

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Determinación de variantes genéticas de enzimas betalactamasas
procedentes de cepas bacterianas aisladas de Centros
Hospitalarios en Quito**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en
Ciencias Biológicas**

ANDREA LUCÍA LEÓN CADENA

QUITO, 2014

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Andrea Lucía León Cadena ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Iliana Alcocer Negrete

Directora de la Disertación

Quito, 24 de marzo de 2014

A mis padres Mariana y Jesús

A mis hermanos Carolina, Santiago y Alexandra

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y hermanos por enseñarme a jugar, reír, llorar, amar, compartir, dar, recibir y a levantarme una y otra vez ante las vicisitudes; gracias por su paciencia, sacrificio, comprensión, cariño, honestidad y apoyo en todos estos años de vida.

A mis abuelos y tíos por el afecto desinteresado y las enseñanzas valiosas que he recibido de ellos desde la infancia.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, que a través de los Fondos PUCE, concedió el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la doctora Iliana Alcocer por haber confiado en mí y por permitirme trabajar en su laboratorio, gracias por su afecto maternal, sus buenos consejos y por infundirme el sentido del orden en el trabajo.

Agradezco a Mercedes Rodríguez-Riglos y el doctor Hugo Navarrete por su carisma, su buena voluntad y todo el apoyo que siempre hemos recibido de ellos.

A la doctora Jeannete Zurita porque gracias a su proyecto pude realizar este trabajo de investigación, por su colaboración y valiosos comentarios.

A mis amigos del laboratorio Fer, Cami, Naty, Karen, David, Pedro, Sofi, Irina y Estefy con los que he compartido el día a día, les agradezco por los todos

los buenos momentos, las risas, la complicidad y el trabajo en equipo que me han ayudado aprender y a desarrollar.

A mi amiga Fernanda Yauri le agradezco por su amistad incondicional, por su gran humanidad y por todo el apoyo que he recibido de ella todo este tiempo.

A mis amigos de aula con los que compartí todos estos años de Carrera y con los que aprendí, a través de todas las salidas de campo, la solidaridad, el compañerismo y la libertad de redescubrir a través de la naturaleza el maravilloso país en el que vivimos.

A todos mis maestros, de los que he recibido valiosas enseñanzas académicas y de vida, espero no desmerecer todo su esfuerzo.

Finalmente quiero agradecer a la vida por todo aquello que he recibido, la felicidad, salud, amor, y esa familia tan generosa que siempre ha sido mi soporte, mi referencia y reflejo en cualquier circunstancia.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT.....	1
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
	3.1 OBJETIVOS	11
	3.1.1 OBJETIVO GENERAL.....	11
	3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4.	METODOLOGÍA.....	13
	4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	13
	4.2 EXTRACCIÓN DEL ADN.....	13
	4.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	14
	4.3.1 CONDICIONES DE REACCIÓN.....	14
4.4	VIZUALIZACIÓN, PURIFICACIÓN Y SECUENCIAMIENTO DE LOS PRODUCTOS DE PCR Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	15
	4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	17
5.	RESULTADOS.....	18
	5.1 AISLADOS HOSPITALARIOS.....	18
	5.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GRUPOS GENÉTICOS CTX- M.....	19
	5.3 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GENES TIPO <i>bla</i> _{CTXM}	20
	5.4 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS.....	22
6.	DISCUSIÓN.....	23
7.	CONCLUSIONES.....	31
8.	LITERATURA CITADA.....	33
9.	FIGURAS.....	44
10.	ANEXOS.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
+	Control Positivo
-	Control Negativo
° C	Grados Centígrados
ADN	Ácido desoxido ribonucleico
BHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón
BLEE	Betalactamasas de Espectro Extendido
HA	Hospital A
HB	Hospital B
CTX-M	Enzimas Betalactamasas tipo CTX-M
CTX-M G1	Enzimas Betalactamasas tipo CTX-M, grupo 1
CTX-M G2	Enzimas Betalactamasas tipo CTX-M, grupo 2
CTX-M G9	Enzimas Betalactamasas tipo CTX-M, grupo 9
Col.	Colección
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F	Cebador "Forward"
F	Femenino
L	Marcador de peso molecular
M	Masculino
Min	Minutos

LISTA DE ABREVIATURAS (CONTINUACIÓN)

Abreviatura	Significado
mL	Mililitro
NCBI	National Centre for Biotechnology In Information
ND	No identificado
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
R	Cebador "Reverse"
REDNARBEC	Red Nacional de Vigilancia de Resistencia Bacteriana en el Ecuador
s	Segundos
SENTRY	"Antimicrobial Surveillance Program"
SHV	Sulfhidrilo variable
SMART	"Antimicrobial Resistance Trends"
TBE	Tris- Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEM	Temoniera
Temp.	Temperatura
TEST	Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial
Tpo.	Tiempo
Tris-HCl	Hidroximetil aminometano y ácido clorhídrico
TSB	Caldo Trypticase de Soya
μl	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Frecuencia de aislados por procedencia; HA (Hospitalarios, Comunitarios) y por especie (*E. coli*, *K. pneumoniae* y otras bacterias).....44
- Figura 2. Frecuencia de bacterias entéricas halladas en los 110 aislados en análisis.....45
- Figura 3. Gráfico representativo sobre frecuencia de aislados por procedencia y bacteria entérica portadora46
- Figura 4. Gel representativo de los grupos genéticos tipo CTX-M G1, CTX-M G2, CTX-M G9 presentes en la población47
- Figura 5. Frecuencia de los grupos tipo CTX-M G1, CTX-M G2, CTX-M G9 en la población.48
- Figura 6. Frecuencias de aislados entéricos por cada grupo de enzimas betalactamasas tipo CTX-M49
- Figura 7. Gel representativo que muestra presencia – ausencia del grupo CTX-M G1 en aislados clínicos.50

Figura 8.	Gel representativo que muestra la presencia – ausencia del grupo CTX-M G2 en aislados clínicos	51
Figura 9.	Gel representativo que muestra presencia – ausencia del grupo CTX-M G9 en aislados clínicos.	52
Figura 10.	Frecuencia de las enzimas betalactamasas tipo CTX-M.....	53
Figura 11.	Frecuencia de variantes génicas de enzimas betalactamasas tipo CTX-M en aislados clínicos.....	54
Figura 12.	Comparación en la frecuencia de enzimas betalactamasas CTX-M agrupadas por especie, hospital; (HA, HB), procedencia; hospitalarias, comunitarias y variante genética.....	55
Figura 13.	Comparación de las secuencias aminoacídicas de las variantes tipo <i>bla</i> _{CTX-M-28} y <i>bla</i> _{CTX-M-12}	57
Figura 14.	Comparación de las secuencias aminoacídicas de las variantes tipo <i>bla</i> _{CTX-M} halladas en este estudio.....	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Cebadores empleados para la amplificación de genes <i>bla</i> _{CTX-M}	59
Tabla 2.	Programa de PCR para amplificación de los grupos CTX-M G2, CTX-M G9 y CTX-M G1.....	60
Tabla 3.	Origen de los aislados Hospitalarios utilizados en este estudio.....	61
Tabla 4.	Información genética sobre las 131 cepas analizadas, grupo de betalactamasas tipo CTX-M a las que pertenecen y variante alélica.....	65
Tabla 5.	Frecuencia de enzimas tipo <i>bla</i> _{CTX-M} agrupadas por especie, hospital; (HA, HB), procedencia; hospitalarias (H), comunitarias (C) y variante genética.....	69

1. RESUMEN

El aumento de la prevalencia de las enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) tipo CTX-M, en bacterias entéricas de origen hospitalario y comunitario, ha tenido una gran repercusión a nivel mundial y en particular en América Latina durante los últimos diez años. Con el fin de proporcionar información relevante al problema creciente de la resistencia bacteriana, el objetivo del presente estudio fue determinar las variantes genéticas en aislados bacterianos que codifican para enzimas betalactamasas procedentes de aislados clínicos de centros hospitalarios en Quito. Se analizaron 110 aislados clínicos en los cuales se establecieron las variantes genéticas tipo *bla*_{CTX-M}. El análisis fue realizado a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y mediante cebadores específicos, se amplificaron las variantes tipo *bla*_{CTX-M} que portaban cada uno de los aislados. Los genes fueron visualizados en geles de agarosa y luego del secuenciamiento, en Macrogen - Korea, se encontraron las siguientes variantes alélicas: CTX-M-28 (66,4 %), CTX-M-2 (13,6 %), CTX-M-12 (8,0 %) y CTX-M-14 (6,4 %) donde *Escherichia coli* fue la Enterobacteria más prevalente (50,9 %) y cuyos aislados provenían en su mayoría de muestras de orina. A pesar de que en América Latina se han realizado varios estudios sobre estas enzimas, estos datos representan los primeros reportes en Ecuador para dichos alelos. De esta forma se ha contribuido con información que puede ser usada en estudios de epidemiología molecular tanto a nivel local como regional.

Palabras clave: BLEE, bacterias Gram negativas; *Escherichia coli*; genes tipo *bla*_{CTX-M}; resistencia antimicrobiana; variantes genéticas

2. ABSTRACT

Increased prevalence of extended spectrum beta-lactamase enzymes (ESBL) CTX-M type, in enteric bacteria source community hospital and has had a great impact worldwide, particularly in Latin America over the last ten years. To provide information to the growing problem of bacterial resistance, in this study a group of 110 clinical isolates from hospitals in the city of Quito, the type of which genetic variants carrying *bla*_{CTX-M} were set were analyzed. Through Polymerase Chain Reaction and specific primers, we amplified *bla*_{CTX-M}-genetic types for every isolates in analysis. The genes were visualized on agarose gels and then the sequencing the following allelic variants were found: CTX-M-28 (66.4%), CTX-M-2 (13.6%), CTX-M-12 (8, 0%) and CTX-M-14 (6.4%) where *Escherichia. coli* Enterobacteria was the most prevalent (50.9%) whose isolates were mostly from urine. Although, in Latin America have been several studies on these enzymes, these data represent the first reports in Ecuador for these alleles. This has contributed information that can be used in molecular epidemiology studies both locally and regionally.

Key Word: antimicrobial resistance, *bla*_{CTX-M}-gen type; ESBL, Gramnegative bacteria; genetic variants.

3. INTRODUCCIÓN

La familia Enterobacteriaceae es un grupo de bacilos Gram negativos de gran importancia en la patología infecciosa. A pesar de ser considerados como parte de la microbiota comensal estable o transitoria del tracto digestivo de animales y humanos, algunos actúan como patógenos oportunistas causando infecciones en tractos urinario, respiratorio y en el sistema circulatorio (Madigan *et al.*, 2011; Cowan y Talaro, 2012; Silva *et al.*, 2011).

Fisiológicamente se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, no esporulados, anaerobios facultativos con disposición flagelar períttrica a excepción de los géneros *Shigella* y *Klebsiella* (Pommerville, 2011). Por su metabolismo, son capaces de fermentar la glucosa y los productos secundarios de esta metabolización son específicos dependiendo de la especie. Son oxidasa negativos excepto *Plesiomonas*, y catalasa positivos a excepción de *Shigella dysenteriae* (Willson, 2008).

Las bacterias entéricas más prevalentes son *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella entérica* y *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), causan una gran variedad de enfermedades en humanos y animales como diarrea, bacteriemia, infecciones en vías urinarias, vías respiratorias, entre otras. Durante la mitad del siglo anterior se reportó una estrecha correlación entre el uso de los antibióticos en el tratamiento de estas enfermedades y el desarrollo de la resistencia a los antibióticos (Davis y Davis, 2010).

La resistencia antimicrobiana es la capacidad que tiene la bacteria para sobrevivir a la acción de un antibiótico; representa una ventaja para expandir su nicho ecológico y posibilitar su proliferación ya sea en ambiente o en nosocomio (Silva *et al.*, 2011). Esta condición reduce las opciones terapéuticas, lo que repercute directamente en el éxito de la terapia para combatir infecciones producidas por estos patógenos, además de provocar elevados índices de morbilidad, mortalidad y costos hospitalarios elevados (Owens y Lautenbach, 2007; Eckert *et al.*, 2006).

La resistencia a los antibióticos en una bacteria puede ser intrínseca o adquirida (Pana, 2012). Los mecanismos de resistencia intrínseca son de origen natural y se deben a los rasgos genéticos propios de cada microorganismo. Sin embargo, la aparición de mutaciones en el ADN cromosómico o la adquisición de información genética contenida en plásmidos, transposones e integrones provocan la aparición de nuevas estrategias conocidas como resistencia adquirida (Guilfoile y Alcamo, 2009; Wax *et al.*, 2007).

En general, las bacterias entéricas causantes de infecciones han desarrollado mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos. El más importante de estos mecanismos es la producción de enzimas betalactamasas; estas enzimas son de naturaleza proteica y son codificadas por genes de origen cromosómico o plasmidial (Canton, 2008). El nivel de resistencia que presentan estas enzimas está correlacionada con su concentración, afinidad por los betalactámicos y propiedades hidrolíticas (Bush y Fisher, 2011).

Los antibióticos betalactámicos representan el principal grupo de antibióticos más seguros, eficaces y ampliamente utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas (Lewis *et al.*, 2002). Su uso terapéutico comenzó con la introducción de la penicilina durante la segunda guerra mundial y continúa con el desarrollo de las más actuales cefalosporinas y carbapenemes usadas en infecciones antibiótico-resistentes (Mayer, 2009; Weber y Karger, 2010; Wax *et al.*, 2007). Estos agentes actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana como resultado de su fuerte unión covalente a las proteínas ligadoras de penicilina PBP (por sus siglas en inglés “penicillin-binding-proteins”) (Zurita, 2012) que catalizan una serie de reacciones de transpeptidación y carboxilpeptidación necesarias para la síntesis de la pared celular y además activan una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano (Ola Sköld, 2011).

Los antibióticos betalactámicos tienen una estructura común llamada anillo betalactámico (Shlaes, 2010). La presencia de grupos sustitutivos unidos al anillo betalactámico establecen su clasificación en: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactámicos (Zurita, 2012). Las penicilinas han sido por largo tiempo el tratamiento de elección en un buen número de infecciones. Las cefalosporinas tienen un gran abanico de acción y pueden ser de primera, segunda, tercera, cuarta y quinta generación (Kollef, 2009). Los carbapenemes se usan en infecciones nosocomiales y en infecciones causadas por bacterias resistentes a quinolonas, aminoglucósidos y otros antibióticos de amplio espectro (Zurita, 2012; Pana, 2012).

El uso masivo de antibióticos betalactámicos como primera línea de acción para el tratamiento de infecciones generó una fuerte presión selectiva que favoreció a ciertas bacterias resistentes productoras de enzimas betalactamasas (Lewis *et al.*, 2002). Estas enzimas son numerosas, tienen una alta tasa de mutabilidad y se distribuyen ampliamente a nivel mundial en bacterias Gram negativas y Gram positivas (Sidjabat *et al.*, 2013; Drlica y Perlin, 2011; Jacoby y Munoz-Price, 2005).

Se han descrito alrededor de 900 betalactamasas de las cuales 300 son betalactamasas de espectro extendido, BLEE (Zurita, 2012). Las betalactamasas son enzimas bacterianas que inactivan a los antibióticos betalactámicos por hidrólisis. Se han clasificado de acuerdo a dos esquemas generales; la clasificación molecular de Ambler y el sistema de clasificación funcional de Bush–Jacoby–Mideros (Bonnet, 2004; Drawz y Bonomo, 2010). Para el presente estudio tomaremos en consideración la clasificación de Ambler.

