

**Caracterización molecular de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *Escherichia coli* extraintestinal (ExPEC) aisladas de centros hospitalarios en la ciudad de Cusco – Perú.**

**Laura Andrea González Quiroz  
Carlos Alberto Gómez Moreno**

**Director (a):  
Adriana María Del Socorro Correa Bermúdez  
Bacterióloga MSc, PhD.**

**Codirector (a):  
Elsa Gladys Aguilar Ancori  
Bióloga, MSc.**

**Universidad Santiago de Cali  
Facultad de Ciencias Básicas  
Programa de Microbiología  
Cali, Colombia  
2023**

**Caracterización molecular de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *Escherichia coli* extraintestinal (ExPEC) aisladas de centros hospitalarios en la ciudad de Cusco – Perú.**

**Laura Andrea González Quiroz  
Carlos Alberto Gómez Moreno**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:  
Microbiólogo**

**Director (a):  
Adriana María Del Socorro Correa Bermúdez  
Bacterióloga MSc, PhD.**

**Codirector (a):  
Elsa Gladys Aguilar Ancori  
Bióloga, MSc.**

**Línea de Investigación:  
Microbiología Clínica  
Grupo de Investigación:  
Grupo de Microbiología, Industria y Medio Ambiente (GIMIA)  
Universidad Santiago de Cali  
Facultad de Ciencias Básicas  
Programa de Microbiología  
Cali, Colombia  
2023**

## IMPACTOS

| IMPACTO                       | PRODUCTO   | BENEFICIARIO(S)  |
|-------------------------------|--|--|
| <b>Económico</b>              |  |  |
| <b>Responsabilidad social</b> | Ampliar el conocimiento y aportar investigaciones acerca de la resistencia antimicrobiana en una región que carece de estudios sobre la presencia de BLEE. | La ciudad de Cusco - Perú, (Laboratorios clínicos, participantes en el estudio). |
| <b>Científico</b>             | Herramientas para el control en la distribución de las cepas BLEE.   | Comunidad científica y social.   |
| <b>Indicadores de Gestión</b> |  |  |
| <b>Tecnológico</b>            |  |  |
| <b>Técnico</b>                |  |  |
| <b>Ambiental</b>              |  |  |
| <b>Social</b>                 | Conocimiento sobre la epidemiología y conciencia de la automedicación de antibióticos.   | Comunidad social.  |
| <b>Cultural</b>               |  |  |

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN CEPAS DE *E. coli* EXTRAINTestinal (ExPEC) AISLADAS DE CENTROS HOSPITALARIOS EN LA CIUDAD DE CUSCO-PERÚ

Laura Andrea González Quiroz<sup>1</sup>, Carlos Alberto Gómez Moreno<sup>1</sup>, Elsa Gladys Aguilar Ancori<sup>2</sup>, Adriana María Del Socorro Correa Bermúdez<sup>1</sup>. Grupo de investigación en Microbiología, Industria y Medio Ambiente (GIMIA).

1. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia; [laura.gonzalez05@usc.edu.co](mailto:laura.gonzalez05@usc.edu.co), [carlos.gomez11@usc.edu.co](mailto:carlos.gomez11@usc.edu.co), [adriana.correa00@usc.edu.co](mailto:adriana.correa00@usc.edu.co)
2. Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Biomedicina de Cusco de la Universidad Nacional de San Antonio de Abad del Cusco (UNSAAC). Cusco. Perú; [elsa.aguilar@unsaac.edu.pe](mailto:elsa.aguilar@unsaac.edu.pe)

## RESUMEN

El aumento de *Escherichia coli* extraintestinal (ExPEC) productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) han generado la necesidad de utilizar antibióticos de amplio espectro para su tratamiento. En Perú, la presencia de bacterias portadoras de BLEE son una problemática de salud pública, lo que se ha visto reflejado en numerosas publicaciones realizadas principalmente en Lima; pero poco se conoce sobre ExPEC-BLEE en Cusco. Por ello, el objetivo del estudio fue la caracterización de BLEE en aislados ExPEC-BLEE y sus grupos filogenéticos en hospitales de Cusco. Setenta aislados ExPEC-BLEE fueron analizados para la identificación de genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y para grupos filogenéticos (A-D), utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. Los resultados indicaron mayores proporciones en la co-expresión entre *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> (34%) y en el grupo filogenético B2 (51%) reconocidos como clones altamente virulentos. Adicionalmente se pudo identificar una correlación entre genes BLEE y los diferentes grupos filogenéticos (p-valor = 0.0099). Estos resultados permite ampliar el conocimiento sobre la epidemiología de ExPEC-BLEE en Cusco.

**Palabras clave:** BLEE, *E.coli*, ExPEC.

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASES (ESBL) IN EXTRAINTestinal *E. coli* STRAINS (ExPEC) ISOLATED FROM HOSPITALS IN THE CITY OF CUSCO-PERÚ

## ABSTRACT

The increase of extraintestinal *Escherichia coli* (ExPEC) producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) has generated the need to use broad-spectrum antibiotics for their treatment. In Perú, the presence of bacteria carrying ESBL is a public health problem and studies have been carried out especially in Lima and little is known about ExPEC-ESBL in Cusco. Therefore, the aim of the study was the characterization of ESBL in ExPEC-ESBL isolates and their phylogenetic groups in hospitals in Cusco. Seventy ExPEC-ESBL isolates were analyzed for the identification of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> genes and for phylogenetic groups (A-D), using the polymerase chain reaction. The results indicated higher proportions of co-expression between *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> (34%) and in phylogenetic group B2 (51%) recognized as highly virulent clones. Additionally, a correlation between BLEE genes and the different phylogenetic groups was identified (p-value = 0.0099). These results allow us to broaden our knowledge of the epidemiology of ExPEC-BLEE in Cusco.

