TEM, SHV, CTX-M en las cepas estudiadas se realizó utilizando los iniciadores señalados en la Tabla II y se utilizaron las condiciones de amplificación previamente descritos por Di Conza y col. (17), Eckert y col. (18) y Ma y col. (19). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de $25\ \mu\text{L}$ y la mezcla estuvo compuesta por $2,5\ \mu\text{L}$ del buffer de reacción (10X), $1,25\ \mu\text{L}$ de MgCl_2 (50 mM), $1,5$ de dNTPs (10 mM; Fudaim, Venezuela), $2,5\ \mu\text{L}$ de cada iniciador ($10\ \text{pmol}/\mu\text{L}$), $0,3\ \mu\text{L}$ de la *Taq* polimerasa ($5\ \text{U}/\mu\text{L}$; Fundaim, Venezuela), $12,45\ \mu\text{L}$ de agua bidestilada ultra-pura y $2\ \mu\text{L}$ del ADN extraído. Las PCRs se realizaron en un termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400). Los productos obtenidos fueron separados en geles de agarosa al 1%, teñidos con $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio (Sigma) y

fotografiados con el UVP Biodoc-It System. Como marcador de peso molecular se utilizó una escalera de 100 pb (Bioneer). Los amplicones obtenidos fueron purificados utilizando el sistema AccuPrep PCR Purification (Bioneer) y secuenciados por Macro-gen Inc. (Seúl, Corea) mediante electroforesis capilar en un secuenciador modelo ABI 3730XL (Applied Biosystems, CA, USA), 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 las base de datos <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Las cepas de ECUP fueron clasificadas dentro de los grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) de acuerdo a la presencia de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento génico TspE4.C2, mediante una PCR múltiple utilizando los iniciadores y condiciones descritos por Clermont y col. (20). La mezcla de

TABLA II
INICIADORES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

Iniciador	Secuencia (5`-3`)	Referencia
FwblaCTX-M	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC	17
FrblaCTX-M	CCG CTG CCG GTY TTA TCV CCB AC	
FwblaCTX-M-1	ATG GTT AAA AAA TCA CTG C	17
FrblaCTX-M-1	GGT GAC GAT TTT AGC CGC	
FwblaCTX-M-2	TTA ATG ATG ACT CAG AGC ATT C	18
FrblaCTX-M-2	GAT ACC TCG CTC CAT TTA TTG C	
FwblaCTX-M-8	TGA ATA CTT CAG CCA CAC G	19
FrblaCTX-M-8	TAG AAT TAA TAA CCG TCG GT	
FwblaCTX-M-9	AAC ACG GAT TGA CCG TCT TG	19
FrblaCTX-M-9	TTA CAG CCC TTC GGC GAT	
FwblaCTX-M-25	CGC CGA TAA CAC GCA GAC	19
FrblaCTX-M-25	CGG CTC CGA CTG GGT GAA GTA	
FwblaSHV	GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC	19
FrblaSHV	TTA GCG TTG CCA GTG CTC	
FwblaTEM	ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA	19
FrblaTEM	GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC A	

amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ L y estuvo compuesta por: 2,5 μ L del buffer de reacción (10X), 1,5 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 1,5 μ L de dNTPs (10 mM; Bioneer), 2,5 μ L de cada iniciador (10 pmol/ μ L), 0,3 μ L de la *Taq* polimerasa (5 U/ μ L; Fundaim), 2,2 μ L de agua bidestilada ultrapura y 2 μ L del ADN extraído. Los resultados fueron interpretados con base en el esquema de Clermont y col. (20) mediante la ausencia (-) o presencia (+) de los elementos antes descritos: grupo A: *chuA* - y *TspE4.C2* -; B1: *chuA* - y *TspE4.C2* +; B2: *chuA* + y *yjaA* + y el filogruppo D: *chuA* + y *yjaA* -. Para estos ensayos se utilizaron como cepas control *E. coli* LMM36-ULA (*chuA* + y *yjaA* +) y *E. coli* LMM32-ULA (*TspE4.C2* +).