Según Ambler (1980) a las betalactamasas se las ha clasificado en cuatro clases, designadas como clases A, B, C y D. El sustento de esta clasificación se basa en la similitud aminoacídica (Ambler *et al.*, 1991). Bajo este diseño de clasificación, las betalactamasas de clase A, C y D son serin–betalactamasas porque poseen un residuo de serina en el sitio activo que hidroliza el enlace amino del anillo betalactámico a través de mecanismos de acilación y deacilación. En cambio, las de clase B son las metalo–betalactamasas porque poseen un ión zinc en el sitio activo que actúa polarizando distintas estructuras del anillo

betalactámico provocando su hidrólisis (Matagne *et al.*, 1998; Paterson y Bonomo, 2005; Anderson *et al.*, 2012).

Las betalactamasas de la clase A se localizan tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas. Este tipo de enzimas son codificadas en ADN plasmidial y cromosómico. En esta clase se encuentran las betalactamasas tipo TEM, SHV, GES, CTX-M (Ambler *et al.*, 1991); entre estas, el mayor número de variantes descritas en los últimos años corresponden a las de tipo CTX-M las mismas que consideraremos en este estudio

La primera betalactamasa del grupo A fue identificada en 1963 y se la llamó TEM en honor a la paciente portadora Temoniera (Paterson y Bonomo, 2005). La segunda betalactamasa aislada fue la de tipo SVH, se la encontró en *Klebsiella pneumoniae* y su nombre se debe a una contracción de sulfhídrido variable, que es una de las propiedades bioquímicas de este grupo de enzimas (Paterson y Bonomo, 2005).

TEM y SHV son las betalactamasas más comunes en aislado clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, patógenos responsables de infecciones en tracto urinario, tracto respiratorio adquirido en nosocomio y bacteriemias (Guzmán-Blanco *et al.*, 2014).

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), son enzimas capaces de conferir a la bacteria resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera e inclusive cuarta generación y a los monobactámicos como el

aztreonam, pero no a cefamicinas ni carbapenémicos, además, son susceptibles de inhibición por inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Paterson y Bonomo, 2005). Estas propiedades son empleadas para su identificación fenotípica (Pérez *et al.*, 2007; Pitout y Laupland, 2005). Son responsables de la mayor parte de fracasos terapéuticos provocando elevados índices de morbilidad, mortalidad y costos hospitalarios (Owens y Lautenbach, 2007; Weber y Karger, 2010; Walsh, 2003).

Fueron aisladas por primera vez en 1983 en Alemania en una cepa de *Klebsiella ozonae* a la que se designó como SHV-2 hidrolizadora de oximinocefalosporinas; esta cepa se derivó de una SHV-1 por mutaciones puntuales (Zurita, 2012; Paterson y Bonomo, 2005). Con el tiempo se describieron nuevas enzimas BLEE derivadas de TEM-1 y TEM-2 con mutaciones puntuales en la secuencia del gen y que presentaban un espectro de actividad similar al de SHV-2.

La evolución de las betalactamasas por mutación no se ha limitado únicamente a las familias TEM y SHV. Durante las dos últimas décadas, nuevas enzimas de clase A con actividad BLEE han sido identificadas y nombradas como Betalactamasas tipo CTX-M (CTX-M). El nombre CTX-M refleja la potente actividad hidrolítica de esta enzima frente a la cefotaxima (Jacobi y Munoz-Price, 2005). Se clasifican filogenéticamente en cinco grupos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 Y CTX-M-25) de acuerdo a la similitud en la secuencia aminoacídica donde los miembros de cada grupo comparten más del 94 % de identidad (Bonnet, 2004).

Los análisis de filogenia sugieren que las CTX-M no se originaron por mutaciones a partir de plásmidos portadores de las enzimas sino que, fue a través de la movilización de genes cromosómicos *bla* de la especie *Kluyvera spp.* cuando fueron incorporados a elementos genéticos móviles como secuencias de inserción (SI) y su posterior agregación a estructuras más complejas como transposones de clase 1 e integrones (Canton *et al.*, 2012, Rodríguez-Bano y Navarro, 2006; Bonnet, 2004). Desde un punto de vista evolutivo, las cefotaximasas divergieron en el tiempo por mutaciones puntuales, producto de la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos (Poirel *et al.*, 2008).

Tradicionalmente cada grupo genético ha sido asociado con genes cromosomales presentes en diferentes especies de *Kluyvera*, las cuales son parte del microbioma normal del intestino humano y son consideradas bacterias patógenas oportunistas que esporádicamente provocan infecciones en la piel, tejidos blandos y tracto urinario (Canton *et al.*, 2012). Están presentes además en el medio ambiente como microorganismos de vida libre en el suelo, agua, aguas servidas y productos alimenticios de origen animal (Sarria *et al.*, 2001).

Gracias a que los genes que codifican estas BLEE se encuentran en plásmidos, su fácil transferencia por conjugación, ha facilitado su diseminación por varias zonas del mundo, focalizándose en infecciones nosocomiales y brotes por el este de Europa occidental, Sudamérica y Asia (Bonnet, 2004; Bush y Fisher 2011). La variante de mayor distribución en el mundo es la CTX-M-15, seguida de las enzimas CTX-M-14, CTX-M-3 y CTX-M-2 que presentan mayor distribución

geográfica (Guzmán-Blanco *et al.*, 2014, Canton *et al.*, 2012; Bush y Fisher, 2011; Hawkey y Jones, 2009). En Latinoamérica las enzimas tipo CTX-M han sido reportadas como endémicas y de amplio dominio (Villegas, 2008; Dhillon y Clark, 2012). Las enzimas de mayor prevalencia son la CTX-M-2, distribuida mayoritariamente al sur de la región, y la CTX-M-15 en el norte (Guzmán-Blanco *et al.*, 2014; D'Andrea *et al.*, 2013); sin embargo, según Sennati y colaboradores en una publicación del 2012 han identificado cambios en la epidemiología molecular de las variantes en Argentina describiendo a CTX-M-15, CTX-M-9, CTX-M-8 como nuevas enzimas prevalentes.

Hasta enero del 2014 se han reportado hasta 150 variantes CTX-M a nivel mundial; la información sobre estas enzimas se encuentra disponible en <http://www.lahey.org/Studies/>

El incremento dramático en el número de enzimas BLEE tipo CTX-M las ha convertido en las más prevalentes a nivel mundial incluso mayor al de los tipos TEM y SHV (Zurita, 2012). Esta dominancia no solo ha sido observada en ambientes nosocomiales sino también entornos comunitarios e incluso, se ha detectado en mascotas, animales de granja, vida silvestre, agua de río, productos de cadenas alimenticias y aguas residuales (Salles *et al.*, 2012; Ewers *et al.*, 2012; Pitout y Laupland, 2008).

Las BLEE son un problema de salud pública con proporciones alarmantes en Latinoamérica (Guzman-Blanco *et al.*, 2014). Las circunstancias médicas, sociales y ecológicas únicas en América Latina han sustentado una dinámica

epidemiológica en infecciones provocadas por bacterias Gram negativas BLEE positivas en pacientes ambulatorios durante los últimos 15 años (Salles *et al.*, 2013; Zurita, 2012). Por esta razón es importante caracterizar el genotipo de estas bacterias en pacientes con sepsis y otro tipo de infecciones como base para el diseño de estrategias de uso racional de antibióticos a través del monitoreo de las BLEE que circulan por el país (Zurita, 2012). El presente estudio pretende determinar las principales variantes genéticas del tipo CTX-M a través de técnicas moleculares y secuenciamiento de ADN en aislados bacterianos provenientes de hospitales de la ciudad de Quito.

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar las variantes genéticas en aislados bacterianos que codifican para enzimas betalactamasas procedentes de aislados clínicos de centros hospitalarios en Quito a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y del secuenciamiento de los amplificadores producto de la PCR.

3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE tipo CTX-M en aislados clínicos de pacientes hospitalizados a través del análisis de frecuencias.

- Determinar el origen de las muestras entéricas del Hospital A y del Hospital B asociada a enzimas betalactamasas tipo CTX-M a través del análisis de prevalencia del origen en la muestra.
- Tipificar, a través de secuenciamiento, genes tipo *bla*_{CTX-M} del grupo en estudio.

4. METODOLOGÍA

4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se analizó un total de 110 aislados clínicos bacterianos entéricos productores de betalactamasas de espectro extendido, BLEE, procedentes de la Colección Bacteriana Quito Católica (CB-QCA) de la Escuela de Ciencias Biológicas de la PUCE. De este grupo, 59 pertenecen al Hospital A y 51 al Hospital B (HB). Los aislados de ambos hospitales tienen un origen hospitalario y otro comunitario. Los aislados de origen hospitalario proceden de infecciones que no están presentes ni se están incubando en el momento de ingreso al hospital y pueden manifestarse clínicamente durante el ingreso o incluso después del alta hospitalaria. Los aislados de origen comunitario proceden de infecciones que se incubaron fuera de un centro de atención hospitalaria.

4.2 EXTRACCIÓN DEL ADN

Los 110 aislados tipo BLEE de la CB-QCA se encuentran criopreservados a -80 °C en caldo infusión cerebro corazón (del inglés “Brain Heart Infusion”, BHI, BBL™) con 30% de glicerol. Para el análisis, los aislados criopreservados a -80 °C fueron activados en 3 ml de caldo tripticasa de soya (del inglés “Tryptic Soy Broth”, TSB, Difco™) e incubados a 37 °C por 18 horas para la posterior purificación del ADN con el Kit comercial de Extracción “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Anexo 1).

4.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

4.3.1 CONDICIONES DE REACCIÓN

Para la amplificación de los genes *bla*_{CTX-M}, se utilizaron cebadores específicos citados en la Tabla 1. Este proceso de amplificación por PCR tuvo dos etapas; la primera involucra una PCR múltiplex que permitió discernir los grupos genéticos presentes en la población. Se usó un volumen final de 26,75 µl que incluye 1X de Master Mix (Promega), 0,1 µM por primer CTXM7-F y CTXM8-R; 0,05 µM por primer CTXM17-F y CTXM18-R; 0,05 µM por primer CTXM19-F y CTXM20-R; 0,025 µM por primer CTXM11-F y CTXM12-R; 6,25 nM de Tris HCl, 2,5 mM de KCl y 50ng ADN.

En la segunda etapa de la PCR se utilizó cebadores específicos para amplificar cada uno de los grupos genéticos CTX-M (Tabla 1) y de esta manera determinar la variante del gen *bla*_{CTX-M}. Para CTX-M G2 el volumen final fue de 50 µl que incluyó 25 µl de “master mix” (Promega), 1,5 µl por cada cebador CTXM-F2 y CTXM-R2 a una concentración de 10 µM, 20 µl de agua libre de nucleasas (Invitrogen®) y 2 µl de ADN.

Para CTX-M G9 el volumen final fue de 25 µl que incluyó 12 µl de “master mix” (Promega), 1 µl por cada cebador CTXM-F9 y CTXM-R9 a una concentración de 10µM, 10 µl de agua libre de nucleasas (Invitrogen®) y 1 µl de ADN.

Finalmente, para CTX-M G1 el volumen final fue de 25 μ l que incluyó 12 μ l de “master mix” (Promega), 1 μ l por cada cebador CTXM-F2 y CTXM-R2 a una concentración de 10 μ M, 10 μ l de agua libre de nucleasas (Invitrogen®) y 1 μ l de ADN.

4.3.2 PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN

El programa de amplificación para los grupos CTX-M tuvo una denaturación inicial de 95 °C por 2 minutos seguida de 33 ciclos de: denaturación a 95 °C por 1 minuto, hibridización a 55 °C por 1 minuto y denaturación a 72 °C por 1 minuto; concluimos con una extensión final por 10 minutos a 72 °C.

Los programas de amplificación de la PCR para los grupos CTX-M G2, CTX-M G9 y CTX-M G1 respectivamente se exponen en la Tabla 2. En cada uno de ellos la temperatura de hibridización fue estandarizada a través de un gradiente. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador “Multigene Gradient” 080845 de “Labnet International Inc”.

4.4 VIZUALIZACIÓN, PURIFICACIÓN Y SECUENCIAMIENTO DE LOS PRODUCTOS DE PCR Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

El producto de la PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (125 V, 60 minutos) diluida en 89 mM Tris Base, 89 mM ácido bórico, 25 mM EDTA, TBE (1X), en tampón de corrida 44,5 mM Tris Base, 44,5 mM ácido bórico, 12,5 mM EDTA, TBE al 0,5X. Se usó un marcador de peso molecular de 100pb

(Invitrogen); el gel fue teñido con *SYBR*® Gold 10.000x (Invitrogen™) y la visualización de las bandas se realizó con el sistema de captura de imagen Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ (BIO-RAD).

Los productos de amplificación fueron purificados a partir del gel de agarosa mediante el Kit de purificación Wizard® SV Gel PCR Clean-up System (Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante. Los elementos purificados se analizaron nuevamente por electroforesis en gel de agarosa con las condiciones indicadas en el párrafo anterior pero a diferencia de una escalera de peso molecular se usó una de concentración “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen™). Los productos que presentaban una concentración mayor o igual a 20 ng/μl fueron enviados a la compañía Macrogen para su secuenciamiento.

Finalmente, las secuencias fueron analizadas con el programa Geneious Pro 5.6., comparadas con la base de datos del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) a través del “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) y alineadas con el programa de alineamiento múltiple de secuencias para ADN o proteínas “ClustalW2”

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de frecuencias absolutas y relativas seguida de una prueba de contraste de frecuencias, Chi-cuadrado con $p= 0,05$, para validar el análisis de cualquier tipo de prevalencia presente en el estudio. Además, se

realizó una representación gráfica con diagramas en barra y pasteles para observar las diferencias en la prevalencia relacionada al origen de la muestra, variante genética, procedencia de la muestra y tipo de bacteria más prevalente.

5. RESULTADOS

5.1 AISLADOS HOSPITALARIOS

Se analizó un total de 110 aislados hospitalarios provenientes de la ciudad de Quito, BLEE positivos, colectados entre los meses de mayo y septiembre de 2009. De este grupo, 59 provienen del Hospital A y 51 provienen del Hospital B. De los 59 aislados del Hospital A, 45 son de origen hospitalario y 14 de origen comunitario. De los 45 aislados de origen hospitalario, 34 corresponden a *E. coli*; 10 corresponden a *K. pneumoniae* y 1 corresponde a *Citrobacter freundii*. De los 14 restantes de origen comunitario, 10 corresponden a *E. coli*; 2 corresponden a *K. pneumoniae* y 2 pertenecen a *Serratia liquefacien* y *Enterobacter cloacae*. De los 51 aislados correspondientes al Hospital B, 27 son de origen hospitalario y 24 de origen comunitario. De los 27 aislados de origen hospitalario, 19 corresponden a *E. coli*; 7 a *K. pneumoniae* y 1 corresponde a *Morganella morganii*. De los 24 aislados de origen comunitario, 22 corresponden a *E. coli* y 2 a *K. pneumoniae* (Figura 1, Tabla 3).

De los 110 aislados, *E. coli* es la enterobacteria más prevalente con 85/110 (77,3 %) aislados seguida de *K. pneumoniae* con 21/110 aislados (19,1 %) y 4/110 (3,6%) son otras bacterias entéricas incluidas *Citrobacter freundii*, *Serratia liquefacien*, *Enterobacter cloacae* y *Morganella morganii* (Figura 2) (Chi cuadrado= 99,509; p= 0,000, n=110).

