

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Determinación de grupos CTX-M en *E. coli* uropatogénicas  
productoras de betalactamasas de espectro extendido  
(BLEE) mediante pruebas moleculares**

**Proyecto de investigación**

**Doménica Alejandra Vargas Arias**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 23 de mayo de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Determinación de grupos CTX-M de *E. coli* uropatogénicas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante pruebas moleculares**

**Doménica Alejandra Vargas Arias**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Ana Cristina Chávez, MSc

Firma del profesor

---

Quito, 23 de mayo de 2019

## DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

---

Nombres y apellidos:

Doménica Alejandra Vargas Arias

Código:

00116672

Cédula de Identidad:

1715068266

Lugar y fecha:

Quito, mayo de 2019

## RESUMEN

Durante los últimos años, la resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias, ha incrementado de manera alarmante en la sociedad y limita de manera progresiva el uso de antibióticos, causando altas tasas de mortalidad y morbilidad por enfermedades infecciosas en pacientes hospitalarios y ambulatorios. Se ha registrado una alta incidencia en la resistencia de los microorganismos, que causan infecciones del tracto urinario (ITU) como *E. coli*. Uno de los principales mecanismos de resistencia microbiana es la producción de enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales inactivan a los antibióticos betalactámicos, dentro de ellas se encuentra su grupo principal denominado CTX-M. Este grupo está distribuido ampliamente en el mundo y existe una predominancia sobre los otros tipos de BLEE. La familia CTX-M se clasifica en cinco grupos de acuerdo a la similitud en las secuencias de aminoácidos y estas son: CTX-M-1, CTX-M 2, CTXM-8, CTX-M-9 y CTX-M-25. Su alta prevalencia se debe a la diseminación de los genes *bla*CTX-M en plataformas genéticas altamente móviles, como los transposones e inserción de secuencias (IS). Estos elementos genéticos son integrados en estructuras más complejas como plásmidos y clones específicos. En el presente estudio, se utilizó la técnica de PCR para la detección de los grupos de CTX-M de *Escherichia coli* uropatogénicas de pacientes ambulatorios. Los resultados obtenidos indican la presencia de grupo CTX-M-1 (75%), CTX-M-9 (12%), CTX-M-8,25 (2%) y así como un 11% de no identificables. Nuestros resultados concuerdan con los estudios realizados, ya que indican que en el Ecuador y en países vecinos existe una alta prevalencia de los grupos CTX-M-1 y 9. Además, se identificó la coexistencia de dos genes de *bla*CTX-M en una misma cepa, los cuales pertenecen al grupo CTX-M-1 y 9 (2%). Esta coexistencia sugiere una recombinación homóloga entre los genes específicos de los grupos de CTX-M-1 y 9. Los resultados de la secuenciación indican la presencia de las variantes CTX-M-15, CTX-M-3, CTX-M-8, CTX-M-25, CTX-M-14 y CTX-M-27, lo cual concuerda con la literatura ya que estas son las variantes más prevalentes asociadas a *E. coli* uropatogénicas en el Ecuador.

**Palabras clave:** CTX-M, resistencia antibióticos, *E. coli* uropatogénica, coexistencia, *bla*CTX-M

## ABSTRACT

Nowadays, antibiotic resistance has increased alarmingly in society and progressively limits the use of antibiotics, causing high rates of mortality and morbidity from infectious diseases in hospital and community patients. There has been a high incidence in the resistance of microorganisms that cause urinary tract infections (UTI) such as *E. coli*. One of the main mechanisms of microbial resistance is the production of extended-spectrum beta-lactamase enzymes (ESBL), which inactivate beta-lactam antibiotics such as cephalosporins. The ESBL enzymes are classified into four classes, within which the CTX-M are the most widespread enzymes. The CTX-M family is classified into five groups according to the similarity in the amino acid sequences: CTX-M-1, CTX-M 2, CTXM-8, CTX-M-9 and CTX-M-25. The high prevalence of CTX-M is due to the dissemination of *bla*CTX-M genes in highly mobile genetic platforms, such as transposons and insertion of sequences (IS). These genetic elements are integrated into more complex structures such as plasmids and specific clones. In the present study, the PCR technique was used for the detection of CTX-M groups of uropathogenic *Escherichia coli* in community patients. The results showed the presence of group CTX-M-1 (75%), CTX-M-9 (12%), CTX-M-8.25 (2%) and 11% was not identifiable. Our results agree with the studies carried out, since they show that in Ecuador and in neighboring countries, there is a high prevalence of CTX-M-1 and 9 groups. In addition, the coexistence of two *bla*CTX-M genes in the same strain was identified, which belong to the group CTX-M-1 and 9 (2%). This coexistence suggests a homologous recombination between the specific genes of the groups of CTX-M-1 and 9. The results of the sequencing analysis show the presence of the variants CTX-M-15, CTX-M-3, CTX-M-8 , CTX-M-25, CTX-M-14 and CTX-M-27, which agrees with the previous studies, since these are the most prevalent variants associated with uropathogenic *E. coli* in Ecuador.