**Keywords:** ESBL, *E.coli*, ExPEC

## 1. INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* (*E.coli*) es una bacteria Gram negativa que forma parte del orden *Enterobacterales* y habitan normalmente en el tracto intestinal de seres humanos y animales; aunque su funcionamiento principal en el cuerpo es mantener el sistema digestivo sano y ayudar a digerir los alimentos, ciertas cepas pueden tener efectos negativos para la salud humana debido a la gran variedad de factores de virulencia (FV) responsables de la colonización, adherencia, invasión y evasión de los mecanismos de defensa que les confieren una mayor capacidad para causar enfermedades infecciosas, dentro y fuera del intestino del huésped [1]. Las cepas de *E.coli* son genéticamente heterogéneas y las diferencias entre las comensales y patógenas se fundamentan en sus factores de virulencia por ello se clasifican como *E.coli* patógena intestinal (IPEC) y *E.coli* patógena extraintestinal (ExPEC); otra subclasificación está basada en sus antecedentes filogenéticos que las diferencia en cuatro grupos principales: A, B1, B2, D; los dos primeros se consideran de bajo poder virulento, mientras que las patógenas pertenecen principalmente a los grupos filogenéticos B2 y D [2], dentro de los cuales se encuentran los aislados ExPEC [3], siendo uno de los principales agentes causales de las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) a nivel mundial, por su impacto significativo en la morbilidad y mortalidad de la población, especialmente, en grupos vulnerables y con sistemas inmunológicos comprometidos [4].

El desafío clínico se agrava debido a que estas bacterias ExPEC pueden presentar un fenotipo multirresistente (MDR), asociado a la presencia de enzimas denominadas betalactamasas, dentro de las cuales, las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son las más prevalentes [5,6]. La característica principal de estas enzimas es que son capaces de hidrolizar las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación o de amplio espectro (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima) y a los monobactámicos (aztreonam); adicionalmente, por ser codificadas especialmente en plásmidos, vienen acompañadas de otros genes de resistencia, que generan fallas terapéuticas e infecciones del tracto urinario o bacteriemias, en donde el tratamiento es empírico [7,8].

Las BLEE son enzimas codificadas por genes de naturaleza diversa y pueden agruparse en varias familias con características únicas; entre ellas, se encuentran las de tipo SHV, por sus iniciales de “*sulphydryl variable*”, aislada por primera vez en Europa a partir de una cepa de *Klebsiella ozaenae*, con la capacidad de hidrolizar ceftazidima y cefotaxima [9]; las tipo TEM, que hace referencia a “Temoniera”, nombre de la paciente en cuyo hemocultivo se aisló por primera vez una cepa *E.coli* capaz de hidrolizar aztreonam de manera más eficiente que la ceftazidima y cefotaxima; y, CTX-M, cefotaximasas aisladas por primera vez en Múnich, Alemania, son de naturaleza plasmídica y confieren resistencia a cefotaxima y cefuroxima [10]. Tanto SHV y TEM están relacionadas con variantes que difieren sólo en unas pocas sustituciones de aminoácidos, mientras que CTX-M es mucho más diverso genéticamente y se ha diseminado rápidamente por todo el mundo [11,12].

Desde inicios de los años 2000, se han documentado los primeros reportes de producción de BLEE, particularmente, en Europa; sin embargo, para el 2021 los reportes indican una propagación global, en especial del tipo CTX-M [13], debido a la presencia de clones exitosos o clones de alto riesgo. Por ejemplo, en países como EEUU, Arabia Saudí, India y Nepal, determinaron que el posible factor de prevalencia de los fenotipos BLEE de *E.coli*, es la diseminación global del clon ST131 que con frecuencia transporta *bla*<sub>CTX-M-15</sub> [14][15][16][17]; en Sur América, el primer reporte de ExPEC productora de BLEE fue realizado en Colombia en el 2011, donde encontraron la presencia de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> en el grupo filogenético B2 [18]; en el 2017, en Venezuela, se evidenció la presencia de ExPEC-BLEE con resistencia a cefalosporinas conjunta a quinolonas y aminoglucósidos, en aislados clasificados en grupos filogenéticos A y B1, como los más frecuentes, seguidos por D y B2, encontrando en cada uno los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, con mayor predominio en *bla*<sub>CTX-M-8</sub> [19].

Así también, en Perú, los aislados portadores de BLEE han sido identificados como una problemática de gran importancia en salud pública, debido a que se han encontrado diseminados por el país, principalmente en ciudades como Lima, Loreto, Puno, San Martín, Madre de Dios, entre otras regiones; siendo más predominante el gen *bla*<sub>TEM</sub>, seguido por *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> [20][21]. Sin embargo, en la región de Cusco pocos reportes se han encontrado con la caracterización de los tipos de BLEE en aislados ExPEC, ni con relación a los grupos filogenéticos, a pesar de los reportes que reflejan alta tasa de resistencia [22]. Por consiguiente, con la finalidad de ampliar el conocimiento epidemiológico de la región, el objetivo de este proyecto fue caracterizar los tipos de BLEE y sus grupos filogenéticos, a partir de cepas de ExPEC resistentes a cefalosporinas de tercera generación,

aisladas de centros hospitalarios en la ciudad de Cusco – Perú, mediante métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional descriptivo, con muestreo no probabilístico por conveniencia. Los criterios de inclusión de los aislados fueron ExPEC portadoras de BLEE y los criterios de exclusión, fueron aislados no clasificados como ExPEC [23]. Las muestras fueron identificadas con código propio, con el cual se presentarán todos los análisis del estudio.

### 2.2. Aislados bacterianos y cepas control

Los aislados bacterianos fueron seleccionados del banco de cepas de la Universidad Santiago de Cali (70 aislados), provenientes de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, obtenidos a partir de muestras de orina, con 65 aislados; sangre, con 4 aislados; y, piel y tejidos blandos, con 1 aislado. Se utilizaron como cepas control para la detección de los tipos de BLEE: *E.coli* TEM-9 (TEM), *E.coli* 1040 (CTX-M) y *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*) 700603 (SHV); y, para los grupos filogenéticos: *E.coli* 5642 para los tres genes, *chuA*, *yjaA* y *tspE4.C2*.