Los 110 aislados se agruparon bajo tres tipos de procedencias: orina, alguna secreción y otros orígenes (Tabla 3). La mayor prevalencia se encontró en muestras de orina (n=67) seguida de algún tipo de secreción (n=19); mientras que 24 muestras tuvieron distinto origen como abscesos, hemocultivo, heridas e hisopados entre otras (n=24) (Chi cuadrado= 37,982; p=0,000; n=110) (Tabla 3). De los 67 aislados provenientes de orina, la enterobacteria más prevalente fue *E. coli* con 56/110 (50,9 %) seguida de *K. pneumoniae* con 10/110 (9,1 %) y de *Citrobacter freundii* con 1/110 (0,9 %) (Chi cuadrado= 77,940; p= 0,000; n= 67). De los 19 aislados provenientes de alguna secreción, la enterobacteria más prevalente fue *E. coli* con 15/110 (13,6 %) seguida de *K. pneumoniae* 3/110 (2,7 %) y de *Serratia liquefacien* con 1/110 (0,9 %) (Chi cuadrado= 18,105; p= 0,000; n= 19). De los 24 aislados que tienen otro tipo de procedencia, la enterobacteria más prevalente fue *E. coli* con 14/110 (12,7 %) seguida de *K. pneumoniae* con 8/110 (7,3 %) y de *Enterobacter cloacae* y *Morganella morganii* con 2/110 (1,8 %) (Figura 3, Tabla 3) (Chi cuadrado= 9,0; p= 0,01; n= 24).

5.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GRUPOS GENÉTICOS CTX-M

De los 110 aislados, 90/110 (81,8 %) pertenecen a CTX-M G1 (260 pb); 12/110 (10,9 %) a CTX-M G2 (341 pb); 8/110 (7,3 %) a CTX-M G9 (293 pb) (Figura 4, Figura 5, Tabla 3) (Chi cuadrado= 116,582; p= 0,000; n= 110).

De los 110 aislados, los correspondientes a CTX-M G1 (G1), en su mayoría, fueron *E. coli* con 71/110 (64,5 %) seguidos de *K. pneumoniae* con 15/110 (13,6 %) y de otras bacterias (*Citrobacter freundii*, *Serratia liquefacien*,

Enterobacter cloacae y *Morganella morganii*) con 4/110 (3,6 %) (Chi cuadrado= 86,067; p= 0,000; n= 90). De los aislados que presentan CTX-M G2 (G2) 6/110 (5,5 %) fueron *E. coli* y 6/110 (5,5 %) eran *K. pneumoniae*. De los aislados correspondientes a CTX-M G9 (G9) todos fueron *E. coli* con 8/110 (7,3 %) (Figura 6).

5.3 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GENES TIPO *BLA*_{CTX-M}

Los 110 aislados clasificados en un grupo tipo CTX-M, fueron sometidos a otra PCR con cebadores específicos para amplificar las variantes de cada grupo (Tabla 1) (Figura 7, Figura 8 y Figura 9). Las variantes del gen *bla*_{CTX-M} fueron caracterizadas en 103/110 (93,6 %) aislados; mientras que, 7/110 (6,4%) de los aislados no pudieron correlacionarse con ninguna secuencia para los genes tipo *bla*_{CTX-M}.

De los 110 aislados en estudio, la variante *bla*_{CTX-M-28} fue la más prevalente con 83/110 (66,4 %) seguida de *bla*_{CTX-M-2} 17/110 (13,6 %), luego de *bla*_{CTX-M-12} con 10/110 (8,0 %) y de *bla*_{CTX-M-14} con 8/110 (6,4 %). Finalmente 7/110 (5,6 %) no fueron correlacionadas con alguna variante (Figura 10) (Chi cuadrado= 170,640; p= 0,000; n= 125).

Los 110 aislados además fueron agrupados de acuerdo a si poseían una sola variante alélica o dos o más variantes alélicas. Así, 70/110 (63,6 %) aislados presentan solamente la variante CTX-M-28, 9/110 (8,2 %) aislados presentan únicamente la variante CTX-M-12; 8/110 (7,3 %) aislados presentan solamente la

variante CTX-M-2 y 2/110 (1,8 %) aislados presentan solamente la variante CTX-M-14. Con dos o más variantes alélicas, 7/110 (6,4 %) aislados presentan al mismo tiempo la variante CTX-M-28 y CTX-M-2 (CTX-M-28/2); en 5/110 (4,5 %) aislados presentan las variantes CTX-M-28 y CTX-M-14 (CTX-M-28/14); 1/110 (0,9 %) aislado presenta las variantes CTX-M-12 y CTX-M-2 (CTX-M-12/2) y en 1/110 (0,9 %) aislado se identificó las variantes CTX-M-28, CTX-M-14 y CTX-M-2 (CTX-M-28/14/2) combinadas. En 7/110 aislados no se pudo definir las variantes (Figura 11, Tabla 4). (Chi cuadrado= 313, 327; $p= 0,000$ $n= 110$).

Así mismo, la variante tipo CTX-M más prevalente, ya sea en forma de un único alelo o en combinación, con respecto a aislados hospitalarios fue CTX-M-28 (53/110; 48,2 %) seguida de CTX-M-2 (15/110; 12,0 %) luego de CTX-M-12 (6/110; 4,8 %) y finalmente de CTX-M-14 (5/110; 4,0 %) (Chi cuadrado= 77,709; $p= 0,000$; $n= 79$). Con respecto a los aislados comunitarios, la variante más prevalente también fue CTX-M-28 (30/110; 27,3 %) seguida de la variante CTX-M-12 (4/110; 3,2 %), luego de la variante CTX-M-14 (3/110; 2,4 %) y finalmente de CTX-M-2 (2/110; 1,6 %) (Chi cuadrado= 56,282; $p= 0,000$; $n= 39$).

Con respecto a las bacterias más representativas *E. coli* y *K. pneumoniae*, podemos ver que *E. coli* es el aislado de mayor prevalencia ya sea en ambientes hospitalarios con 53/110 (48,2 %) como en comunitarios con 32/110 (29,1 %) seguido de *K. pneumoniae* con 17/110 (15,5 %) aislados en ambientes hospitalarios y 4/110 (3,6 %) aislados en ambientes comunitarios (Figura 12, Tabla 5) (Chi cuadrado= 18,514; $p= 0,000$; $n= 70$).

Con respecto a las cuatro variantes tipo CTX-M, *bla*_{CTX-M-28} presenta a *E. coli* como aislado mayoritario con el 53,7 % (67/110) seguido de *K. pneumoniae* con el 10,4 % (13/110) y de otras enterobacterias con un 2,4 % (3/110) (Chi cuadrado= 85, 687 p= 0,000; n= 83). *bla*_{CTX-M-2} presenta a *E. coli* como aislado mayoritario con un 8,8% (11/110) y seguido de *K. pneumoniae* con un 4,8% (6/110). *Bla*_{CTX-M-12} presenta a *E.coli* como aislado mayoritario con 4,8 % (6/110) seguido de *K. pneumoniae* con el 2,4 % (3/110) y de otras enterobacterias con el 0,8 % (1/125). *bla*_{CTX-M-14}, presenta a *E. coli* como único aislado mayoritario con un 6,4 % (8/110) (Figura 12, Tabla 5).

5.4 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS

El análisis de las secuencias nucleotídicas con el programa Geneious y ClustalW2, mostró cuatro tipos de variantes alélicas tipo CTX-M; *bla*_{CTX-M-28} (G1), *bla*_{CTX-M-12} (G1), *bla*_{CTX-M-2} (G2) y *bla*_{CTX-M-14} (G9). Cada una de estas variantes presenta una secuencia nucleotídica específica. Las variantes CTX-M-12 y CTX-M-28 pertenecen al mismo grupo genético, por esta razón, las secuencias de aminoácidos son similares, el cambio se produce en la posición A6T, S91N, T279V y D289N (Figura 13). Las secuencias aminoacídicas de las otras variantes CTX-M-2 y CTX-M-14 difieren entre sí pues pertenecen a grupos genéticos distintos; sin embargo, como se observa en la Figura 14 presentan cierto grado de conservación entre ellas ya que pertenecen a la misma familia de enzimas betalactamasas tipo CTX-M.

6. DISCUSIÓN

La resistencia antimicrobiana mediada por betalactamasas probablemente ha sido investigada más a fondo que otros mecanismos de resistencia a lo largo de la historia de las enfermedades infecciosas provocadas por bacterias. Cada año se publican a nivel mundial varios estudios con datos recientes que redefinen la perspectiva sobre este problema (Canton *et al.*, 2012; Bush y Fisher, 2011).

Durante los 80s y 90s, las enzimas betalactamasas tipo TEM y SHV fueron dominantes alrededor del mundo (Paterson y Bonomo, 2005). Se asociaron con brotes hospitalarios que involucraban a *K. pneumoniae* y en menor medida a *E. coli* y otras enterobacterias (Canton *et al.*, 2012; Salles *et al.*, 2013).

En ese periodo, organismos productores de enzimas tipo *bla*_{CTX-M} rara vez fueron aislados; sin embargo, estudios realizados en los últimos 10 años revelan que las enzimas cefotaximasas casi han desplazado a otras enzimas betalactamasas incluyendo a las variantes SHV y TEM. Su rápida diseminación ha permitido encontrarlas en aislados hospitalarios y comunitarios (Ewers *et al.*, 2012; Salles *et al.*, 2013; Pitout y Laupland, 2008) con *E. coli* como el patógeno mayoritariamente productor de estas enzimas (Cantón *et al.*, 2012; Bush y Jacoby, 2010; Hawkey y Jones, 2009). Este desplazamiento pudo haber ocurrido por la fácil diseminación de las enzimas *bla*_{CTX-M} por medio de elementos altamente móviles como plásmidos y transposones debido a que se encuentran dentro de clones viables y porque el uso de antibióticos favoreció a los procesos

de co-selección (Guzmán-Blanco *et al.*, 2014; D'Andrea *et al.*, 2013; Canton *et al.*, 2012; Salle *et al.*, 2013).

Las enzimas betalactamasas tipo CTX-M se han dispersado a lo largo de los continentes desde finales de los años 90. En la actualidad son las enzimas más prevalentes a nivel mundial con la variante CTX-M-15 como la de mayor distribución (Sennati *et al.*, 2012; Seki *et al.*, 2013, Zurita, 2012).

En América del Sur las enzimas BLEE CTX-M han sido reportadas como endémicas desde el punto de vista epidemiológico ya que dichas enzimas permanecen en circulación por un largo periodo de tiempo dentro de la región y de manera estable (Canton y Coque, 2006; Last, 2001). Desde 1989, cuando fue reportada por primera vez en Argentina una enzima de este tipo, se han dispersado rápidamente a países vecinos incluyendo, Paraguay, Uruguay y Brasil (Villegas *et al.*, 2008). Según Salles *et al.* (2013) y Reinert *et al.* (2007) el incremento de la resistencia antimicrobiana en Latinoamérica aparece como uno de los más altos en relación con otras regiones del mundo.

A pesar de que los datos regionales muestran que en América del Sur más del 58,0% de aislados productores de BLEE son *K. pneumoniae* y más del 32% son *E. coli* (Guzman-Blanco *et al.*, 2014) en el presente estudio se observa una clara prevalencia de *E. coli* en la mayoría de los aislados 85/110 (77,3 %) seguido de *K. pneumoniae* 21/110 (19,1 %). Esto es posible porque desde el 2005, esta especie ha venido desplazando a *K. pneumoniae* como especie entérica predominante productora de BLEE (Salles *et al.*, 2013) como confirman los datos

proporcionados por Antimicrobial Surveillance Program (SENTRY), Antimicrobial Resistance Trends (SMART) y Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST) y Red Nacional de Vigilancia de Resistencia Bacteriana en el Ecuador (REDNARBEC) Guzman-Blanco *et al.*, 2014; Zurita, 2012). En estos estudios se muestra que hasta el 2010, la frecuencia de *E. coli* es mayor en Ecuador, Chile, Guatemala, Honduras y México mientras que *K. pneumoniae* es más prevalente en Argentina y Brasil (Guzman-Blanco *et al.*, 2014; Zurita, 2012).

En los 103/110 aislados clínicos analizados que dieron positivo para alguna variante tipo CTX-M (Figura 11) se determinó que la mayoría (70/110) de aislados presentaron la variante *bla*_{CTX-M-28} seguidos, en menor cantidad, de las variantes tipo *bla*_{CTX-M-12}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-28/2}, *bla*_{CTX-M-28/14}, *bla*_{CTX-M-12/2}, y *bla*_{CTX-M-28/14/2} (Figura 11, Tabla 5). Estos resultados muestran novedad porque a nivel regional se han reportado en su mayoría variantes tipo CTX-M-12, CTX-M-14, CTX-M-2 y CTX-M-15, en particular, en países vecinos como Colombia y Perú (Cergole-Novella *et al.*, 2010; Pallecchi *et al.*, 2004; Pallecchi *et al.*, 2007, Villegas *et al.*, 2008).

La ausencia de información previa publicada indica que estos datos representarían los primeros reportes de prevalencia de estas enzimas en Ecuador. En América del Sur han sido reportadas las variantes: CTX-M-12 en Colombia (Villegas *et al.*, 2004); CTX-M-28 en Brasil (Lopes *et al.*, 2010); CTX-M-14 en Bolivia, Venezuela (Millán *et al.*, 2011) y finalmente, la variante CTX-M-2, ha sido reportada en Argentina, Chile, Paraguay, Perú, Bolivia, Uruguay y Brasil (Villegas *et al.*, 2008).

Este estudio muestra al gen *bla*_{CTX-M-28} (83/110 aislados) como el más prevalente. Esta variante no es común en América del Sur pero sí en Asia (Yu *et al.*, 2007). Este alelo fue descrito por primera vez en Francia luego en China y la India en aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* en pacientes ambulatorios (Lopes *et al.*, 2010). En el presente estudio, esta variante se presenta en la mayoría de la población y se ha encontrado en aislados de *E. coli* (*bla*_{CTX-M-28}=56/110), *K. pneumoniae* (*bla*_{CTX-M-28}= 11/110), y otras bacterias entéricas (*bla*_{CTX-M-28}= 3/110) ya sean de origen hospitalario o comunitario como se puede observar en la Figura 12. El hallazgo del alelo *bla*_{CTX-M-28} en *E. coli*, *K. pneumoniae* y otras bacterias entéricas no es usual, más aún si está presente en la mayor parte de los aislados; este resultado puede atribuirse a algún tipo de brote epidemiológico o tal vez el análisis de las secuencias que portan el alelo debería ser más minuciosas con el fin de asegurar la prevalencia de esta variante. Como se había mencionado, solamente Brasil ha reportado esta variante en América del Sur según reporte de Lopes *et al.*, en el 2010, por esta razón es prudente someter a estos aislados a un proceso más riguroso de análisis y además porque existe una gran similitud entre las variantes CTX-M-28 y CTX-M-15; se diferencian únicamente por un cambio de un ácido aspártico (Asp) por una aspargina (Asn) en la posición 288 del gen.