**Key words:** CTX-M, antibiotic resistance, *bla*CTX-M, coexistence, *E. coli* uropathogenic

## TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN .....	10
1.1.	<i>E. coli</i> uropatogénica (UPEC) .....	10
1.2.	Resistencia hacia antibióticos .....	11
1.3.	Origen y movilización de los genes <i>bla</i> CTX-M.....	12
1.4.	Diseminación genética.....	14
1.5.	Enzimas del tipo CTX-M.....	16
1.6.	Epidemiología grupos CTX-M.....	17
2.	JUSTIFICACIÓN .....	21
3.	OBJETIVOS.....	22
3.1.	Objetivo General: .....	22
3.2.	Objetivos Específicos: .....	22
4.	AREA DE ESTUDIO .....	22
5.	MATERIALES .....	23
5.1.	Extracción de ADN por ebullición.....	23
5.2.	Cuantificación y dilución de ADN.....	23
5.3.	PCR: Amplificación genes <i>bla</i> CTX-M.....	23
5.4.	Electroforesis gel de agarosa.....	24
6.	MÉTODOS .....	24
6.1.	Solicitud al Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos USFQ.....	24
6.2.	Extracción ADN por el método de ebullición.....	25
6.3.	Cuantificación y dilución ADN.....	25
6.4.	PCR (Reacción en cadena de la polimerasa): Amplificación genes <i>bla</i> CTX-M.....	25
6.4.1.	<i>Amplificación de genes específicos de grupo CTX-M-1.</i> .....	25
6.4.2.	<i>Amplificación de genes específicos de grupo CTX-M-2.</i> .....	26
6.4.3.	<i>Amplificación de genes específicos de grupo CTX-M-8, 25.</i> .....	26
6.4.4.	<i>Amplificación de genes específicos de grupo CTX-M-9.</i> .....	26
6.5.	Electroforesis del gel de agarosa.....	28
6.6.	Secuenciación de productos amplificados por PCR .....	28
7.	RESULTADOS.....	29
7.1.	Análisis grupos CTX-M en <i>E. coli</i> uropatogénicas .....	29
7.2.	Análisis de dos o más genes de grupos CTX-M en <i>E. coli</i> uropatogénicas.....	29
7.2.1.	<i>Análisis de coexistencia de genes específicos del grupo CTX-M-1 y CTX-M-9.</i> .....	29
7.2.2.	<i>Análisis in silico de E. coli uropatogénicas productoras de BLEE del tipo CTX-M</i> .....	30
8.	DISCUSIÓN.....	32
8.1.	Análisis de grupos CTX-M .....	32
8.2.	Análisis de genes específicos del grupo CTX-M-1 .....	32
8.3.	Análisis de genes específicos del grupo CTX-M-2 .....	34
8.4.	Análisis de genes específicos del grupo CTX-M-9 .....	35
8.5.	Análisis de genes específicos del grupo CTX-M-8 .....	36
8.6.	Dos o más genes de grupos CTX-M en <i>E. coli</i> uropatogénicas.....	37
8.7.	<i>Análisis in silico de E. coli uropatogénicas productoras de BLEE del tipo CTX-M</i> .....	38
9.	CONCLUSIONES.....	41
10.	RECOMENDACIONES.....	41

11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
12.	ANEXOS.....	49

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Primers utilizados para amplificar genes específicos de los grupos CTX-M.....	27
Tabla 2: Concentración de primers .....	27
Tabla 3: Resumen de concentración de reactivos de PCR para la amplificación de los genes específicos de los grupos de CTX-M .....	27
Tabla 4: Identificación molecular de las muestras enviadas a secuenciar .....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Porcentaje de grupos de CTX-M.....	29
Figura 2: Porcentaje de cepas de E. coli que presentan coexistencia entre el grupo CTX-M-2 y CTX-M-8.....	30
Figura 3: Diagrama de árbol de genes blaCTX-M identificados en E. coli uropatógenicas ...	31

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *E. coli* uropatogénica (UPEC)

Las infecciones del tracto urinario (ITU) se definen como la presencia y colonización de microorganismos en el aparato uroexcretor. Son consideradas como una de las infecciones bacterianas más comunes en los seres humanos, se estima que al menos un 50% de mujeres experimentarán un mínimo de una infección sintomática del tracto urinario durante su vida y aproximadamente del 27% al 48% de las mujeres afectadas experimentan infecciones recurrentes. Las infecciones del tracto urinario pueden clasificarse según su división anatómica como infecciones del tracto urinario inferior y superior (Forsyth, y otros, 2018). En las ITU inferiores, la colonización bacteriana inicia en el área periuretral por una posible contaminación fecal, seguida de la ascensión de las bacterias a través de la uretra y hacia la vejiga, causando cistitis. Mientras que en las ITU superior presenta un cuadro clínico denominado pielonefritis, en la cual las bacterias ascienden a los uréteres y entran en los riñones (Flores, Caparon, Hultgren, & Walker, 2015).