Los aislados fueron recuperados inicialmente en caldo LB y reaislados en medio MacConkey, para asegurar su pureza. A partir de cultivos puros se prepararon inóculos, tomando 3 a 4 colonias en 500 uL de agua ultrapura estéril, y las muestras fueron almacenadas en refrigeración hasta su procesamiento.

### 2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de los tipos de BLEE

Los cebadores empleados para las reacciones de PCR convencional fueron: *bla*<sub>SHV</sub> F- 5'-CAGGATCTGGTGGACTACTC-3', R- 5'-CGCTGTTATCGCTCATGG-3'; *bla*<sub>TEM</sub> F- 5'-CTTCCTGTTTTGCTCACCCA-3', R- 5'-TACGATACGGGAGGGCTTAC-3' y *bla*<sub>CTX-M</sub> F- 5'-ATGGTTAAAATCACTGC-3', R- 5'-TCCGCTATTACAAACCG-3', para amplificar fragmentos de 103 pb [24], 717 pb [25] y 883 pb [17] respectivamente. La amplificación del Ácido Desoxirribonucleico (ADN), se llevó a cabo de acuerdo a los protocolos reportados previamente como se describe a continuación [24] [25].

**Genes *bla*<sub>TEM</sub>:** La mezcla de la reacción contenía: 1 µL de la muestra y 24 µL de la mezcla maestra compuesta por Buffer de la enzima al 1X, MgCl<sub>2</sub> al 1.5 mM, dNTPs (New England BioLabs, N0447S, USA) al 0.2 mM, Taq polimerasa (GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase - Promega Corporation, Madison, USA) al 0,5 U/µL y de cada cebador 0.2 mM; esto se llevó a cabo empleando un termociclador SelectCycler™ (Thermal Cycler, Estados Unidos) bajo las siguientes condiciones: lisis celular a 94°C por 5 minutos; desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, hibridación 52 por 1 minuto, elongación a 72 °C por 1 minuto, por 35 ciclos, seguidas de un ciclo de elongación final de 10 minutos a 72 °C y un tiempo infinito a 10°C. Finalmente, las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 1,2% (HyAgarose™, ACTGene, Inc.) y teñidas con SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA); se utilizó como marcador de peso molecular el GeneRuler 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs, N3232S, USA) de un tamaño de rango de 500 pb a 10.000 pb.

**Genes *bla*<sub>SHV</sub> :** La mezcla de la reacción contenía: 1 µL de la muestra y 24 µL de la mezcla maestra compuesta por Buffer de la enzima al 1X, MgCl<sub>2</sub> al 1 mM, dNTPs al 0.2 mM, Taq polimerasa al 1 U/µL y de cada cebador 0.2 mM; esto se llevó a cabo empleando un termociclador SelectCycler™ (Thermal Cycler, Estados Unidos) bajo las siguientes condiciones: lisis celular a 95°C por 5 minutos; desnaturalización a 95 °C por 45 segundos, hibridación 58 por 45 segundos, elongación a 72 °C por 1:30 minuto, por 35 ciclos; un ciclo de elongación final de 10 minutos a 72 °C y un tiempo infinito a 10°C; finalmente, las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 1,2% y teñidas con SYBR™ Safe DNA Gel Stain; se utilizó como marcador de peso molecular el GeneRuler 1 kb DNA Ladder de un tamaño de rango de 50 pb a 1000 pb.

**Genes *bla*<sub>CTX-M</sub>:** La mezcla de la reacción contenía: 1 µL de la muestra y 24 µL de la mezcla maestra compuesta por Buffer de la enzima al 1X, MgCl<sub>2</sub> al 2.5 mM, dNTPs al 0.2 mM, Taq polimerasa al 0,5 U/µL y de cada cebador 0.2 mM; esto se llevó a cabo empleando un termociclador TC1000-G (Thermal Cycler, Estados Unidos) bajo las siguientes condiciones: lisis celular a 95°C por 5 minutos; desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, hibridación 50 por 1 minuto, elongación a 72 °C por 1 minuto, por 35 ciclos; un ciclo de elongación final de 10 minutos a 72 °C y un tiempo infinito a 10°C. Finalmente, las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 1,2% y teñidas con SYBR™ Safe DNA Gel Stain; se utilizó como marcador de peso molecular el GeneRuler 1 kb DNA Ladder de un tamaño de rango de 500 pb a 10.000 pb.

#### 2.4. Detección de los grupos filogenéticos por PCR Multiplex

Las cepas fueron clasificadas dentro de los grupos filogenéticos (A2, B1-1, B2-2, D1 y D2) de acuerdo con la presencia de los genes *chuA*, *yjaA* y *tspE4.C2*, utilizando una PCR múltiple con los cebadores: *chuA* F- 5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3', R- 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'; *yjaA* F- 5'-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-3', R- 5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3' y *tspE4.C2* F- 5'-AGTAATGTCGGGGCATTTCAG-3', R- 5'-TCGCGCCAACAAAGTATTACG-3', para amplificar fragmentos de 279 pb, 211 pb y 151 pb. La amplificación del ADN se llevó a cabo de acuerdo a los protocolos reportados previamente como se describe a continuación [2].

La mezcla de la reacción contenía: 1 µL de la muestra y 24 µL de la mezcla maestra compuesta por Buffer de la enzima al 1X, MgCl<sub>2</sub> al 2 mM, dNTPs al 0.6 mM, Taq polimerasa al 1 U/µL y de cada cebador 0.2 mM; esto se llevó a cabo empleando un termociclador TC1000-G (Thermal Cycler, Estados Unidos) bajo las siguientes condiciones: lisis celular a 95°C por 7 minutos; desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, hibridación 59 por 1 minuto, elongación a 72 °C por 30 segundos, por 30 ciclos; un ciclo de elongación final de 10 minutos a 72 °C y un tiempo infinito a 10°C. Finalmente, las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 2% y teñidas con SYBR™ Safe DNA Gel Stain; se utilizó como marcador de peso molecular el GeneRuler 1 kb DNA Ladder de un tamaño de rango de 500 pb a 10.000 pb.