Al igual que el alelo CTX-M-28 pertenece al grupo CTX-M- G1, el alelo CTX-M-12 también lo conforma. Este fue aislado por primera vez en Kenya (2001) en una muestra de *K. pneumoniae*. En este estudio, de los 103/110 aislados que fueron identificados para alguna variante tipo CTX-M, 9 portaban únicamente el

alelo *bla*_{CTX-M-12}; 4 pertenecen al Hospital A, 5 pertenecen al HB y 1 portador de los alelos *bla*_{CTX-M-12/2} procedente del HB (Figura 12). Los 10 aislados presentan a *E. coli*, como la bacteria más prevalente (n=6) seguida de *K. pneumoniae* (n=3). Colombia determinó el primer reporte de este alelo para América latina en el 2002; desde entonces se ha observado una diseminación continua de esta variante en hospitales de Bogotá (de Silva *et al.*, 2006; Villegas *et al.*, 2004).

La variante CTX-M-2 es la enzima endémica más prevalente en América del Sur y además se halla ampliamente distribuida en Israel y Japón. (Canton *et al.*, 2012; Sennati *et al.*, 2012; Nakano *et al.*, 2012; Villegas *et al.*, 2008). En nuestro análisis hemos hallado un total de ocho aislados que presentan solamente el alelo *bla*_{CTX-M-2}; cinco pertenecen al HA, son de origen hospitalario y fueron identificados en *E. coli*; los 3 restantes son de origen hospitalario y fueron aislados en *K. pneumoniae* (Figura 12). De las variantes que presentan al alelo *bla*_{CTX-M-2} en combinación siete presentan simultáneamente los alelos *bla*_{CTX-M-28/2}; uno presenta los alelos *bla*_{CTX-M-12/2} y uno presenta los alelos *bla*_{CTX-M-28/14/2}. Estos aislados presentan mayoritariamente a *E. coli* con 11/110 aislados, seguidos de *K. pneumoniae* con 6/110 aislados como las bacterias más prevalentes (Figura 12).

Los datos colectados para América del Sur con respecto a la variante CTX-M-2 indican que se ha aislado mayoritariamente en miembros de la familia Enterobacteriaceae tales como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica* y *Enterobacter aerogenes*

(Pallecchi *et al.*, 2007; Villegas *et al.*, 2008; Livermore, 2012; Sennati *et al.*, 2012). En Japón en cambio, esta variante se ha establecido, desde el 2000, de manera permanente y exclusiva en aislados de *Proteus mirabilis* de origen hospitalario y comunitario (Nakano *et al.*, 2012).

Dentro de las enzimas betalactamasas tipo CTX-M, las variantes CTX-M-15 y CTX-M-14 son de importante distribución mundial (Canton *et al.*, 2012; Bush y Fisher, 2011; Hawkey y Jones, 2009); invaden a humanos y animales así como también el ambiente (Hawkey y Jones, 2009). En este estudio 8/110 aislados muestran la variante CTX-M-14, todas pertenecen al Hospital A y la enterobacteria portadora es únicamente *E. coli*. La mayoría es de origen hospitalario 5/110 y presentan a la variante de la forma *bla*_{CTX-M-28/14}. Los aislados que presentan la variante de forma individual 2/110 son de origen comunitario (Figuras 12). Este alelo se ha diseminado a nivel mundial por Francia, Korea, China, España, Canadá, Nueva Zelanda, Australia entre otros (Ho *et al.*, 2012). Su dispersión se ha asociado a elementos genéticos móviles más que a expansión por clonalidad (Naseer y Sundsfjord, 2011). Según Ho *et al.* (2012), esta variante se halla con frecuencia en aislados de *E. coli* causantes de infecciones a las vías urinarias y que se adquieren a través de la comunidad.

La detección de genes *bla*_{CTX-M-14} en América es un fenómeno reciente; esta variante ha sido reportada en Venezuela, Perú y Brasil (Bado *et al.*, 2012; Cergole-novella *et al.*, 2010; Mendonça *et al.*, 2007, Pallecchi *et al.*, 2007).

La bacteria *Escherichia coli* ha sido la más prevalente en toda la muestra en análisis (85/110). Esta bacteria es la mayor causa infección en vías urinarias e intra-abdominales en humanos de todas las edades en América Latina y a nivel mundial (Kang *et al.*, 2013; Zurita, 2012; Bours *et al.*, 2010). Puede variar desde una cistitis hasta un síndrome séptico (Kang *et al.*, 2013). En concordancia con la literatura científica, nuestros resultados muestran una prevalencia de *E. coli* (77,3 %) en infecciones a la vías urinarias seguida de *K. pneumoniae* (19,1 %) y de otras bacterias entéricas (13,6 %) como lo indica la Figura 2. Resultados epidemiológicos indican que *E. coli* productora de BLEE asociada a infecciones a las vías urinarias es más bien adquirida en la comunidad y en menor medida, como consecuencia de la presión selectiva ejercida por antibióticos utilizados en establecimientos de salud, por transmisión intrahospitalaria o por terapia antibiótica repetitiva en pacientes ambulatorios con obstrucciones en tracto urinario (Pitout y Laupland, 2008); sin embargo, al comparar nuestros datos entre bacterias de origen hospitalario y comunitario se observa que *E. coli* es más prevalente en aislados hospitalarios 53/110 (48,2 %) que comunitarios 29/110 (26,4 %). Según Naseer y Sundsfjord (2011) y Livermore (2012) estudios en epidemiología molecular han revelado una exitosa dispersión de esta variantes tipo *bla*_{CTX-M} a nivel mundial gracias a su asociación con plásmidos conjugativos y clones bacterianos virulentos que presentan éxito en la dispersión. En el caso de *K. pneumoniae* portador del plásmido IncF asociado a la variante tipo CTX-M de mayor dispersión, ha provocado brotes locales a nivel mundial pero ninguno ha alcanzado un gran éxito. A diferencia de *K. pneumoniae*, *E. coli* asociada a este mismo plásmido es extremadamente exitosa porque además de portar el plásmido está asociada estrechamente a una secuencia tipo (ST) 131 ahora

ampliamente distribuida a nivel mundial asociada a un clon de *E. coli* portadora de la variante CTX-M-15 transportadora de un elemento móvil que lleva dicha secuencia y que se ha asociado a la misma.

7. CONCLUSIONES

- Los aislados clínicos bacterianos del Hospital A y del Hospital B se asociaron mayoritariamente a los grupos de betalactamasas tipo CTX-M G1 (81,8 %) seguido de CTX-M G2 (10,9 %) y CTX-M G9 (7,3 %).
- En la población de estudio la mayor prevalencia fue de *E. coli* con 85/110 (77,3 %) seguida de *K. pneumoniae* con 21/110 aislados (19,1 %) y otras bacterias entéricas incluidas *Citrobacter freundii*, *Serratia liquefacien*, *Enterobacter cloacae* y *Morganella morganii* 4 /110 (3,6%).
- Se determinó que los aislados provienen mayoritariamente de muestras de orina (67/110, 60,9 %).
- Los aislados clínicos bacterianos del Hospital A y del Hospital B luego del secuenciamiento presentan cuatro tipos de variantes génicas; *bla*_{CTX-M-28}, (83/110), *bla*_{CTX-M-2} (17/110) *bla*_{CTX-M-12}, (10/110) y *bla*_{CTX-M-14} (8/110).
- Se determinó que la variante tipo *bla*_{CTX-M} de mayor prevalencia fue la *bla*_{CTX-M-28} (70/110, 63,6 %) de forma individual, seguida muy por debajo por las variantes *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-12}, todas ellas presentes ya sea de forma individual o en combinación
- Se estableció que la variante *bla*_{CTX-M-28}, es la más prevalente tanto en los aislados de origen hospitalario (54/110, 49,1 %) como de origen

comunitario (28/110, 25,5 %) y que además *E. coli* fue la bacteria mayormente aislada en ambiente hospitalario 53/110 y en ambiente comunitario (31/110).

- La mayor versatilidad en presencia de variantes tipo CTX-M fue observada en el Hospital A, ya sea a nivel hospitalario como comunitario pues se presentaron las variantes CTX-M-28, CTX-M-2, CTX-M-12, CTX-M-14, CTX-M-28/2, CTX-M-14 y CTX-M-28/2/14.
- Estos datos representan los primeros reportes en Ecuador para estas variantes.

8. LITERATURA CITADA

- Ambler, R. 1980. Th estructure of beta-lactamases. Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Science, 289 (1036): 321-331.
- Ambler, R., Coulson, A., Freire, J., Ghuysen, J., Joris, B., Forsman, M., Le´vesque, R., Tiraby, G. y Waley, G. 1991. A standard numbering scheme for the class A β - lactamases. Biochemistry Journal 276: 269-272.
- Anderson, R., Groundwater, P., Todd, A. y Worsley, A. 2012. Atibacterial Agents: Chemistry, Mode of action, Mechanism of Resistance y Apliaciones Clínicas. Wiley, United Kingdom.
- 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? Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 101(7): 741-748.
- Bado, I., García-Fulgueiras, V., Cordeiro, N., Betancor, L., Caiata, L., Seija, V., Robino, L., Algorta, G., Chabalgoity, J. y Ayala, J. 2012. First human isolate of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis harboring bla_{CTX-M-14} in South America. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56(4): 2132-2134.

- Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (1): 1-14. Doi: 10.1128/AAC.48.1.1-14.2004.
- Bours, P., Polak, R., Hoepelman, A., Delgado, E., Jarquin, A. y Matute, A. 2010. Increasing resistance in community-acquired urinary tract infections in Latin America, five years after the implementation of national therapeutic guidelines. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(9): e770-e774.
- Bush, K. y Fisher, J. 2011. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology* 65: 455-478.
- Bush, K. y Jacoby, G. 2010. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemotherapy* 54 (3): 969-976. Doi:10.1128/AAC.01009-09.
- Cantón, R., González-Alba, J. y Galán, J. 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion, *Frontiers in Microbiology*, 3.
- Cantón, R. y Coque, T. 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology* 29 (5): 466-475.

- Canton, R., A. Novais, et al. (2008). "Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology Infectology* 14 (1): 144-53.
- Cergole-Novella, M., Guth, B., Castanheira, M., Carmo, M. y Pignatari, A. 2010. First Description of bla CTX-M-14 and bla CTX-M-15 Producing *Escherichia coli* Isolates in Brazil. *Microbial Drug Resistance*, 16(3): 177-184.
- Cowan, M. y Talaro, K. 2012. *Microbiology: a systems approach*. McGraw-Hill Higher Education, New York, EE.UU.
- D'Andrea, M., Arena, F., Pallecchi, L. y Rossolini, G. 2013. CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303: 305-317.
- Davies, J. y Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74 (3): 417-433. Doi: 10.1128/MMBR.00016-10.
- de Silva, E., Anaya, J., Reza, M., Mejía, E., Manrique, 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 Bogotá, Colombia. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5): 1919-1920.

- Dhillon, R. y Clark, J. 2012. ESBLs: A clear and present danger? *Critical Care Research and Practice*, 2012: 11. doi:10.1155/2012/625170
- Drlica, K. y Perlin, D. 2011. *Antibiotic Resistance: Understanding and Responding to an Emerging Crisis*. Ft Press, New Jersey, EE.UU.
- Drawz, S. y Bonomo, R. 2010. Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews* 23 (1): 160-201.
- Eckert, C., Gautier, V. y Arlet, G. 2006. DNA sequence analysis of the genetic environment of various blaCTX-M genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57 (1): 14-23. Doi:10.1093/jac/dki398
- Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S. y Wieler, LH. 2012. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7): 646-655.
- Guilfoile, P. y Alcamo, I. E. 2009. *Antibiotic-resistant bacteria*. Chelsea House, New York, EE.UU.
- Guzmán-Blanco, M., Labarca, J., Villegas, M. y Gotuzzo, E. 2014. Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*.

- Hawkey, P. y Jones, A. 2009. The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(1): i3-i10.
- Ho, P., Lo, W., Yeung, M., Li, Z., Chan, J., Chow, K., Yam, W., Tong, A., Bao, J. y Lin, C. 2012. Dissemination of pHK01-like incompatibility group IncFII plasmids encoding CTX-M-14 in *Escherichia coli* from human and animal sources. *Veterinary Microbiology*, 158(1): 172-179.
- Jacoby, G. y Munoz-Price, L. 2005. The new β -lactamases. *New England Journal of Medicine* 352 (4): 380-391. DOI: 10.1056/NEJMra041359.
- Kang, C., Cha, M., Kim, S., Ko, K., Wi, Y., Chung, D., Peck, K., Lee, N. y Song, J. 2013. Clinical and molecular epidemiology of community-onset bacteremia caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* over a 6-year period. *Journal of Korean medical science*, 28(7): 998-1004.
- Kariuki, S., Corkill, J., Revathi, G., Musoke, R. y Hart, C. 2001. Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(7): 2141-2143.
- Kollef, M. 2009. New antimicrobial agents for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Critical Care and Resuscitation*. 11(4): 282-6.
- Last, J. 2001. *A dictionary of epidemiology*. Oxford University Press. EE.UU.

- Lewis, K., Salyers, A., Taber, H. y Wax, R. 2002. Bacterial resistance to antimicrobials. CRC Press, New York, EE.UU.
- Livermore, D. 2012. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 27(2): 128-142.
- Lopes, A., Veras, D., Lima, A., Melo, R. y Ayala, J. 2010. *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2010. 105(2): 163-167.
- Madigan, M., Martinko, J. y Parcker, J. 2011. Brock Biology of Microorganisms. International Microbiology, New York, EE.UU.
- Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J. y Frere, J. 1998. Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity. *Biochemical Journal*, 330: 581-598.
- Mayer, L. D. 2009. Antimicrobial Drug Resistance, in *Mechanisms of Drug Resistance*. Humana Press, New York.
- Mendonça, N., Leitao, J., Manageiro, V. y Ferreira, E. 2007. Spread of extended-spectrum β -lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6): 1946-1955.

- Millán, B., Ghiglione, B., Díaz, T., Gutkind, T. y Araque, M. 2011. CTX-M-14 β -lactamase-producing *Citrobacter freundii* isolated in Venezuela. *Annals of Clinical Microbiology of Antimicrobials*, 10: 22
- Nakano, R., Nakano, A., Abe, M., Inoue, M. y Okamoto, R. 2012. Regional outbreak of CTX-M-2 β -lactamase-producing *Proteus mirabilis* in Japan. *Journal of medical microbiology*, 61(Pt 12): 1727-1735.
- Naseer, U. y Sundsfjord, A. 2011. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microbial Drug Resistance*, 17(1): 83-97.
- Ola Sköld, M. 2011. *Antibiotics and Antibiotic Resistance*. Wiley. New Jersey. EE.UU.
- Owens, R. y Lautenbach, E. 2007. *Antimicrobial resistance: problem pathogens and clinical countermeasures*. Informa healthcare, New York. EE.UU.
- Pallecchi, L., Malossi, M., Mantella, A., Gotuzzo, E., Trigoso, C., Bartoloni, A., Paradisi, F., Kronvall, G. y Rossolini, G. 2004. Detection of CTX-M-type β -lactamase genes in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy children in Bolivia and Peru. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12): 4556-4561.
- Pallecchi, Bartoloni, A., Fiorelli, C., Mantella, A., Di Maggio, T., Gamboa, H., Gotuzzo, E., Kronvall, G., Paradisi, F. y Rossolini, G. 2007. Rapid

dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum β -lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8): 2720-2725.

Pana, M. 2012. Antibiotic Resistant Bacteria – A Continuous Challenge in the New Millennium. InTech. Croacia.