La relación clonal entre las cepas de ECUP fue determinada por la amplificación de secuencias repetitivas por PCR (Rep-PCR) a partir del ADN total utilizando los iniciadores y condiciones descritos por Lozano y col. (21). La mezcla de reacción para la Rep-PCR se realizó en un volumen final de 25 μ L y estuvo constituida por 2,5 μ L de buffer (10X), 2,5 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 3 μ L de dNTPs (10 mM), 3 μ L de cada uno de los iniciadores (10 pmol/ μ L), 0,5 μ L de *Taq* polimerasa (5U/ μ L; Fundaim), 5,50 μ L de agua bidestilada estéril y 5 μ L de ADN. Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio y fotografiados con el UVP Biodoc-It System. Como marcador de peso molecular se utilizó una escalera de 50 pb (Bioneer). Los patrones obtenidos Rep-PCR fueron analizados utilizando el Software Treecon 1.3b, el cual generó el dendograma o árbol de similitud para establecer las relaciones entre las cepas estudiadas. Los patrones con coeficientes de similitud superior al 85% fueron considerados relacionados clonalmente.

RESULTADOS

Veintiún cepas de ECUP, con susceptibilidad disminuida a los antibióticos β -lactámicos de amplio espectro, fueron aisladas de muestras de orina en pacientes cuya edad promedio fue de 49,8 años (rango de 8 a 86 años), el 90,5% correspondió al género femenino y el 9,5% al masculino. El 80,95% tenía como diagnóstico una infección urinaria (ITU) recurrente y el 57,14% presentó otra patología asociada (Tabla I).

Estas cepas mostraron perfiles de susceptibilidad compatibles con la producción de BLEE (Tabla III). Todos los aislados fueron resistentes a cefotaxima (CIM >8 μ g/mL), aztreonam (CIM 16-32 μ g/mL) y solo dos cepas presentaron sensibilidad a ceftazidima (CIM 2 μ g/mL). Once cepas (11/21; 52,38%) fueron susceptibles a piperacilina/tazobactam. Sin embargo, el 100% de las cepas fueron inhibidas por meropenem, ertapenem y colistina con rangos entre 0,03-0,25 μ g/mL, 0,06-0,25 μ g/mL y 1-2 μ g/mL, respectivamente. La prueba SDD fue coincidente con los resultados obtenidos en la CIM.

Además de la resistencia a los β -lactámicos, se pudo observar que las cepas de ECUP presentaron resistencia asociada a otros antibióticos, los cuales en orden de frecuencia fueron: tobramicina, ciprofloxacina y gentamicina (100%, 95,23% y 61,90%, respectivamente). De acuerdo a la distribución de estos marcadores de resistencia, las cepas fueron agrupadas en 5 patrones de resistencia (Tabla IV). El patrón IV fue el más frecuente (11/21; 52,38%), conformado por cepas positivas a BLEE y con resistencia asociada a la ciprofloxacina, tobramicina y gentamicina.

Los ensayos de amplificación por PCR permitieron detectar en la mayoría de las cepas (20/21) la presencia de la β -lactamasa CTX-M-1. El análisis de la secuencia del producto amplificado reveló la variante

TABLA III
CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y PORCENTAJE DE RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DE LAS CEPAS DE *Escherichia coli* UROPATÓGENA

Antibiótico	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			N° de cepas			% Resistencia (N=21)
	Rango	CIM ₅₀	CIM ₉₀	S	I	R	
FOX	4-64	8	32	0	0	21	100
CTX	8 - ≥ 128	16	64	0	0	21	100
CAZ	2-64	32	32	2	0	19	90,47
AZT	16 - >32	32	32	0	0	21	100
TZP	16 - >128	16	64	11	0	10	47,62
ERT	0,03-0,25	0,12	0,25	21	0	0	0
MER	0,03-0,125	0,06	0,06	21	0	0	0
CIP	0,25 - >8	2	4	1	0	20	95,23
CLT*	1-2	1	1	21	0	0	0
AMK	2 - ≥ 64	16	16	17	3	1	4,76
GTM	2 - ≥ 16	4	16	8	0	13	61,90
TOB	≥ 16	16	16	0	0	21	100

FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; AZT: aztreonam; TZP: piperacilina/tazobactam; ERT: ertapenem; MER: meropenem; CIP: ciprofloxacina; CLT: colistina; AMK: amikacina; GTM: gentamicina; TOB: tobramicina. S: sensible; I: intermedia; R: resistente. *CIM: interpretación de acuerdo con European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Version 3.0, (2013).