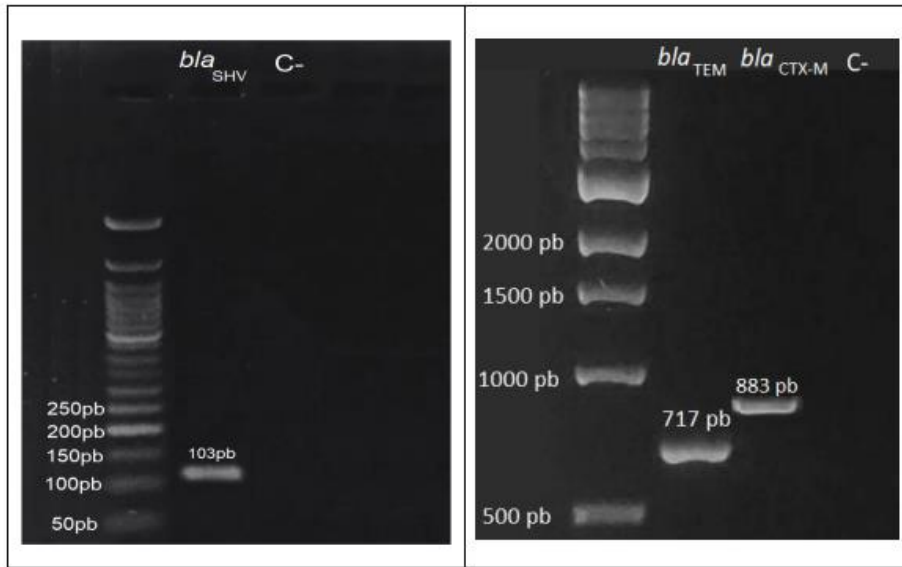
#### 2.5. Análisis de resultados

Para el análisis descriptivo, se determinaron proporciones para variables cualitativas y se elaboraron gráficos de barras y circulares con porcentajes, para facilitar la interpretación de la información obtenida. Además, se utilizó el software estadístico Rstudio [26], para simulaciones de Monte Carlo, aproximando el p-valor de la prueba exacta de Fisher, usando un nivel de significación ( $\alpha$ ) del 0,05; esto, con el fin de establecer si existe una relación entre las enzimas BLEE y los grupos filogenéticos de los 70 aislados estudiado.

### 3. RESULTADOS

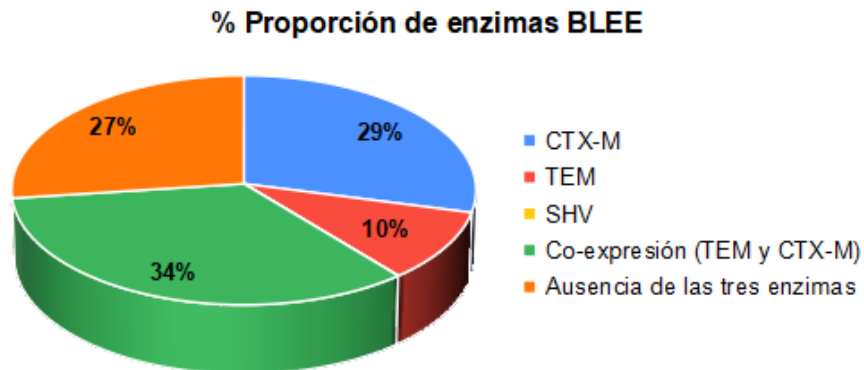
#### 3.1. Detección de los tipos de BLEE por PCR

Los resultados obtenidos por la PCR mostraron que en el 73% (51/70) de los aislados se encontraron BLEE de tipo TEM y CTX-M. De acuerdo a la **Figura 1**, se analizaron fragmentos de 103, 717 y 883 pares de bases, correspondientes a los genes *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>, respectivamente.



**Fig.1.** Visualización de las bandas correspondientes a los genes BLEE seleccionados.

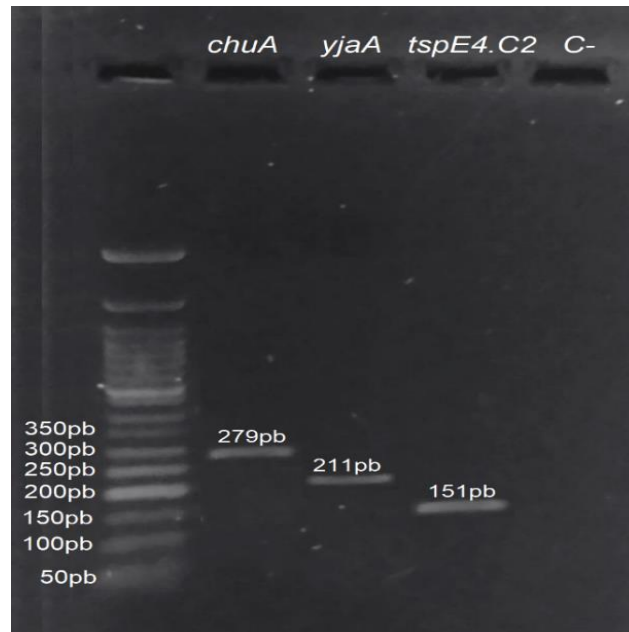
De los 70 aislados, la mayor proporción se encontró en aislados co-expresando TEM y CTX-M, en un 34% (24/70); los aislados con enzimas tipo CTX-M, con el 29% (20/70); TEM, con 10% (7/70) y una ausencia de la enzima SHV, con 0% (0/70). Por otra parte, se observó que el 27% (19/70) de los aislados no expresaron ninguna de las enzimas tamizadas (ver **Figura 2**).