Paterson, D. y Bonomo, R. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4): 657-686.

Pérez, F., Endimiani, A., Hujer, K.M., Bonomo, R.A. 2007. The continuing challenge of ESBLs. *Current Opinion in Pharmacology* 7: 459-469.

Pitout, J. y Laupland, K. 2008. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases* 8 (3): 159-166. Doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.

Poirel, L., Naas, T. y Nordmann, P. 2008. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infections*, 14 (5): 21-14.

Pommerville, J. 2011. Alcamo's Fundamentals of Microbiology. Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts, EE.UU.

- Reinert, R., Low, D., Rossi, F., Zhang, X., Wattal, C. y Dowzicky, M. 2007. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(5): 1018-1029.
- Rodriguez-Bano, J. y Navarro, M. 2006. Bacteremia due to extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clinical Infectious Diseases* 43 (11): 1407-14.
- Salles, M., Zurita, J., Mjía, C. y Villegas, M. 2013. Resistant Gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America. *Epidemiology and Infection*, 141(12): 2459-2472.
- Sarria, J., Vidal, A. y Kimbrough, R. 2001 Infections caused by *Kluyvera* species in humans. *Clinical Infectious Diseases*, 33(7): e69-e74.
- Sennati, S., Santella, G., Di Conza, J., Pallencchi, L., Pino, M., Ghiglione, B., Rossolini, G., Radice, M. y Gutkind, G. 2012. Changing epidemiology of extended-spectrum β -lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11): 6003-6005.
- Seki, L., Pereira, P., de Souza, M., Souza, M. Marques, E., Caballido, J., de Carvalho, M., Assr, A. y Asensi, M. 2013. Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de

Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 17(6): 640-646.

Silva, J., Garza, J., Reyna, F., Sánchez, A., Rojas, T., Andrade, V., Pastrana, J., Castro, J., Vinueza, P. y Barros, H. 2011. Extended-spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Causing Nosocomial Infections in Mexico. A Retrospective and Multicenter Study. *Archives of medical research* 42 (2): 156-162.

Shlaes, D. 2010. *Antibiotics: The Perfect Storm*. Springer, Stonington, EE.UU.

Sidjabat, H., Kamolvit, W., Wailan, A. y Paterson, D. 2013. Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria. *Microbiology Australia*, 34(1): 43-46.

Villegas, M., Correa, A., Pérez, F., Zuluaga, T., Radice, M., Gutkind, G., Casellas, J., Ayala, J., Lolans, K. y Quinn, J. 2004. CTX-M-12 β -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(2): 629-631.

Villegas, M., Kattan, J., Quinteros, M. y Casellas, J. 2008. Prevalence of extended- spectrum β - lactamases in South America. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(s1): 154-158.

Walsh, C. 2003. *Antibiotics: actions, origins, resistance*. AMS Press, Washington, EE.UU.

- Wax, R., Lewis, K., Salyers, A. y Taber, H. 2007. Bacterial resistance to antimicrobials. CRC Press, New York, EE.UU.
- Weber, J. y Karger, S. 2010. Antimicrobial Resistance: Beyond the Breakpoint. Karger, Suiza.
- Willson, M. 2008. Bacteriology of Humans. Blackwell Publishing, Malden, EE.UU.
- Yu, Y., Ji, S., Chen, Y., Zhou, W., Wei, Z., Li, L. y Ma, Y. 2007. Resistance of strains producing extended-spectrum β -lactamases and genotype distribution in China. *Journal of Infection*, 54(1): 53-57.
- Zurita, J. 2012. Resistencia Bacteriana en el Ecuador. Centro de Publicaciones PUCE. Quito, Ecuador.

9. FIGURAS

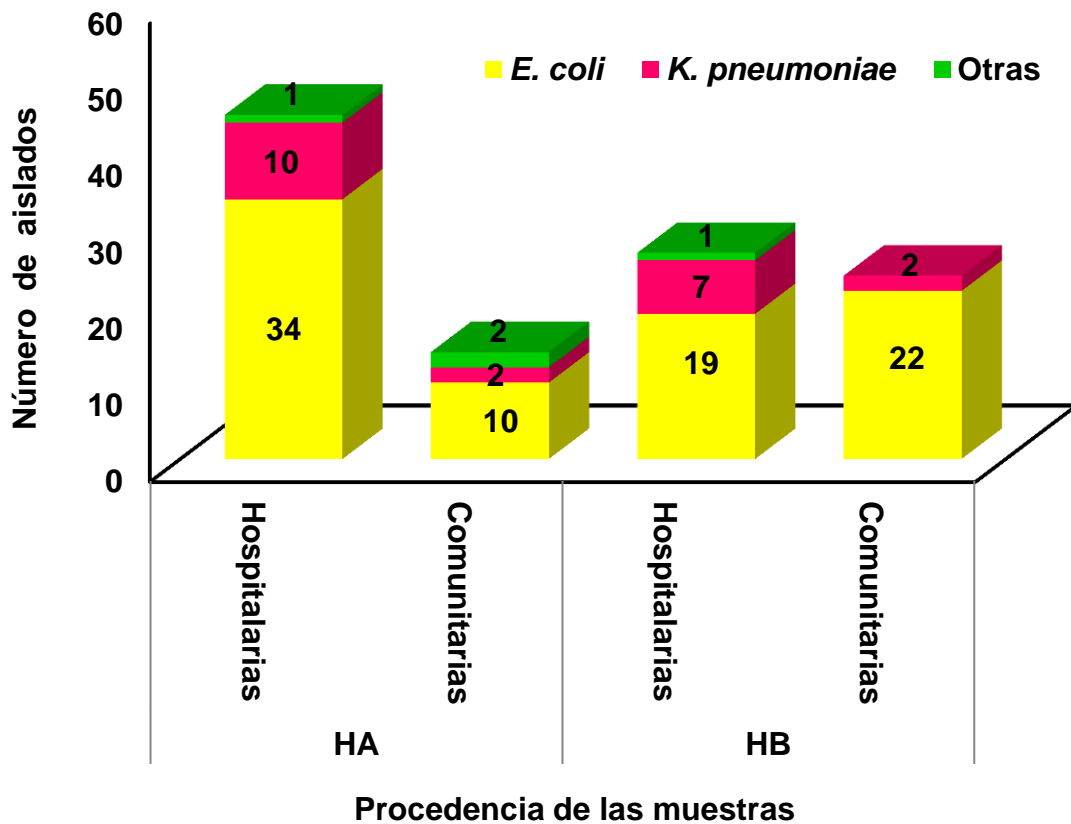


Figura 1. Frecuencia de aislados por procedencia; Hospital A (Hospitalarios, Comunitarios) y por especie (*E. coli*, *K. pneumoniae* y otras bacterias). 59/110 aislados pertenecen a Hospital A; hospitalarios (*E. coli*= 34, *K. pneumoniae*= 10, otras= 1), comunitarios (*E. coli*= 10 y *K. pneumoniae*= 2, otras= 2). 51/110 aislados pertenecen a Hospital B; hospitalarios (*E. coli*= 19, *K. pneumoniae*= 7, otras= 1), comunitarios (*E. coli*= 22 y *K. pneumoniae*= 2)

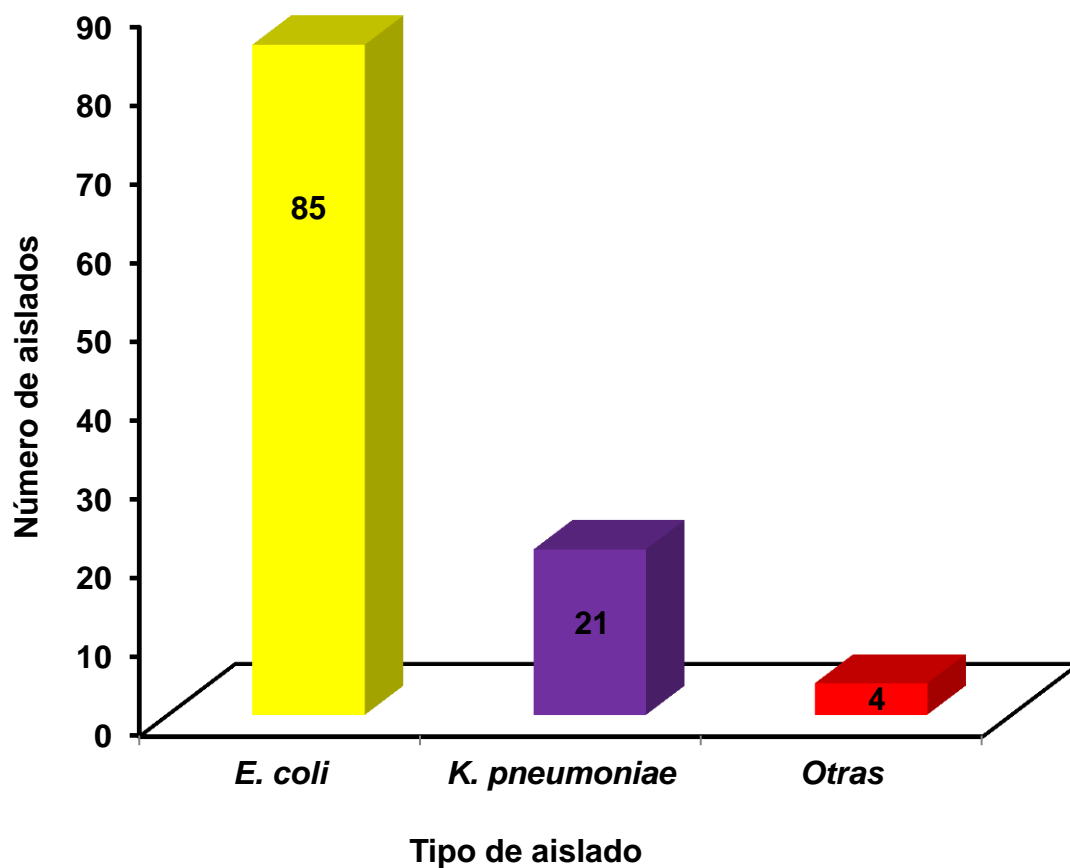


Figura 2 Frecuencia de bacterias entéricas halladas en los 110 aislados en análisis. *E. coli*, 85/110 (77,3 %); *K. pneumoniae*, 21/110 (19,1 %); Otras bacterias (*Citrobacter freundii*, *Serratia liquefacien*, *Enterobacter cloacae* y *Morganella morganii*), 4/110 (3,6 %)

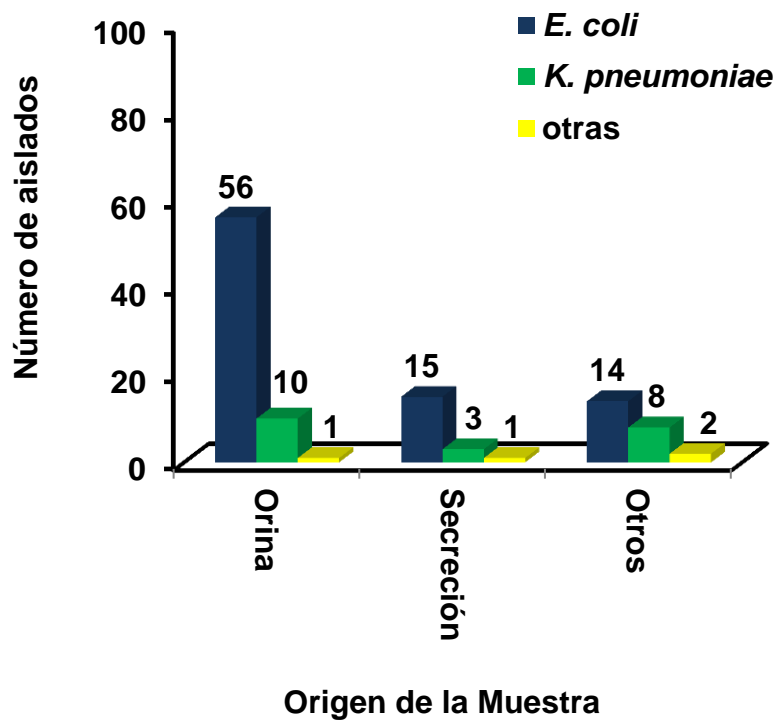


Figura 3 Gráfico representativo sobre frecuencia de aislados por procedencia y bacteria entérica portadora. De los 110 aislados: 67 provienen de muestras de orina (*E. coli*= 56/110 (50,9 %) , *K. pneumoniae*= 10/110 (9,1 %), otras= 1/110 (0,9 %); 19 provienen de algún tipo de secreción (*E. coli*= 15/110 (13,6 %), *K. pneumoniae*= 3/110 (2,7 %), otras= 1/110 (0,9 %) y 24 tienen otro tipo de procedencia (*E. coli*= 14/110 (12,7 %), *K. pneumoniae*= 8/110 (7,3 %) , otras= 2/110 (1,8 %)

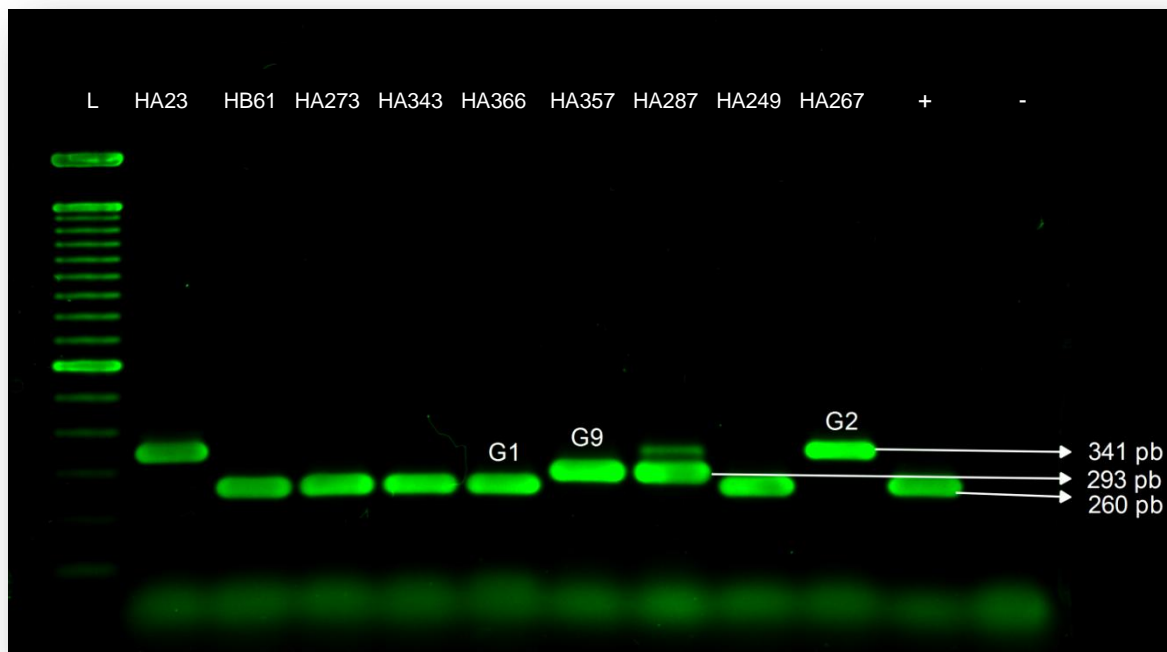


Figura 4 Gel representativo de los grupos genéticos tipo CTX-M G1, CTX-M G2, CTX-M G9 presentes en la población. L, marcador de peso molecular (100pb); HA23, HB61, HA273, HA343, HA366, HA357, HA159, HA249 y HA267, son cepas en análisis provenientes del Hospital A (HA) y el Hospital B (HB); +, control positivo; -, control negativo, G1; 260pb, G9; 293 y G2; 341, grupos genéticos