TABLA IV
DISTRIBUCIÓN DE LOS PATRONES DE RESISTENCIA ASOCIADOS CON LA PRESENCIA DE BLEES EN CEPAS DE *Escherichia coli* UROPATÓGENA

Patrón de Resistencia	Marcadores de resistencia	N°: 21 (n°/%)
I	BLEE +, TOB	1/4,76
II	BLEE +, CIP, TOB	5/23,81
III	BLEE +, CIP, TOB, AMK ^I	2/9,52
IV	BLEE +, CIP, TOB, GTM	11/52,38
V	BLEE +, CIP, TOB, AMK, GTM	2/9,52

*bla*_{CTX-M-15}, con un grado de identidad del 99% correspondiente a la secuencia de referencia Genbank No. AY044436. Sólo una cepa (ECUP22) fue portadora de BLEE tipo SHV.

En relación a las diferentes combinaciones de BLEE, 5 cepas mostraron la asociación de por lo menos 2 tipos de β -lactamasas: *bla*_{CTX-M-15} + *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15} +

*bla*_{SHV} (2/21; 9,52%, respectivamente) y *bla*_{SHV} + *bla*_{TEM-1} (1/21; 4,76%), mientras que en el resto de las cepas de ECUP el patrón genotípico de BLEE estuvo representado por un único gen *bla*_{CTX-M-15} (16/21; 76,19%). La relación de esta característica y la distribución según los principales grupos filogenéticos se muestran en la Tabla V. El 61,9% (13/21) de los aislados se ubicó

principalmente en el filogruppo A, siendo este el grupo más frecuente. El resto de las cepas estudiadas fueron asignadas al grupo B2 (8/21; 38,1%). No hubo una distribución particular de las ECUP productoras de BLEEs en los grupos A y B2. Sin embargo, las dos únicas cepas que presentaron la asociación *bla*_{CTX-M-15} + *bla*_{SHV}, fueron ubicadas en el filogruppo B2. En esta colección de

ECUP no se encontraron cepas pertenecientes a los grupos B1 y D.

La tipificación por Rep-PCR permitió evidenciar que las 21 cepas de ECUP se distribuyeron en 4 principales grupos: **I, II, III** y **IV** (Fig. 1). Destaca en el grupo **I** la presencia de 4 subgrupos estrechamente relacionados: el **Ia** conformado por 4 cepas de una misma clona: ECUP21, ECUP22,

TABLA V
DISTRIBUCIÓN DE LOS GENES *bla*_{BLEEs} DE ACUERDO A LOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DE LAS CEPAS DE *Escherichia coli* UROPATÓGENA

Genes <i>bla</i> _{BLEEs}	Grupo filogenético de ECUP (N/%)				Total (N/%)
	A	B1	B2	D	
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	11/52,38	0	5/23,80	0	16/76,19
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{SHV}	0	0	2/9,52	0	2/9,52
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1}	1/4,76	0	1/4,76	0	2/9,52
<i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{TEM-1}	1/4,76	0	0	0	1/4,76
Total (N/%)	13/61,9	0	8/38,1	0	21/100