**Fig.2.** Proporción de las enzimas BLEE determinados en 70 aislados estudiados.

### 3.2. Detección de los grupos filogenéticos por PCR Multiplex

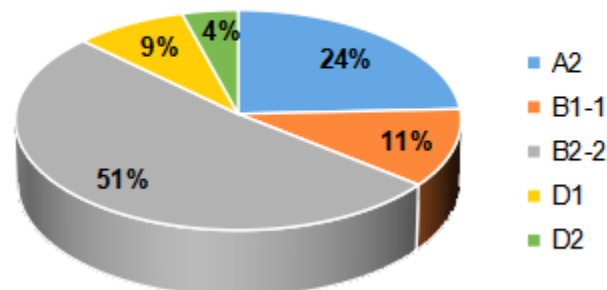
Se analizaron fragmentos de 151, 211 y 279 pares de bases, correspondientes a los genes *tspE4.C2*, *yjaA* y *chuA*, respectivamente (ver **Figura 3**).



**Fig.3.** Visualización de las bandas correspondientes a las cepas control seleccionadas.

Al realizar el análisis de los resultados, se obtuvieron diferentes grupos filogenéticos que fueron agrupados por similitud, encontrando 5 diferentes grupos (A2, B1-1, B2-2, D1, D2). Por lo tanto, de los 70 aislados estudiados se evidencia de manera general que: el grupo filogenético con mayor proporción es el B2-2, con el 51% (36/70); seguido por A2, con el 24% (17/70); B1-1, con el 11% (8/70); B2-2, con el 9% (6/70); y, el grupo filogenético que presentó menor proporción fue D2, con 4% (3/70) (ver **Figura 4**).

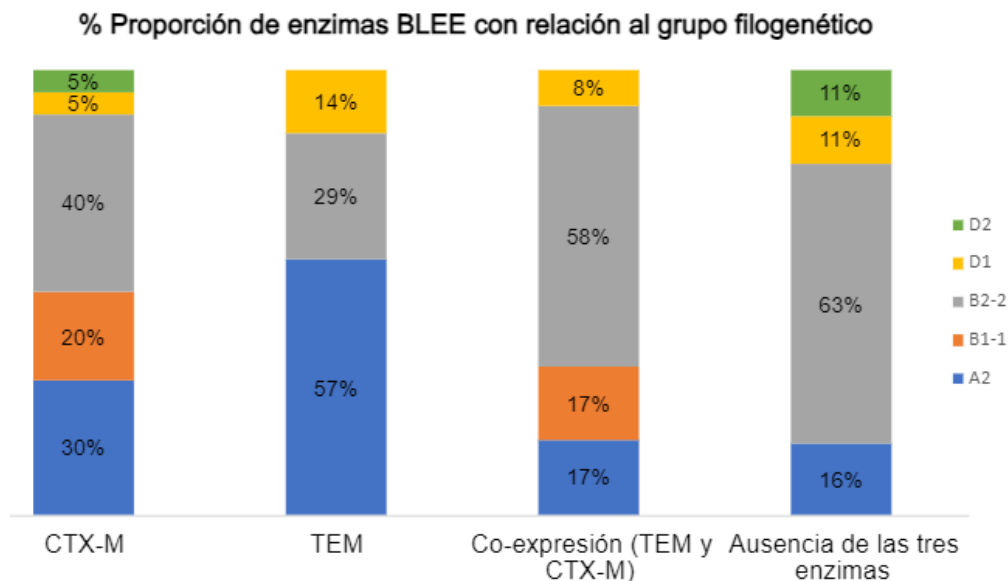
**% Proporción de grupos filogenéticos**



**Fig.4.** Proporción de los grupos filogenéticos determinados en 70 aislados estudiados.

Posteriormente, en cuanto a la relación de los aislados portadores de enzimas BLEE con los grupos filogenéticos de los 70 aislados estudiados, se implementó como análisis estadístico una simulación de la prueba exacta de Fisher, que permitió establecer evidencia suficiente para determinar que existe una relación entre los aislados portadores de algún tipo de enzimas y los grupos filogenéticos encontrados ( $p$ -valor = 0.0099). Así, se obtuvo que el 40% (8/20) de los aislados portadores de la enzima BLEE tipo CTX-M, presentaron en mayor proporción el grupo filogenético B2-2 y en menor proporción, en los grupos filogenéticos D1 y D2, con 5% cada uno (1/20); además, se obtuvo que el 57% (4/7) de los aislados portadores de la enzima BLEE tipo TEM, presentaron en mayor proporción el grupo filogenético A2 y una ausencia de los grupos filogenéticos B1-1 y D2, con el 0% para

cada uno (0/7). Por otra parte, se obtuvo que el 58% (14/24) de la co-expresión entre las enzimas portadoras de TEM y CTX-M, presentaron en mayor proporción el grupo filogenético B2-2 y una ausencia del grupo filogenético D2 con el 0% (0/24). Finalmente, el 63% (12/19) de los aislados que tuvieron ausencia de las tres enzimas BLEE presentaron en mayor proporción el grupo filogenético B2-2 y una ausencia del grupo filogenético B1-1, con el 0% (0/19) (ver **Figura 5**).



**Fig.5.** Proporción de enzimas BLEE con relación al grupo filogenético determinados en 70 aislados estudiados

#### 4. DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

*E.coli* es un miembro importante de la microbiota intestinal de animales y humanos, pero adquiere con facilidad elementos genéticos móviles foráneos que contienen distintos genes capaces de codificar factores de virulencia y resistencia, desempeñando un papel importante en su patogénesis [27, 28]. La diferencia entre los aislados patógenos y comensales, se fundamentan además de sus factores de virulencia, en sus antecedentes filogenéticos [2]. Las cepas pertenecientes a los grupos A y B1 se consideran de bajo poder virulento; y, las cepas de *E.coli* que pertenecen a los grupos B2 y D, han sido asociadas a la mayoría de las infecciones por ExPEC. Además, se consideran de alto poder virulento, ya que poseen diversos factores de virulencia como sideróforos, adhesinas, exotoxinas, etc. que les permiten sobrevivir fuera del intestino; en la actualidad, se sabe que diferentes patotipos de *E.coli* intestinal y extraintestinal, comparten factores de virulencia; por lo tanto, existe la posibilidad de que las cepas pertenecientes a los grupos A y B1 también sean consideradas como ExPEC [29].