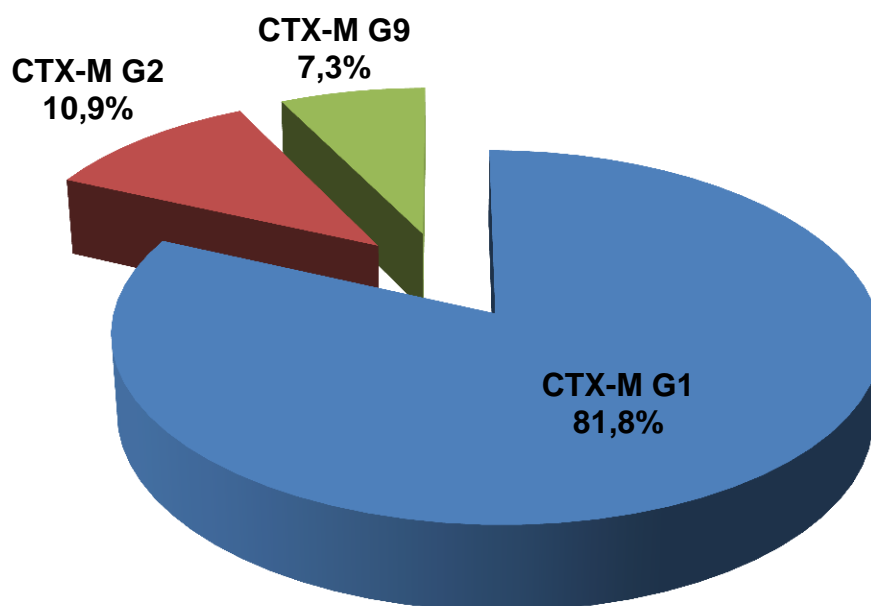


Figura 5 Frecuencia de los grupos tipo CTX-M G1, CTX-M G2, CTX-M G9 en la población. CTX-M G1, 90/110 (81,8 %); CTX-M G2, 11/110 (10,9 %); CTX-M G9, 8/110 (7,3 %).

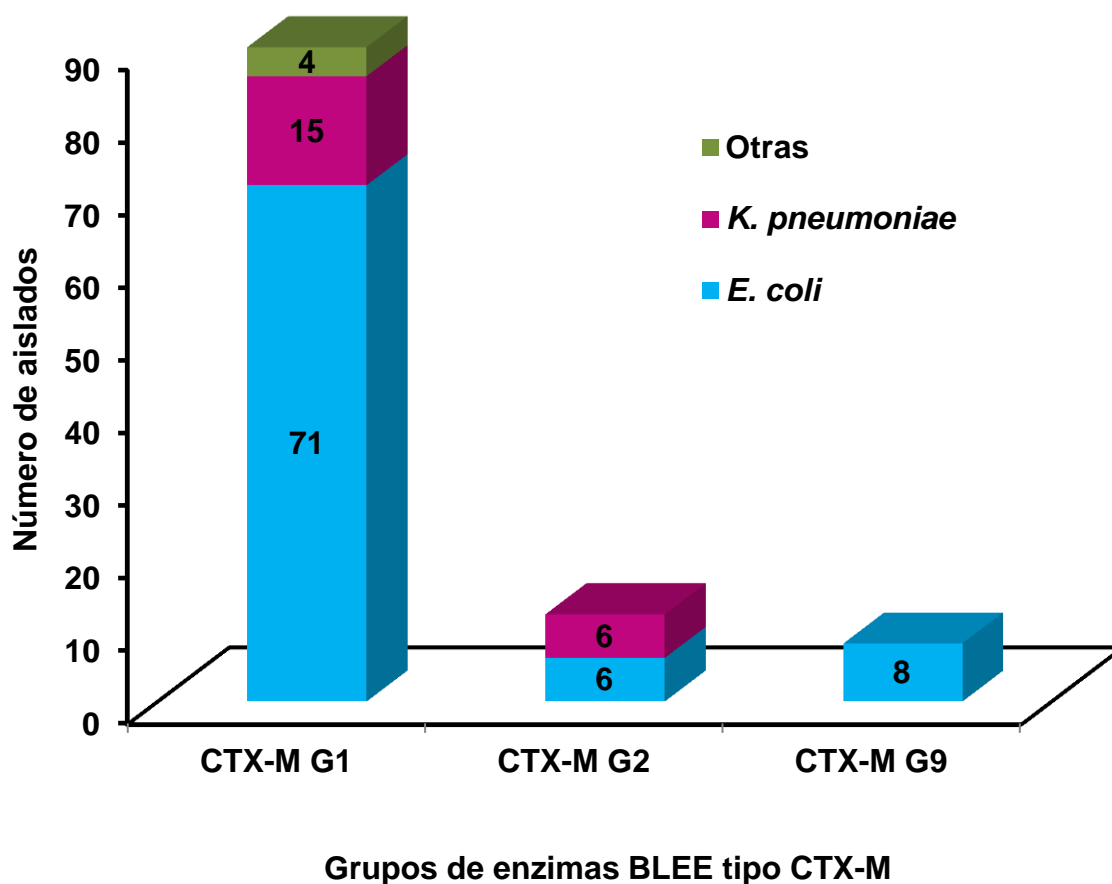


Figura 6 Frecuencias de aislados entéricos por cada grupo de enzimas betalactamasas tipo CTX-M. CTX-M G1; *E. coli* 71/110 (64,5 %); *K. pneumoniae* 15/110 (13,6 %); Otras 4/110 (3,6 %). CTX-M G2; *E. coli* 6/110 (5,5 %); *K. pneumoniae* 6/110 (5,5 %). CTX-M G9; *E. coli* 8/110 (7,3 %)

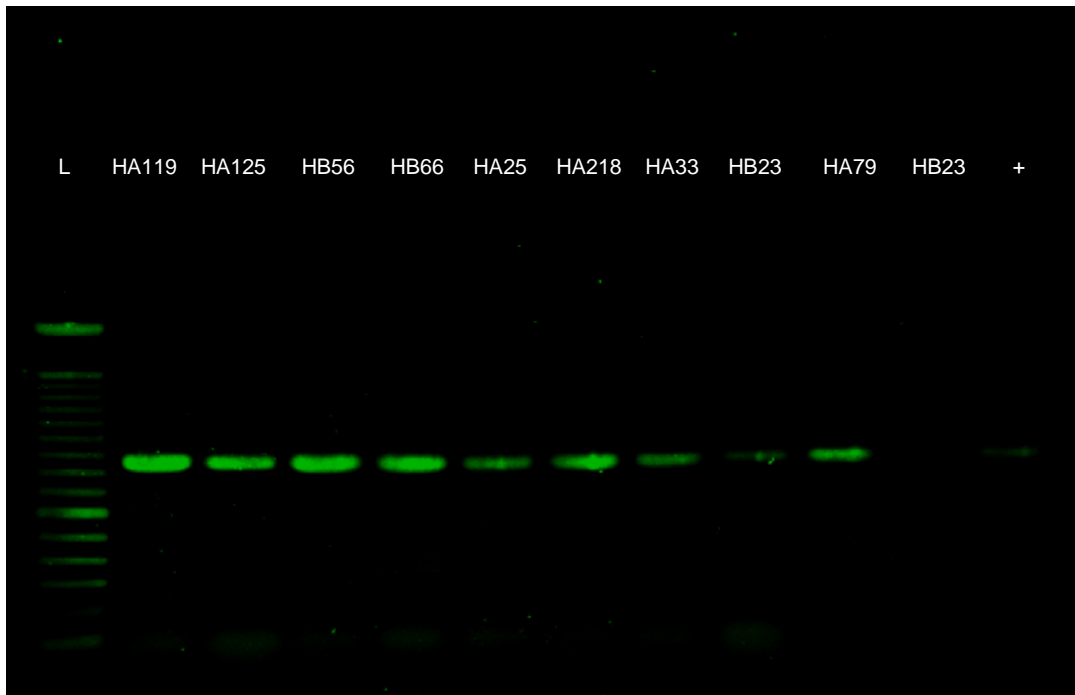


Figura 7 Gel representativo que muestra presencia – ausencia del grupo CTX-M G1 en aislados clínicos. L, marcador de peso molecular (100pb); HA119, HA1125, HB56, HB66, HA218, HA33, HB23, +, son aislados clínicos provenientes del Hospital A (HA) y el Hospital B (HB); +, control positivo; -, control negativo. El peso molecular del amplificado es de 874 pb como se muestra en la figura.



Figura 8 Gel representativo que muestra presencia – ausencia del grupo **CTX-M G2 en aislados clínicos**. L, marcador de peso molecular (100pb); HA42, HA13, HA62, HB66, HB14, HA78, HA5, HA21, HA13, +, -, son aislados clínicos provenientes del Hospital A (HA) y el Hospital B (HB); +, control positivo; -, control negativo. El peso molecular del amplificado es de 874 pb como se muestra en la figura



Figura 9 Gel representativo que muestra presencia – ausencia del grupo CTX-M G9 en aislados clínicos. L, marcador de peso molecular (100pb); HA125, HA153, HA155, HA159, HA244, HA287, -, HA366, HB28 y HA30 son aislados clínicos provenientes del Hospital A (HA) y el Hospital B (HB); +, control positivo; -, control negativo. El peso molecular del amplificado es de 856 pb como se muestra en la figura.

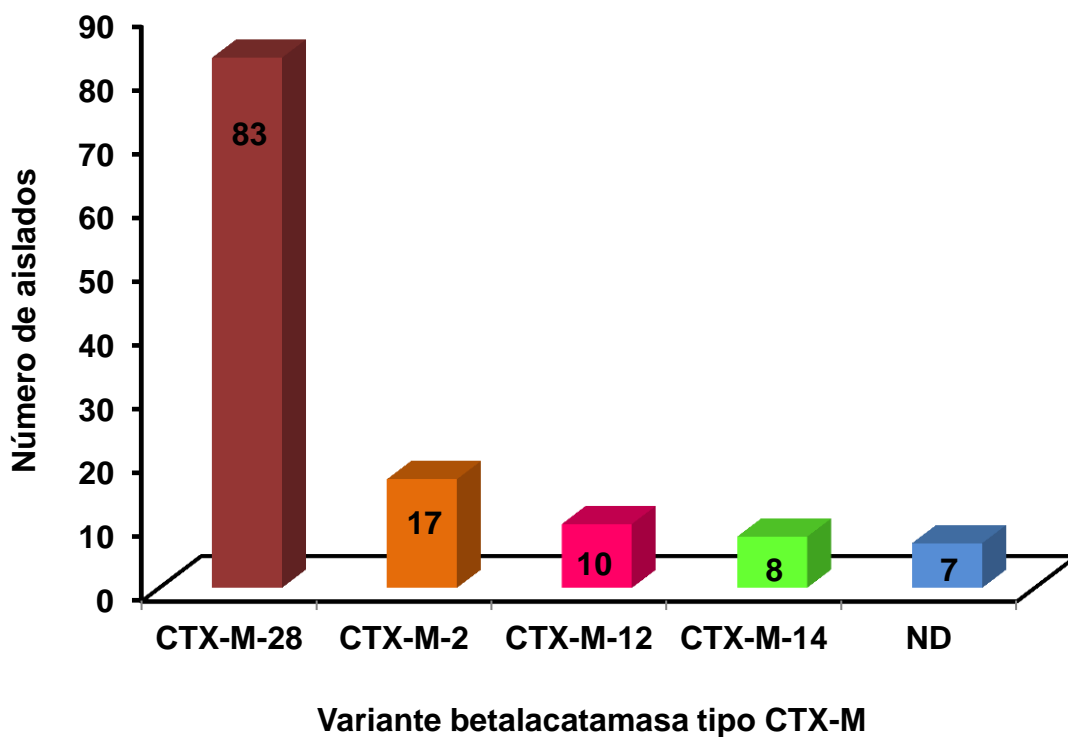


Figura 10 Frecuencia de las enzimas betalactamasas tipo CTX-M. En 110 aislados, CTX-M-28, 83/103 (66,4 %); CTX-M-2, 17/110 (13,6 %); CTX-M-12, 10/103 (8,0 %); CTX-M-14, 8/103 (6,4 %) y no definidos 7/110