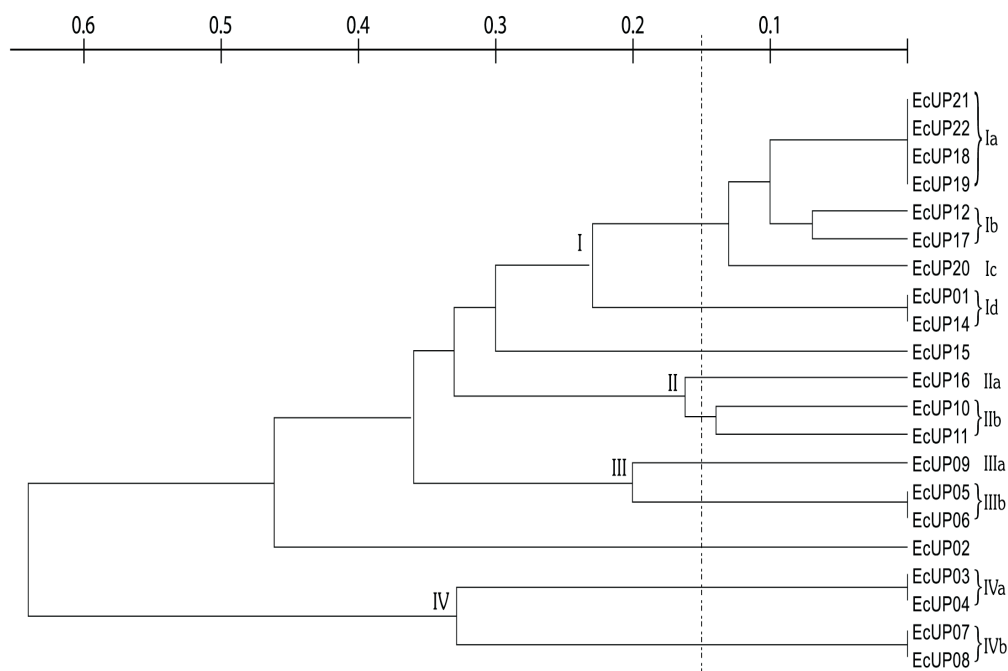


Fig. 1. Dendrograma que muestra la relación clonal de las 21 cepas de *Escherichia coli* uropatógena incluidas en el estudio. Cada grado en la escala representa un 10% de diferencia en el índice de similitud. Hacia la derecha de la línea punteada se encuentra un índice de similitud por encima del 85%.

ECUP18 y ECUP19 con un 100% de similitud. El **Ib**, representado por ECUP12 y ECUP17, con un índice de similitud de aproximadamente 94%, mientras que el **Ic**, representado por la cepa ECUP20, tuvo una similitud de aproximadamente 88% con respecto al resto de las cepas del mismo grupo. El grupo **Id**, con una relación de similitud menor al 80%, fue conformado por 2 cepas (ECUP01 y ECUP14). En el resto de los grupos (**II**, **III** y **IV**), la distribución de las cepas fue variada, sin superar en la mayoría de los casos un orden de similitud del 85%. La distribución clonal fue independiente de las características fenotípicas y genotípicas de cada cepa (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

El estudio de la susceptibilidad a los antibióticos β -lactámicos en las cepas de ECUP reveló un perfil fenotípico compatible con la producción de BLEE. Las cepas productoras de BLEE son un grave problema terapéutico porque además de ser resistentes a la gran mayoría de β -lactámicos, presentan altas tasas de resistencia a otros grupos de antibióticos (22). Los resultados de este trabajo avalan esta afirmación. Las cepas de ECUP, además de ser productoras de BLEE, presentaron resistencia asociada a otros antibióticos como tobramicina (100%), ciprofloxacina (93%) y gentamicina (86,67%), y en menor frecuencia amikacina (19%). Es posible que la distribución de las cepas estudiadas en 5 patrones de susceptibilidad diferentes, se deba a la presencia de determinantes de resistencia adicionales que median la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, bombas de expulsión y alteraciones de la permeabilidad de la pared celular, entre otros mecanismos (5).

Tradicionalmente, la presencia de BLEE se ha relacionado con cepas bacterianas causantes de infecciones hospitalarias.

Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el aislamiento de cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15, en infecciones de inicio comunitario, especialmente las relacionadas con el tracto urinario (23). En este estudio se confirmó la presencia de genes $bla_{CTX-M-15}$ en casi todas las cepas ECUP, excepto en un aislado en el cual se detectó el gen bla_{SHV} . En la mayoría de las cepas se observó la presencia de un único gen productor de BLEE, representado por $bla_{CTX-M-15}$, y un pequeño porcentaje estuvo conformado por ECUP con diversas combinaciones de genes bla ($bla_{CTX-M-15} + bla_{TEM-1}$, $bla_{CTX-M-15} + bla_{SHV}$ y $bla_{SHV} + bla_{TEM-1}$). Estas asociaciones de BLEE han sido descritas ampliamente en la literatura y obedecen principalmente a la naturaleza transponible y de recombinación de los genes bla (5, 22, 24). De hecho, Brises y col. (2) y Millán y col. (12), afirman que independientemente de la diversidad genética de las cepas *E. coli*, CTX-M se encuentra extensamente distribuida en todos los grupos filogenéticos de este género bacteriano, gracias a una plataforma genética eficiente que le permite a esta enzima diseminarse y movilizarse entre especies y géneros bacterianos diferentes.