Los resultados de esta investigación muestran que, de los 70 aislados ExPEC portadoras de BLEE, el 64% pertenecen a los grupos filogenéticos B2 y D; sin embargo, también se encontraron aislados pertenecientes a los grupos A y B1 que, como se mencionó anteriormente, son considerados principalmente como comensales y menos virulentos, lo cual indica que este grupo de aislados comensales comparten factores de virulencia con ExPEC, evidenciando que este tipo de mezclas son cada vez más comunes, lo que dificulta, aún más, la separación de cepas comensales de las patógenas [19].

Estos resultados son similares con los reportes obtenidos en diversos países, donde el grupo filogenético B2 es el que mayor proporción presenta en ExPEC portadoras de BLEE en infecciones asociadas a la atención en salud; como es en el caso de Cooke y col, en el año 2010, donde en aislamientos ExPEC pertenecientes al St.James's Hospital (SJH), Irlanda, encontraron una mayor proporción en el grupo filogenético B2 (60%) [30]. Otro ejemplo corresponde al estudio reportado por Santos y col, en el año 2013 en São Paulo, Brasil, donde la mayor proporción

se observó en grupo filogenético B2 del 35% (26/74) [31]. Sin embargo, en la actualidad no hay estudios en Perú, en el que se haya reportado la caracterización de los grupos filogenéticos en las cepas ExPEC.

En cuanto a la presencia de aislados portadores de BLEE, estas pueden agruparse en varias familias, tales como las enzimas BLEE presentadas en este estudio que fueron de tipo TEM, SHV y CTX-M [32]. Pese a ello, a medida que las betalactamasas de tipo CTX-M se convirtieron en las BLEE más prevalentes, las enzimas de tipo TEM y SHV, se volvieron menos frecuentes [33,34]. Es importante recalcar que Perú es un país con una alta prevalencia de BLEE y, por ello, múltiples estudios han sido realizados para identificar su epidemiología.

Así, la presente investigación muestra que, de las 3 enzimas, CTX-M y TEM tuvieron una proporción alta; sin embargo, la co-expresión de enzimas entre TEM y CTX-M presentaron la mayor proporción; otro dato importante es que no se encontraron enzimas tipo SHV. No obstante, Marcos y col, en el año 2021, en un estudio realizado a partir de 70 aislados de *E.coli* en pacientes con infección del tracto urinario (ITU) provenientes de hospitales públicos en ocho diferentes regiones de Perú, mostraron resultados distintos, al encontrar que el gen *bla*<sub>TEM</sub> fue el que mayor proporción obtuvo con un 31%, seguido por *bla*<sub>CTX-M</sub> con 19% y *bla*<sub>SHV</sub> con 3%, y una ausencia de la co-expresión entre genes *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> [21]. Sin embargo, Galván y col, en 2016, publicaron un estudio con pacientes de la comunidad de la ciudad de Lima, en el que obtuvieron como resultado que el 55% de los aislados eran portadores del gen *bla*<sub>CTX-M</sub>, 13% al gen *bla*<sub>TEM</sub>, 6% al gen *bla*<sub>SHV</sub> y el 24% restante, presentaron una co-expresión de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> [20]. De manera similar, se observó cierta relación con los resultados presentados en este estudio al encontrar una mayor proporción de la co-expresión entre los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> con 34% (24/70), que los hace más resistentes a los antibióticos [20], además de una proporción alta en los genes BLEE de tipo *bla*<sub>CTX-M</sub> con 29% (20/70) y de *bla*<sub>TEM</sub> con 10% (7/70); en cuanto a los genes *bla*<sub>SHV</sub>, Loyola y col, en el año 2021 en la región de Cusco, también presentaron ausencia del gen *bla*<sub>SHV</sub> con el 0% en 58 aislados, esto puede estar relacionado con la epidemiología de esta región, posiblemente asociada a una diseminación clonal de estos aislados. Es importante recalcar que, en este estudio de Loyola y col, se encontraron aislados portadores de CTX-M del grupo 9, los cuales no fueron tamizados en este estudio y que pueden estar relacionados con los aislados que presentaron resultados negativos para las tres enzimas [22].

Adicional, haciendo uso de herramientas estadísticas como software Rstudio, se pudo evidenciar que sí existe una relación entre las enzimas BLEE con los grupos filogenéticos estudiados (p-valor = 0.0099) [26]. Los aislados portadores de CTX-M, solo o co-expresando con esta enzima, presentaron en mayor proporción el grupo filogenético B2-2, lo cual es coherente con la premisa que pertenecen a clones con mayor virulencia; mientras que aislados portadores de la enzima BLEE tipo TEM, presentaron en mayor proporción el grupo filogenético A2, que no corresponde a la premisa de menor virulencia. Sin embargo, comparando los aislados portadores de CTX-M versus los portadores de TEM, CTX-M ha demostrado ser mucho más virulenta a nivel global [32].

Finalmente, cabe destacar que son pocos los estudios realizados en la ciudad de Cusco, Perú, acerca de aislados ExPEC portadoras de BLEE; por esta razón, con esta investigación se logrará ampliar el conocimiento sobre este tipo de aislados y confirmar la presencia de grupos filogenéticos considerados altamente virulentos. Esta información es importante ya que impacta directamente la epidemiología y contribuye en la toma de decisiones sobre los antibióticos de elección en los tratamientos.

## 5. CONCLUSIONES

- Los resultados demuestran que los aislados ExPEC portadores de BLEE analizados presentan una mayor proporción de enzimas tipo CTX-M, que pueden estar solas o co-expresadas con enzimas tipo TEM, lo cual impacta las decisiones terapéuticas.
- El 27% de los aislados restantes no presentaron resultados positivos para ninguna de las BLEE analizadas; sin embargo, se requieren estudios adicionales de otros grupos de CTX-M.
- De los aislados estudiados, el grupo filogenético que presentó mayor proporción fue B2-2 con el 51%; dato que coincide con la epidemiología registrada a nivel mundial.
- Los resultados obtenidos mediante herramientas estadísticas demuestran que, existe relación entre las enzimas BLEE y los grupos filogenéticos estudiados (p-valor = 0.0099).
- Se requieren estudios adicionales para finalizar la caracterización de estos aislados.