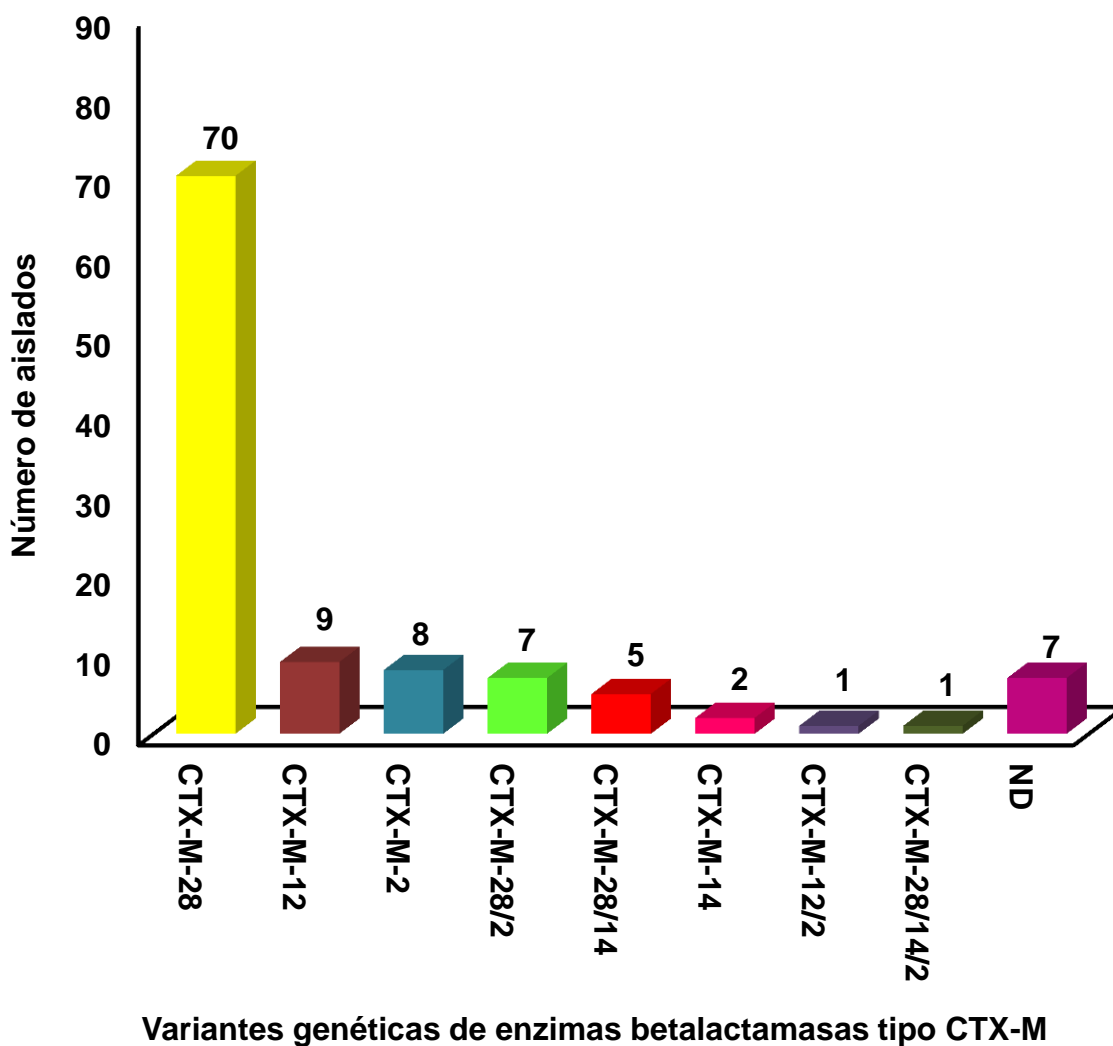
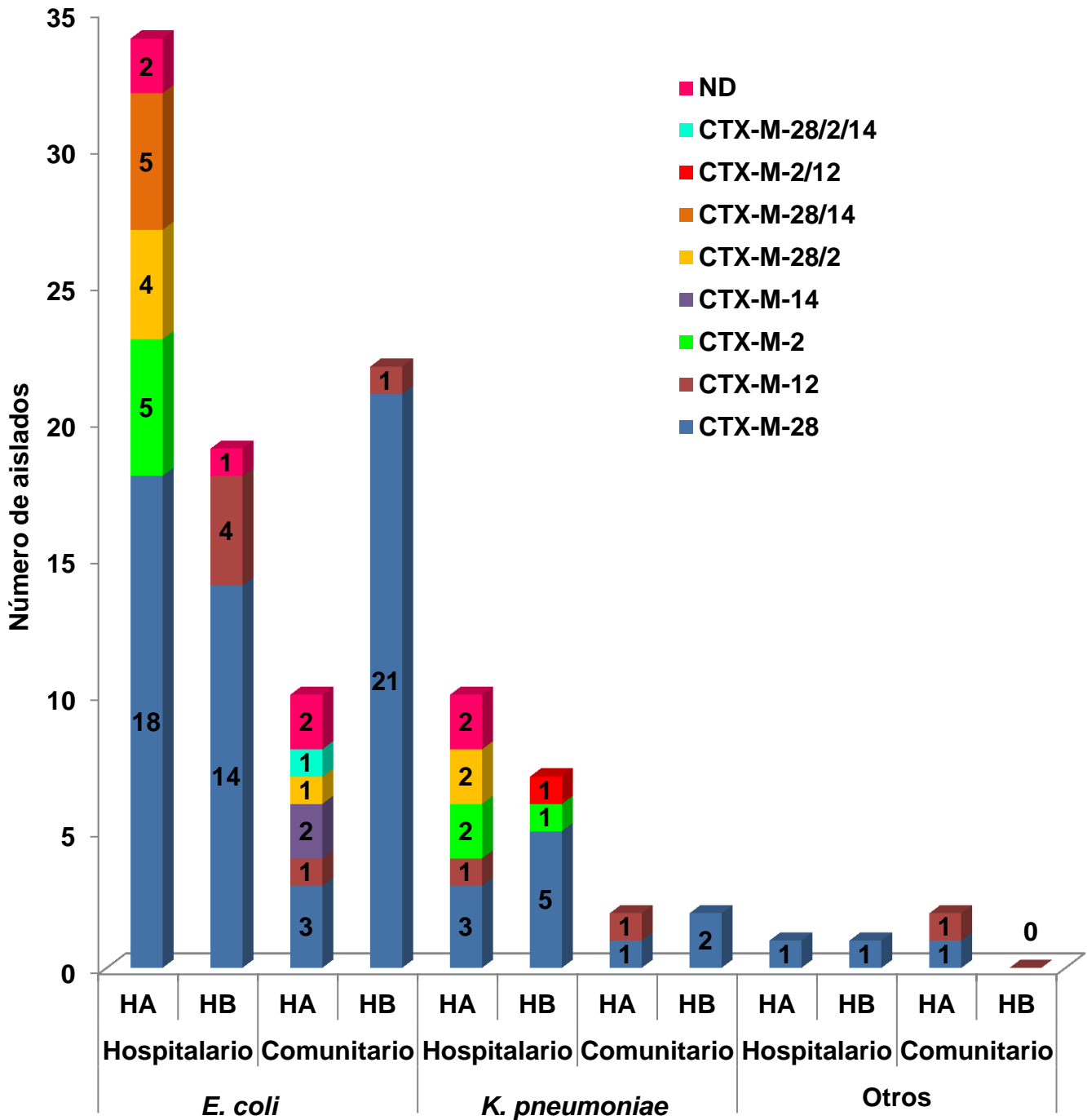


Figura 11 Frecuencia de variantes génicas de enzimas betalactamasas tipo CTX-M en aislados clínicos. CTX-M-28, 70/110 (63,6 %); CTX-M-12, 9/110 (8,2 %), CTX-M-2, 8/110 (7,3 %); CTX-M-28/2 7/110 (6,4 %); CTX-M-28/14, 5/110 (4,5 %); CTX-M-14, 2/110 (1,8 %), CTX-M-12/2, 1/110 (0,9 %) y CTX-M-28/14/2, 1/110 (0,9 %) y No definidos (ND), 7/110 (6,4 %)



Aislados analizados por hospital y por procedencia

Figura 12 Comparación en la frecuencia de enzimas betalactamasas CTX-M agrupadas por especie, hospital; (HA, HB), procedencia; hospitalarias, comunitarias y variante genética. 34/110 aislados son

E. coli, HA, hospitalarios (CTX-M-28=18, CTX-M-2=5, CTX-M-28/2=4, CTX-M-28/14=5, ND=2); 10/110 aislados son *E. coli*, HA comunitarios (CTX-M-28=3, CTX-M-12=1, CTX-M-14=2, CTX-M-28/2=1, CTX-M-28/2/14=1, ND=2).

18/110 aislados son *E. coli*, HB, hospitalarios (CTX-M-28=14, CTX-M-12=4, ND=2); 22/103 aislados son *E. coli*, HB, comunitarios (CTX-M-28=21, CTX-M-12=1).

10/110 aislados son *K. pneumoniae*, HA, hospitalarios (CTX-M-28=3, CTX-M-12=1, CTX-M-2=2, CTX-M-28/2=2, ND=2); 2/103 aislados son *K. pneumoniae*, HA, comunitarios (CTX-M-28=1, CTX-M-12=1).

7/110 aislados son *K. pneumoniae*, HB, hospitalarios (CTX-M-28=5, CTX-M-2=1, CTX-M-12/2=1); 2/110 aislados son *K. pneumoniae*, HB, comunitarios (CTX-M-28=2).

4/110 aislados pertenecen a otras bacterias, HA, hospitalarios (CTX-M-28=1); 2/110 aislados pertenecen a otras bacterias, HA, comunitarios (CTX-M-28=1, CTX-M-12=1). 1/110 aislados pertenece a, HB, hospitalarios (CTX-M-28=1)

CTX-M-12	MVKKSLRQFTLMATAAVTLLLGSVPLYAQTADVQQKLAELERQSGGRLGVALINTADNSQ	60
CTX-M-28	MVKKSLRQFTLMATAIVTLLLGSVPLYAQTADVQQKLAELERQSGGRLGVALINTADNSQ	60
CTX-M-12	ILYRADERFAMCSTSKVMAAAVLKKSESEPSLLNQRVEIKKSDLVNYNPIAEKHVNGTM	120
CTX-M-28	ILYRADERFAMCSTSKVMAAAVLKKSESEPNLLNQRVEIKKSDLVNYNPIAEKHVNGTM	120
CTX-M-12	SLAELSAAALQYSDNVAMNKLIAHVGGPASVTAFARQLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDP	180
CTX-M-28	SLAELSAAALQYSDNVAMNKLIAHVGGPASVTAFARQLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDP	180
CTX-M-12	RDTTSPRAMAQTLRNLTGKALGDSQRAQLVTWMKGNTTGAASIQAGLPASWVVGDKTGS	240
CTX-M-28	RDTTSPRAMAQTLRNLTGKALGDSQRAQLVTWMKGNTTGAASIQAGLPASWVVGDKTGS	240
CTX-M-12	GDYGTNDIAVIWPKDRAPLILVYFTQPQPKAESRRDILASAAKIVTIGL	291
CTX-M-28	GGYGTNDIAVIWPKDRAPLILVYFTQPQPKAESRRDVLASAAKIVTINGL	291

Figura 13. Comparación de las secuencias aminoacídicas de las variantes tipo *bla*_{CTX-M-28} y *bla*_{CTX-M-12}. Las dos variantes pertenecen al mismo grupo genético tipo CTX-M G1, en rojo se observan los aminoácidos en los que difieren cada una de estas variantes; A, Alanina; T, Treonina; S, Serina; N, Asparagina; I, Isoleucina; V, Valina y D, Ácido aspártico.

CTX-M-12	MVKKSLRQFTLMATAAVTLLLGSVPLYAQTADVQOKLAELERQSGGRLGVALINTADNSQ	60
CTX-M-28	MVKKSLRQFTLMATAAVTLLLGSVPLYAQTADVQOKLAELERQSGGRLGVALINTADNSQ	60
CTX-M-2	MMTQSIIRRSMLTVMATLPLLFSSATLHAQANSVQQQLEALEKS SGGRLGVALINTADNSQ	60
CTX-M-14	MVTKRVQRMMFAAAACIPLLLGSAPLYAQTSAVQOKLAALEKS SGGRLGVALINTADNTQ	60
CTX-M-12	ILYRADERFAMCSTSKVMAAA AVLKKSESEPNLLNQRVEIKKSDLVNYNPIAEKHVNGTM	120
CTX-M-28	ILYRADERFAMCSTSKVMAAA AVLKKSESEPNLLNQRVEIKKSDLVNYNPIAEKHVNGTM	120
CTX-M-2	ILYRADERFAMCSTSKVMAAA AVLKQSESDKHLLNQRVEIKKSDLVNYNPIAEKHVNGTM	120
CTX-M-14	VLYRGDERFPMCSTSKVMAAA AVLKQSETQKQLLNQFVEIKPADLVNYNPIAEKHVNGTM	120
CTX-M-12	SLAELSAAALQYSDNVAMNKLIAHVGGPASVTAFARQLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDP	180
CTX-M-28	SLAELSAAALQYSDNVAMNKLIAHVGGPASVTAFARQLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDP	180
CTX-M-2	TLAELGAAALQYSDNTAMNKLIAHLGGPDKVTAFARSLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDP	180
CTX-M-14	TLAELSAAALQYSDNTAMNKLIAQLGGPGGVTAFARAI GDETFRLDRTEPTLNTAIPGDP	180
CTX-M-12	RDTTSPRAMAQTLRNLTLGKALGDSQRAQLVTWMKGNTTGAASIQAGLPASWVVGDKTGS	240
CTX-M-28	RDTTSPRAMAQTLRNLTLGKALGDSQRAQLVTWMKGNTTGAASIQAGLPASWVVGDKTGS	240
CTX-M-2	RDTTTPRAMAQTLKLNLTGKALAETQRAQLVTWLKGNTTGSASIRAGLPKSWVVGDKTGS	240
CTX-M-14	RDTTTPRAMAQTLRQLTLGHALGETQRAQLVTWLKGNTTGAASIRAGLP TSWTVGDKTGS	240
CTX-M-12	G DYGTTNDIAVIWPKDRAPLILVITYFTQPQPKAESRRDILASAAKIVT DGL	291
CTX-M-28	GGYGTTNDIAVIWPKDRAPLILVITYFTQPQPKAESRRDILASAAKIVT DGL	291
CTX-M-2	G DYGTTNDIAVIWPENHAPLVLVITYFTQPEQKAESRRDILAAAAKIVTHGF	291
CTX-M-14	G DYGTTNDIAVIWPGRAPLVLVITYFTQPQQAESRRDVLASAARI IAEGL	291

Figura 14 Comparación de las secuencias aminoacídicas de las variantes tipo *bla*_{CTX-M} halladas en este estudio. En amarillo se puede observar la similitud de aminoácidos que comparten las tres variantes y los que no se hallan resaltados representan aquellos aminoácidos en los que divergen.

10. TABLAS

Tabla 1. Cebadores empleados para la amplificación de genes tipo *bla*_{CTX-M}

Cebador	Secuencia	Blanco	Amplicón	Referencia
CTXM7-F CTXM8-R	GCG TGA TAC CAC TTC ACC TC TGA AGT AAG TGA CCA GAA TC	<i>bla</i> _{CTX-M}	260 pb	Xu <i>et al.</i> , 2005
CTXM17-F CTXM18-R	TGA TAC CAC CAC GCC GCT C TAT TGC ATC AGA AAC CGT GGG	<i>bla</i> _{CTX-M}	341 pb	Xu <i>et al.</i> , 2005
CTXM19-F CTXM20-R	CAA TCT GAC GTT GGG CAA TG ATA ACC GTC GGT GAC AAT T	<i>bla</i> _{CTX-M}	207 pb	Xu <i>et al.</i> , 2005
CTXM11-F CTXM12-R	ATC AAG CCT GCC GAT CTG GTT A GTA AGC TGA CGC AAC GTC TGC	<i>bla</i> _{CTX-M}	293 pb	Xu <i>et al.</i> , 2005
CTXM-F3 CTXM-R3	SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA CGC CRA TAT GRT TGG TGG TG	<i>bla</i> _{CTX-M}	> 1000 pb	Barl <i>et al.</i> , 2012
CTXM-G2F CTXM-G2R	ATG ATG ACT CAG AGC ATT CG TTA TTG CAT CAG AAA CCG TG	<i>bla</i> _{CTX-M}	886 pb	Canton <i>et al.</i> , 2001
CTXM-G9F CTXM-G9R	ATGGTGACAAAGAGAGTGA CCCTTCGGCGATGATTCTC	<i>bla</i> _{CTX-M}	874 pb	Canton <i>et al.</i> , 2001
CTX-M-G1F CTX-M-G1R	GGTTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	<i>bla</i> _{CTX-M}	876 pb	Canton <i>et al.</i> , 2001

Tabla 2. Programa de PCR para amplificación de los grupos CTX-M G2, CTX-M G9 y CTX-M G1

Programa	CTX-M-G2		CTX-M-G9		CTX-M-G1	
	Temp.	Tpo.	Temp.	Tpo.	Temp.	Tpo.
Denaturación Inicial	95,0 °C	10 min	94,0 °C	5 min	94,0 °C	6 min
Programa cíclico	42 ciclos		32 ciclos		30 ciclos	
Denaturación	95,0 °C	50 s	94,0 °C	45 s	94,0 °C	30 s
Hibridización	61,9 °C	1,30 min	55,0 °C	45 s	54,0 °C	30 s
Extensión	72,0 °C	2 min	72,0 °C	1 min	72,0 °C	30 s
Extensión Final	72,0 °C	5 min	72,0 °C	5 min	72,0 °C	7 min

Tabla 3. Origen de los aislados hospitalarios utilizados en este estudio

CÓDIGO PUCE	NÚMERO DEL CULTIVO	SEXO	IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	ORIGEN DE LA MUESTRA	FECHA DE COLECCIÓN
HA 005	34	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	01/06/2009
HA 013	127	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	05/06/2009
HA 015	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>	Orina	05/06/2009
HA 016	184	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	03/06/2009
HA 017	195	F	<i>Citrobacter freundii</i>	Orina	04/06/2009
HA 021	ND	ND	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	08/06/2009
HA 023	225	F	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	10/06/2009
HA 025	232	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	12/06/2009
HA 032	249	F	<i>Escherichia coli</i>	Absceso abdominal	03/06/2009
HA 033	262	F	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Herida de muslo izquierdo	03/06/2009
HA 041	290	M	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	04/06/2009
HA 042	296	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	04/06/2009
HA 046	338	F	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	04/06/2009
HA 053	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>	Orina	08/06/2009
HA 062	541	M	<i>Escherichia coli</i>	Orina	09/06/2009
HA 065	586	F	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	09/06/2009
HA 077	447	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	08/06/2009
HA 078	ND	ND	<i>Escherichia coli</i> Ind (-)	Secreción Muslo	08/06/2009
HA 079	763	M	<i>Escherichia coli</i>	Úlcera	10/06/2009
HA 094	933	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	12/06/2009
HA 096	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>	Orina	12/06/2009
HA 119	308	M	<i>Escherichia coli</i>	Colección Intra abdominal	04/06/2009
HA 122	978	F	<i>Escherichia coli</i> BLEE	Orina	15/06/2009
HA 125	1005	M	<i>Escherichia coli</i> BLEE	Orina	15/06/2009
HA 153	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>	Orina	19/06/2009
HA 154	1343	M	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	19/06/2009
HA 155	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>	Orina	22/06/2009
HA 159	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>	Orina	03/07/2009
HA 164	147	ND	<i>Escherichia coli</i>	Hisopado Rectal	ND
HA 169	362	ND	<i>Escherichia coli</i>	Gastrostomía	ND
HA 172	538	ND	<i>Escherichia coli</i>	Orina	ND
HA 174	625	ND	<i>Escherichia coli</i>	Hisopado	ND
HA 192	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>	Orina	13/07/2009
HA 194	810	M	<i>Escherichia coli</i>	Secreción Inguinal	13/07/2009

Tabla 3. Origen de los aislados hospitalarios utilizados en este estudio
(Continuación...)