Por otra parte, numerosos estudios han señalado que las cepas virulentas o patógenas causantes de las ITU pertenecen a los grupos filogenéticos B2 y D, mientras que las cepas comensales se ubican en el grupo A y B1 (1, 2). Recientemente, Araque y col. (14) describieron por primera vez en América Latina una cepa de ECUP productora de CTX-M-32 perteneciente al grupo B2. Sin embargo, en este estudio la prevalencia de ECUP productoras de CTX-M-15 se observó principalmente en los filogrupos A y B2 y en ningún caso se aislaron cepas de los grupos B1 y D. Estos resultados constituyen hallazgos interesantes, hasta ahora no reportados en Venezuela, que pueden ser atribuidos a una estructura clonal ca-

racterística de las cepas de ECUP, dadas por complejas relaciones entre las propiedades de virulencia, bases filogenéticas y mecanismos de resistencia antimicrobiana (25, 26).

Es importante resaltar que la tipificación de las cepas por Rep-PCR permitió diferenciar a las cepas de ECUP en 4 grupos principales, donde solamente en los subgrupos Ia al Ic se observaron cepas con una relación clonal que superó el 85%, independientemente de sus características fenotípicas y genéticas. En este contexto, y considerando la particular distribución de las cepas estudiadas en dos de los principales grupos filogenéticos (A y B2), es posible que el origen geográfico de las cepas y los mecanismos de transmisión, representen elementos adicionales de importancia epidemiológica, debido a que estos pueden estar reflejando un patrón local de uso de los antibióticos en la práctica clínica, en la medicina veterinaria, así como en productos de origen animal para el consumo humano. Desde el punto de vista técnico, es probable que utilizando otras herramientas moleculares con mayor poder discriminatorio, tales como la electroforesis de campo pulsante y aumentado el número de cepas a estudiar, se pudiera dilucidar mejor la estructura y distribución clonal de las cepas de ECUP que circulan en la comunidad de Mérida, Venezuela. Por consiguiente, estos aspectos serán considerados en estudios futuros.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio permiten señalar que la BLEE tipo CTX-M-15 es la enzima prevalente en cepas de ECUP pertenecientes a los filogrupos A y B2, productoras de ITU en pacientes provenientes de la comunidad, lo que evidencia que Venezuela también forma parte de la llamada "pandemia CTX-M-15" (1, 5, 27). En este contexto, podríamos asumir que cepas de ECUP productoras de CTX-M-15 asociada o no a otras BLEEs, así

como a determinantes de resistencia diferentes a los β -lactámicos, pueden estar presentes en la comunidad, de manera que la población sana estaría actuando como reservorio de esta BLEE, como producto del uso y abuso de los antibióticos. Por tanto, es necesario implementar programas de vigilancia epidemiológica que permitan racionalizar el uso de los antimicrobianos de amplio espectro con base en la epidemiología local y en el mecanismo de resistencia presente, así como aplicar técnicas de caracterización molecular para la identificación de genes de resistencia y la tipificación de microorganismos para reducir el surgimiento y diseminación de clonas resistentes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA), código: ADG FA-02-97-07 y por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT), Venezuela (Proyecto N° 2012002321. Contrato N° 201201213).

REFERENCIAS

1. Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, Bens M, Goujon JM, Garry L, Clermont O, Denamur E, Arlet G, Vandewalle A. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone 025b:H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. PLoS ONE 2012; 7(9) DOI: 10.1371/journal.pone.0046547.
2. Brisse S, Diancourt L, Laouénan C, Vigan M, Caro V, Arlet G, Drieux L, Leflon-Guibout V, Mentré F, Jarlier V, Nicolas-Chanoine MH, the Coli β Study Group. Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: Group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes. J Clin Microbiol 2012; 50(9):2974-2981.