## 5.1. FUTUROS ESTUDIOS

1. Estudios de clonalidad.
2. Caracterización de los plásmidos asociados a la diseminación de las BLEE.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Primero, queremos agradecer a Dios por brindarnos la firmeza, el carácter y la disciplina necesaria para llevar a cabo este proyecto. A nuestros padres, por su apoyo a lo largo de nuestra vida y, especialmente, nuestra formación profesional. De igual manera, le agradecemos a la Universidad Santiago de Cali por habernos brindado los espacios y equipos necesarios para llevar a cabo esta investigación. Finalmente, le damos gracias a nuestras tutoras de trabajo de grado por su acompañamiento y apoyo incondicional durante todo el proceso.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. Jang, H. Hur, M. Sadowsky, M. Byappanahalli, T. Yan y S. Ishii, "Environmental *E.coli*: ecology and public health implications-a review", *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 123, No. 3, pp. 570–581, 2017. doi:10.1111/jam.13468
- [2] O. Clermont, J. K. Christenson, E. Denamur y D. M. Gordon, "The Clermont *E.coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups", *Environmental Microbiology Reports*, Vol 5, No1, pp 58–65, 2012. doi:10.1111/1758-2229.12019
- [3] A. Manges H. Geum, A. Guo, T. Edens, C. Fibke y J. Pitout, "Global ExPEC lineages", *Clin Microbiol Rev*. Vol. 32, No. 3, pp. 135-18, 2019. doi:10.1128/cmr.00135-18
- [4] S. Shaik, A. Ranjan, S. K. Tiwari, A. Hussain, N. Nandanwar, N. Kumar y N. Ahmed, "Comparative Genomic Analysis of Globally Dominant ST131 Clone with Other Epidemiologically Successful ExPEC Lineages", *mBio*. Vol. 8, No. 5, pp. 96-17, 2017. doi:10.1128/mBio.01596-17
- [5] D. M. Livermore, "Defining an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase", *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 14, pp. 3–10, 2008. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01857.x
- [6] J. R. Johnson, B. Johnston, C. Clabots, M. A. Kuskowski y M. Castanheira, "*E.coli* Sequence Type ST131 as the Major Cause of Serious Multidrug-Resistant *E.coli* Infections in the United States", *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 51, No. 3, pp. 286–294, 2010. doi:10.1086/653932
- [7] V. M. Blanco, J. J. Maya, A. Correa, M. Perenguez, J. S., Muñoz, G. Motoa y M. V. Villegas, "Prevalence and risk factors for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *E.coli* causing community-onset urinary tract infections in Colombia", *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Vol. 34, No. 9, pp. 559–565, 2016. doi:10.1016/j.eimc.2015.11.017
- [8] E. De La Cadena, M. F. Mojica, N. Castillo, A. Correa, M. F. Appel, J. C. García C. Pillares y M.V. Villegas, "Genomic Analysis of CTX-M-Group-1-Producing ExPEC from Patients with Urinary Tract Infections (UTI) from Colombia", *Antibiotics*, Vol. 9, No. 12, pp. 899, 2020. doi:10.3390/antibiotics9120899
- [9] J. Chaves, M. G. Ladona, C. Segura, A Coira, R., Reig y C. Ampurdanes, "SHV-1 -Lactamase Is Mainly a Chromosomally Encoded Species-Specific Enzyme in *K.pneumoniae*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 45 No. 10, pp. 2856–2861, 2001. doi:10.1128/aac.45.10.2856-2861.2001
- [10] K.V. Venkatachalam, W. Huang, M. LaRocco y T. Palzkill, "Characterization of TEM-1 beta-lactamase mutants from positions 238 to 241 with increased catalytic efficiency for ceftazidime" *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, No. 38, pp. 23444-23450, 1994. doi:10.1016/S0021-9258(17)31536-3.
- [11] A. Bauernfeind, S. Schweighart y H. Grimm, "A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *E.coli*", *Infection*, 18(5), 294–298, 1990. doi:10.1007/bf01647010
- [12] M. Araque y I. Rivera, "Simultaneous Presence of *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> Genes on a Large Conjugative Plasmid Carried by Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *K.pneumoniae*", *The American Journal of the Medical Sciences*, Vol. 327 No. 3, pp. 118–122, 2004. doi:10.1097/00000441-200403000-00002
- [13] P. Pérez, Z. Palacios, L. López y A. Pascual, "Successful outcome after treatment with a combination of meropenem and fosfomicin for VIM-1 and CTX-M-15 producing *K.pneumoniae* bloodstream infection", *Journal of Infection*, Vol. 83, No. 4, pp. 12-13, 2021. doi:10.1016/j.jinf.2021.08.004