CÓDIGO PUCE	NÚMERO DEL CULTIVO	SEXO	IDENTIFICACIÓN PUCE	ORIGEN DE LA MUESTRA	FECHA DE COLECCIÓN
HA 197	841	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	13/07/2009
HA 210	ND	ND	ND	Orina	15/07/2009
HA 218	1072	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	16/07/2009
HA 225	ND	ND	<i>Escherichia coli</i> Ind (-)	Orina	20/07/2009
HA 232	1220	M	<i>Escherichia coli</i>	Orina	20/07/2009
HA 241	1091	M	<i>Escherichia coli</i>	Orina	16/07/2009
HA 244	1263	M	<i>Escherichia coli</i>	Herida quirúrgica	20/07/2009
HA 249	1499	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	23/07/2009
HA 250	1502	M	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Canal femoral	23/07/2009
HA 251	1512	M	<i>Escherichia coli</i>	Secreción de herida	23/07/2009
HA 267	1659	F	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	27/07/2009
HA 273	ND	ND	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	28/07/2009
HA 286	1892	M	<i>Escherichia coli</i>	Líquido abdominal	29/07/2009
HA 287	1893	M	<i>Escherichia coli</i>	Prótesis de Gorotex	29/07/2009
HA 288	ND	ND	<i>Serratia liquefacien</i>	Secreción de herida	29/07/2009
HA 325	302	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	06/08/2009
HA 335	ND	ND	<i>Enterobacter cloacae</i>	Catéter	07/08/2009
HA 341	707	M	<i>Escherichia coli</i>	Secreción Dren	11/08/2009
HA 343	859	M	<i>Escherichia coli</i>	Orina	13/08/2009
HA 344	889	M	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Escara	13/08/2009
HA 345	891	M	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Escara	13/08/2009
HA 356	1025	F	<i>Escherichia coli</i>	Secreción	17/08/2009
HA 357	1043	M	<i>Escherichia coli</i>	Secreción Dren	17/08/2009
HA 358	1050	F	<i>Escherichia coli</i>	Secreción Dren	17/08/2009
HA 366	1104	F	<i>Escherichia coli</i> Ind (-)	Secreción abdominal	18/08/2009
HB 001	O749	F	<i>Escherichia coli</i>	Secreción de oído	21/05/2009
HB 002	32	F	<i>Escherichia coli</i>	Secreción pie izquierdo	01/06/2009
HB 003	177	M	<i>Escherichia coli</i>	Líquido Abdominal	05/06/2009
HB 004	259	F	<i>Escherichia coli</i> Ind (-)	Orina	07/06/2009
HB 005	281	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	08/06/2009
HB 007	68	M	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	02/06/2009
HB 009	309	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	08/06/2009

Tabla 3. Origen de los aislados hospitalarios utilizados en este estudio
(Continuación...)

CÓDIGO PUCE	NÚMERO DEL CULTIVO	SEXO	IDENTIFICACIÓN PUCE	ORIGEN DE LA MUESTRA	FECHA DE COLECCIÓN
HB 010	O339	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	09/06/2009
HB 012	54	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	02/06/2009
HB 014	ST 662	M	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secreción Bronquial	17/06/2009
HB 015	718	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	18/06/2009
HB 019	115	M	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	03/06/2009
HB 022	1043	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	27/06/2009
HB 024	1096	M	<i>Escherichia coli</i>	Secreción Escotal	29/06/2009
HB 025	188	M	<i>Escherichia coli</i>	Orina	29/06/2009
HB 026	O19	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	01/07/2009
HB 027	229	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	07/07/2009
HB 028	333	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	09/07/2009
HB 030	648	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	18/07/2009
HB 033	1009	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	28/07/2009
HB 035	1072	F	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hemocultivo	29/07/2009
HB 036	1160	M	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hemocultivo	31/07/2009
HB 037	728	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	21/07/2009
HB 038	826	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	23/07/2009
HB 039	837	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	23/07/2009
HB 040	1149	M	<i>Escherichia coli</i>	Secreción pierna derecha	30/07/2009
HB 041	303	F	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Espujo	08/08/2009
HB 042	349	M	<i>Escherichia coli</i>	Secreción traqueal	11/08/2009
HB 043	644	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	19/08/2009
HB 045	689	ND	<i>Escherichia coli</i>	Orina	20/08/2009
HB 047	814	M	<i>Escherichia coli</i>	Líquido ascítico	24/08/2009
HB 049	799	M	<i>Escherichia coli</i>	Espujo	12/08/2009
HB 050	1078	M	<i>Escherichia coli</i>	Hemocultivo	13/08/2009
HB 052	963	F	<i>Escherichia coli</i>	Secreción traqueal	25/08/2009
HB 056	23	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	31/08/2009
HB 057	19	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	01/09/2009
HB 058	119	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	03/09/2009
HB 059	52	F	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secreción traqueal	03/09/2009
HB 061	173	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	05/10/2009

Tabla 3. Origen de los aislados hospitalarios utilizados en este estudio
(Continuación)

CÓDIGO PUCE	NÚMERO DEL CULTIVO	SEXO	IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	ORIGEN DE LA MUESTRA	FECHA DE COLECCIÓN
HB 063	258	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	07/09/2009
HB 064	311	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	08/09/2009
HB 065	389	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	17/09/2009
HB 066	592	F	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secreción traqueal	15/09/2009
HB 067	657	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	16/09/2009
HB 071	786	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	19/09/2009
HB 072	819	F	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Herida abdomen	20/09/2009
HB 073	844	F	<i>Escherichia coli</i>	Secreción traqueal	21/09/2009
HB 074	860	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	25/08/2009
HB 075	954	F	<i>Escherichia coli</i>	Orina	23/09/2009
HB 076	1208	F	<i>Escherichia coli</i>	Herida quirúrgica	30/09/2009
HB 077	521L	F	<i>Morganella morganii</i>	Úlcera de talón	14/06/2010

Col, Colección; F, Femenino; Ind (-), Indol negativo; M, Masculino; ND, no definido.

Tabla 4 Información genética sobre las 131 cepas analizadas, grupo de betalactamasas tipo CTX-M y variante alélica

CÓDIGO PUCE	PROCEDENCIA	BETALACTAMASA TIPO CTX-M	VARIANTE DEL GEN <i>bla</i>_{CTX-M}
HA 005	hospitalaria	G1	0
HA 013	hospitalaria	G2	CTX-M-2
HA 015	comunitaria	G1	CTX-M-28
HA 016	hospitalaria	G1	CTX-M-28/2
HA 017	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 021	comunitaria	G1	CTX-M-28
HA 023	hospitalaria	G2	CTX-M-28/2
HA 025	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 032	hospitalaria	G2	CTX-M-2
HA 033	hospitalaria	G1	0
HA 041	hospitalaria	G2	CTX-M-2
HA 042	hospitalaria	G2	CTX-M-2
HA 046	hospitalaria	G2	CTX-M-2
HA 053	comunitaria	G1	CTX-M-28
HA 062	hospitalaria	G2	CTX-M-2
HA 065	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 077	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 078	comunitaria	G1	CTX-M-28/2
HA 079	hospitalaria	G1	CTX-M-28/2
HA 094	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 096	comunitaria	G1	CTX-M-12
HA 119	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 122	hospitalaria	G2	CTX-M-2
HA 125	hospitalaria	G9	CTX-M-28/14
HA 153	comunitaria	G9	CTX-M-14
HA 154	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 155	comunitaria	G9	CTX-M-14
HA 159	comunitaria	G9	CTX-M-28/2/14
HA 164	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 169	hospitalaria	G1	CTX-M-28/2
HA 172	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 174	hospitalaria	G2	C-M-28
HA 192	comunitaria	G1	CTX-M-28

Tabla 4 Información genética sobre las 131 cepas analizadas, grupo de betalactamasas tipo CTX-M y variante alélica (Continuación...)

CÓDIGO PUCE	PROCEDENCIA	BETALACTAMASA TIPO CTX-M	VARIANTE DEL GEN <i>bla</i>_{CTX-M}
HA 194	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 197	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 210	comunitaria	G1	0
HA 218	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 225	comunitaria	G1	0
HA 232	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 241	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 244	hospitalaria	G9	CTX-M-28/14
HA 249	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 250	hospitalaria	G1	0
HA 251	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 267	hospitalaria	G2	CTX-M-28/2
HA 273	comunitaria	G1	CTX-M-12
HA 286	hospitalaria	G1	CTX-M-28/2
HA 287	hospitalaria	G9	CTX-M-28/14
HA 288	comunitaria	G1	CTX-M-28
HA 325	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 335	comunitaria	G1	CTX-M-12
HA 341	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 343	hospitalaria	G1	0
HA 344	hospitalaria	G1	CTX-M-12
HA 345	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 356	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 357	hospitalaria	G9	CTX-M-28/14
HA 358	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HA 366	hospitalaria	G9	CTX-M-28/14
HB 001	hospitalaria	G1	0
HB 002	hospitalaria	G1	CTX-M-12
HB 003	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 004	hospitalaria	G1	CTX-M-12
HB 005	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 007	hospitalaria	G1	CTX-M-28

Tabla 4 Información genética sobre las 131 cepas analizadas, grupo de betalactamasas tipo CTX-M y variante alélica (Continuación...)

CÓDIGO PUCE	PROCEDENCIA	BETALACTAMASA TIPO CTX-M	VARIANTE DEL GEN <i>bla</i>_{CTX-M}
HB 009	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 010	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 012	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 014	hospitalaria	G2	CTX-M-12/2
HB 015	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 019	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 022	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 024	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 025	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 026	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 027	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 028	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 030	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 033	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 035	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 036	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 037	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 038	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 039	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 040	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 041	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 042	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 043	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 045	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 047	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 049	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 050	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 052	comunitaria	G1	CTX-M-12
HB 056	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 057	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 058	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 059	hospitalaria	G1	CTX-M-28

Tabla 4 Información genética sobre las 131 cepas analizadas, grupo de betalactamasas tipo CTX-M y variante alélica (Continuación)

CÓDIGO PUCE	PROCEDENCIA	BETALACTAMASA TIPO CTX-M	VARIANTE DEL GEN <i>bla</i>_{CTX-M}
HB 061	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 063	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 064	hospitalaria	G1	CTX-M-12
HB 065	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 066	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 067	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 071	hospitalaria	G1	CTX-M-12
HB 072	hospitalaria	G2	CTX-M-2
HB 073	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 074	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 075	comunitaria	G1	CTX-M-28
HB 076	hospitalaria	G1	CTX-M-28
HB 077	hospitalaria	G1	CTX-M-28

CTX-M-2, alelo tipo *bla*_{CTX-M-2}; CTX-M-12, alelo tipo *bla*_{CTX-M-12}; G1, CTX-M G1; G2, CTX-M G2;

G9, CTX-M G9; HA, HB; -, negativo

Tabla 5 Frecuencia de enzimas tipo *bla*_{CTX-M} agrupadas por especie, hospital; (HA, HB), procedencia; hospitalarias, comunitarias y variante genética.

Variante	<i>E. coli</i>				<i>K. pneumoniae</i>				Otros			
	H		C		H		C		H		C	
	HA	HB	HA	HB	HA	HB	HA	HB	HA	HB	HA	HB
CTX-M-28	19	14	4	21	3	5	1	2	1	1	1	0
CTX-M-12	0	4	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0
CTX-M-2	5	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0
CTX-M-14	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTX-M-28/2	4	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
CTX-M-28/14	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTX-M-2/12	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTX-M-28/2/14	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

C, aislados comunitario; H, aislados hospitalarios; H, aislados hospitalarios; HA, Hospital A; HB, Hospital B

11. ANEXOS

Anexo 1 Método de purificación de ADN a través del Kit Comercial de Extracción “Wizard® Genomic DNA Purification Kit.

1. Centrifugar 1 ml de cultivo bacteriano de 18 horas de incubación por 2 minutos a 13.000 rpm y luego descartar el sobrenadante.
2. Agregar 600 µl de solución de lisis nuclear y pipetear suavemente para homogenizar.
3. Incubar por 5 minutos a 80 °C y luego enfriar a temperatura ambiente.
4. Añadir 3 µl de solución RNase, mezclar e incubar a 37 °C durante 1 hora y luego enfriar a temperatura ambiente.
5. Agregar 200 µl de solución de precipitación proteica y luego agitar en un vórtex a máxima velocidad.
6. Incubar en hielo por 5 minutos.
7. Centrifugar a 13.000 rpm por 3 minutos.
8. Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio que contenga 600 µl de isopropanol y mezclar.
9. Centrifugar como en el paso 1 y luego descartar el sobrenadante.
10. Añadir 600 µl de etanol al 70 % y mezclar.
11. Centrifugar por 2 minutos a 13.000 rpm.
12. Aspirar el etanol y secar al aire por 15 minutos.
12. Rehidratar el ADN contenido en el tubo con 100 µl de solución rehidratante a 4 °C toda la noche. Finalmente, el ADN se almacena a -20 °C como especifica el protocolo para mantenerlo en condiciones óptimas de uso.

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Andrea Lucía León Cadena, C.I. 1717792129, autora del trabajo de graduación intitulado “Determinación de variantes genéticas de enzimas betalactamasas procedentes de cepas bacterianas aisladas de centros hospitalarios” previa la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 22 de abril de 2014

Andrea Lucía León Cadena

CI. 1717792129