3. **Pitout JDD.** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Front Microbiol* 2012; 3 DOI:10.3389/fmicb.2012.00009.
4. **Jadhav S, Hussain A, Devi S, Kumar A, Parveen S, Gandham N, Wieler LH, Ewers C, Ahmed N.** Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. *PLoS ONE* 2011; 6(3) DOI: 10.1371/journal.pone.0018063.
5. **Cantón R, González-Alba JM, Galán JC.** CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol* 2012; 3 DOI: 10.3389/fmicb.2012.00110.
6. **Novais A, Comas I, Baquero F, Cantón R, Coque TM, Moya A, González-Candelas F, Galán JC.** Evolutionary trajectories of beta-lactamase CTX-M-1 cluster enzymes: predicting antibiotic resistance. *PLoS Pathog* 2010; 6(1) DOI: 10.1371/journal.ppat.1000735
7. **Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL.** *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(1): 1-14.
8. **Pallecchi L, Malossi M, Mantella A, Gotuzzo E, Trigoso C, Bartoloni A, Paradisi F, Kronvall G, Rossolini GM.** Detection of CTX-M-type β -lactamase genes in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy Children in Bolivia and Perú. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(12):4556-4561.
9. **Ruiz SJ, Montealegre MC, Ruiz-Garbajosa P, Correa A, Briceño DF, Martínez E, Rosso F, Muñoz M, Quinn JP, Cantón R, Villegas MV.** First characterization of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clones causing community-onset infections in South America. *J Clin Microb* 2011; 49(5):1993-1996.
10. **Redondo C, Chalboud A, Alonso G.** Frequency and diversity of CTX-M enzymes among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates from Caracas, Venezuela. *Microb Drug Resist* 2013; 19(1):42-47.
11. **Guzman M, Alonso G.** Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*. Sucre-Venezuela. *Invest Clin* 2009; 50(4):419-431.
12. **Millán B, Castro D, Ghiglione B, Gutkind G, Araque M.** ISCR1 asociado a genes $bla_{CTX-M-1}$ y $bla_{CTX-M-2}$ en plásmidos IncN e IncFIIA aislados en *Klebsiella pneumoniae* de origen nosocomial en Mérida, Venezuela. *Biomédica* 2013; 33(2): 268-275.
13. **Millán B, Ghiglione B, Díaz T, Gutkind G, Araque M.** CTX-M-14 β -lactamase-producing *Citrobacter freundii* isolated in Venezuela. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2011; 10:22 DOI:10.1186/1476-0711-10-22.
14. **Araque M, Millán B, Mendoza E, Salas M.** CTX-M-32 β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated in Latin America. *J Infect Dev Ctries* 2013; 7(5): 432-435
15. **Millán Y.** Genotipificación y distribución de los grupos filogenéticos y factores de virulencia en *Escherichia coli* uropatógena productoras de β -lactamasas de espectro extenso. [Tesis de Maestría en Microbiología Clínica]. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida. Venezuela. 2013. p. 82.
16. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Document M100-S232. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Table 2A. Zone diameter and minimal inhibitory concentration (MIC) interpretative standards for *Enterobacteriaceae* M02 and M07. Vol. 33, N° 1, 23th informational supplement. Wayne, PA: CLSI. 2013. p. 44-57.
17. **Di Conza, Ayala JA, Power P, Mollerach M, Gutkind G.** Novel class 1 integron (InS21) carrying $bla_{CTX-M-2}$ in *Salmonella enterica* serovar infantis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:2257-2261.
18. **Eckert C, Gautier V, Arlet G.** DNA sequence analysis of the genetic environment of various bla_{CTX-M} genes. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:14-23.
19. **Ma L, Chang FY, Fung CP, Chen TL, Lin JC, Lu PL, Huang LY, Chang JC, Siu LK.** Variety of TEM, SHV, and CTX-M type

- beta-lactamases presente in recent clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* from Taiwan. *Microb Drug Resist* 2005; 11:31-39.
20. **Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E.** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:4555-4558
 21. **Lozano D, Cisneros J, Becerril B, Cuberos L, Prados T, Ortíz C, Cañas E, Pachón J, Mahillon J, Chandler M.** 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* 2002; 40(12):4571-4575.
 22. **Peirano G, Pitout JDD.** Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35:316-321.
 23. **Leal AL, Cortés JA, Arias G, Ovalle MV, Saavedra SY, Buitrago G, Escobar JA, Castro BE, GREBO.** Emergencia de fenotipos resistentes a cefalosporinas de tercera generación en *Enterobacteriaceae* causantes de infección del tracto urinario de inicio comunitario en hospitales de Colombia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31(5):298-303.
 24. **Araque M, Rivera I.** Simultaneous presence of *bla*_{TEM} and *bla*_{SIV} genes on a large conjugative plasmid carried by extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Am J Med Sci* 2004; 327(3):118-122.
 25. **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(4):361-367.
 26. **Molina-López J, Aparicio-Ozores G, Ribas-Aparicio RM, Gavilanes-Parra S, Chávez-Berrocal ME, Hernández-Castro R, Manjarrez-Hernández HA.** Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5(12):840-849.
 27. **Park SH, Byun JH, Choi SM, Lee DG, Kim SH; Kwon JC, Park C.** Molecular epidemiology of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* in the community and hospital in Korea: emergence of ST131 producing CTX-M-15. *BMC Inf Dis* 2012; 12:149 DOI: 10.1186/1471-2334-12-149.