- [14] I.A. Critchley N. Cotroneo, M.J. Pucci y R. Mendes, "The burden of antimicrobial resistance among urinary tract isolates of *E.coli* in the United States in 2017", *PLOS ONE*, Vol. 14, No, 12, pp. 22-65, 2019. doi:10.1371/journal.pone.0220265
- [15] A. Alqasim, A. Abu Jaffal, y A. A. Alyousef, "Prevalence of Multidrug Resistance and BLEE Carriage of Clinical Uropathogenic *E.coli* Isolates in Riyadh, Saudi Arabia", *International Journal of Microbiology*, Vol. 1, No. 9, 2018. doi:10.1155/2018/3026851
- [16] A. Hussain, C. Ewers, N. Nandanwar, S. Guenther, S. Jadhav, L. H. Wieler y N. Ahmed, "Multiresistant Uropathogenic *E.coli* from a Region in India Where Urinary Tract Infections Are Endemic: Genotypic and Phenotypic Characteristics of Sequence Type 131 Isolates of the CTX-M-15 Extended-Spectrum-beta-lactamase-Producing", *Lineage. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 56, No. 12, pp. 6358–6365, 2012. doi:10.1128/aac.01099-12
- [17] S. Koirala, S. Khadka, S. Sapkota, S. Sharma, S. Khanal, A. Thapa, D. Kumar y P. Poudel, "Prevalence of CTX-M beta-lactamases Producing Multidrug Resistant *E.coli* and *K.pneumoniae* among Patients Attending Bir Hospital, Nepal", *BioMed Research International*, Vol 11, 2021. doi: 10.1155/2021/9958294
- [18] S. J., Ruiz, M. C. Montealegre, P. Garbajosa, A. Correa, D. F. Briceño, E. Martinez, E. Martinez F. Rosso, M. Muñoz, J. P. Quinn, R. Cantón y M.V. Villegas, "First Characterization of CTX-M-15-Producing *E.coli* ST131 and ST405 Clones Causing Community-Onset Infections in South America", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 49, No. 5, 2011. doi:10.1128/jcm.00045-1
- [19] Y. Varela, B. Millán y M. Araque, "Genetic diversity of ExPEC strains producers of beta-lactamases TEM, SHV and CTX-M associated with health-care", *Biomédica*, Vol. 37, No. 2, 2017. doi:10.7705/biomedica.v37i3.3324
- [20] F. Galván, J. Agapito, N. Bravo, J. Lagos y J. Tamariz, "Phenotypic and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *E.coli* in outpatients in Lima, Peru", *Journal medical Herediana*, Vol. 27, No.1, pp. 22-29, 2016. doi: 10.20453/rmh.v27i1.2780
- [21] P. Marcos, G. Salvatierra, J. Yareta, J. Pino, N. Vásquez, P. Diaz y P. Tsukayama, "Microbiological and molecular characterization of antimicrobial resistance in uropathogenic *E.coli* from Peruvian public hospitals", *Journal of Experimental Medicine and Public Health*, Vol, 38, pp. 119-123, 2021. doi: 10.17843/rpmesp.2021.381.6182
- [22] S. Loyola, F. Velasco, J. Dueñas, N. Vasquez, P. Juarez, C. Llanos, y A. G. Lescano, "Antimicrobial Resistance Patterns and Dynamics of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Uropathogenic *E.coli* in Cusco, Perú." *Antibiotics*, Vol. 10, No. 5, pp. 485, 2021. doi:10.3390/antibiotics10050485
- [23] L.I. Escandón y J. D. Muñoz, "Molecular characterization of strains of ExPEC resistant to third-generation cephalosporins isolated from hospitals in the city of Cusco-Peru. Universidad Santiago de Cali. Col. 2022.
- [24] N. Guessennd, S. Bremont, V. Gbonon, A. Kacou-NDouba, E. Ekaza, T. Lambert y P. Courvalin, "Resistance to qnr-type quinolones in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Abidjan, Côte d'Ivoire", *Pathologie Biologie*, Vol. 56 No.7, pp. 439–446, 2008. doi:10.1016/j.patbio.2008.07.025
- [25] P. Lal, A. Kapil, B. K. Das y S. Sood, "Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum b-lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* sp. isolated from a tertiary care hospital. *Indian Journal of Medical Research*, Vol. 125, No. 2, pp. 173, 2007. PMID: 17431288
- [26] R. Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. 2020. Disponible en: <https://www.r-project.org/>
- [27] B. Pakbin, W. M. Brück y J. W. A. Rossen, "Virulence factors of enteric pathogenic *E.coli*: A review", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 22. No. 18, 2021. doi.org/10.3390/ijms22189922
- [28] N.M. Sobhy, S.G. Yousef, H.A. Aboubakr, M. Nisar, K.V. Nagaraja, S.K. Mor, R.J. Valeris-Chacin, y S.M. Goyal, "Virulence factors and antibiograms of *E.coli* isolated from diarrheic calves of Egyptian cattle and water buffaloes", *Plos One*, Vol. 15, No. 5, 2020. doi.org/10.1371/journal.pone.0232890
- [29] A. Leimbach, J. Hacker & U. Dobrindt, "*E.coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity", *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 3–32. 2013. doi:10.1007/82\_2012\_303
- [30] M. Cooke, S. Smith, M. Kelleher y T. Rogers, "Major differences exist in frequencies of virulence factors and multidrug resistance between community and nosocomial *E.coli* bloodstream isolates", *J Clin Microbiol*. Vol. 48, pp. 1099- 104, 2010 doi.org/10.1128/JCM.02017-09
- [31] A. Santos, A. Zidko, A. Pignatari y R. Silva, "Assessing the diversity of the virulence potential of *E.coli* isolated from bacteremia in São Paulo, Brazil", *Braz J Med Biol Res*. Vol. 46, pp. 968-73, 2013. doi.org/10.1590/1414-431X20133184
- [32] M. Castanheira, P. J. Simner, y P. A. Bradford, "Extended-spectrum beta-lactamases: An update on their characteristics, epidemiology and detection", *JAC-antimicrobial resistance*, Vol. 3, No. 3, pp. 92, 2021.

- [33] M. Perilli, E. Dell'Amico, B. Segatore, M.R. de Massis, C. Bianchi, F. Luzzaro y G. Amicosante, "Molecular Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases Produced by Nosocomial Isolates of *Enterobacteriaceae* from an Italian Nationwide Survey", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 40. No. 2, pp. 611–614, 2002. doi:10.1128/jcm.40.2.611-614.2002
- [34] K. Kazmierczak, B. Jonge, G. Stone y D. Sahn, "Longitudinal analysis of ESBL and carbapenemase carriage among *Enterobacterales* and *P.aeruginosa* isolates collected in Europe as part of the International Network for Optimal Resistance Monitoring, global surveillance programme, 2013–17" *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 75. No. 6. pp. 1165–1173, 2020. doi:10.1093/jac/dkz571