Las infecciones urinarias son causadas por bacterias Gram negativas y Gram positivas, así como por ciertos hongos. Entre los agentes bacterianos causantes más comunes se encuentran las Enterobacterias, entre ellas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*. Se conoce que *Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo facultativo causante de aproximadamente un 90% de infecciones del tracto urinario, por lo que es considerada como la causa más común con infecciones sintomáticas y asintomáticas que se asocian con mayor frecuencia con sublinajes uropatogénicas específicos de *E. coli* (UPEC). La virulencia se refiere a la habilidad de los microorganismos de causar una enfermedad (Johnson, 1991), en el caso de *E. coli*, la virulencia se presenta en el resultado de combinación de propiedades especiales llamados factores de virulencia, los cuales pueden ser: toxinas, adhesinas, sistemas de captación de hierro, síntesis de citoquinas, flagelos y otros (Flores, Caparon, Hultgren, &

Walker, 2015). Un ejemplo, dentro de las adhesinas se encuentran los pili de tipo 1, que son importantes para la colonización, invasión y persistencia de *E. coli* UPEC en la vejiga, mientras que la adhesina FimH se une a uroplaquinas e integrinas que están recubriendo la superficie de las células uroteliales, dicha unión induce la reorganización de la actina y la internalización bacteriana. Además, la UPEC puede sobrevivir en el entorno áspero de la vejiga al segregar varios factores importantes para la adquisición de nutrientes. La toxina hemolisina (HlyA) promueve la lisis de las células del huésped a través de la formación de poros, facilitando así la liberación del hierro y adquisición de nutrientes (Forsyth, y otros, 2018). Los sideróforos que son expresados por UPEC les permiten eliminar el hierro y de esta manera promover la supervivencia durante la infección (Flores, Caparon, Hultgren, & Walker, 2015).

## **1.2. Resistencia hacia antibióticos**

La resistencia microbiana, considerada como una amenaza a la salud mundial, es la capacidad que poseen los microorganismos de neutralizar el efecto de los antibióticos. Este es un problema de salud pública que afecta el tratamiento hospitalario y ambulatorio de infecciones causadas por microorganismos patógenos (Oromi, 2000). La resistencia hacia los antibióticos incrementa de manera alarmante en la sociedad y limita de manera progresiva el uso de antibióticos, causando altas tasas de mortalidad y morbilidad por enfermedades infecciosas (Casellas, 2011). Este fenómeno de resistencia se ha generado debido a que los microorganismos utilizan distintos mecanismos para defenderse de los antibióticos y estos se encuentran en evolución constante, es por ello que se cree que en un futuro la resistencia microbiana hacia los antibióticos será considerada como una catástrofe mundial (Oromi, 2000). Algunos de los mecanismos utilizados por los microorganismos incluyen la producción de enzimas, bombas de expulsión, cambios de permeabilidad de la membrana externa y alteraciones de sitio de acción (Casellas, 2011).

Se conoce que existe un gran impacto en la resistencia de patógenos hacia los betalactámicos. La resistencia se debe a diferentes mecanismos, entre ellos está la producción de enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y de genes que codifican a estas enzimas (Yan, Ko, & Tsai, 2000). Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas capaces de hidrolizar cefalosporinas y monobactámicos (Xu , Ensor, Gossain, Nye, & Hawkey, 2005); se clasifican de acuerdo a la similitud en sus secuencias de aminoácidos y según los sustratos sobre los que actúa. Entre las principales se encuentran TEM, SHV, VEB, GES y CTX-M (Delgado, Barrigas, Astudillo, & Ausili, 2016). En un inicio se encontraban brotes hospitalarios en los cuales estaban implicadas las BLEE del tipo SHV-1 o TEM-1. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un gran incremento de las BLEE del tipo CTX-M (Kim J. , Lim, Jeong, & Seol, 2005).

Las CTX-M pertenecen al grupo de betalactamasas de clase A, estas enzimas están codificadas en plásmidos transferibles y se encuentran principalmente en las Enterobacterias, como *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). Estas enzimas hidrolizan de manera eficiente antibióticos como la cefotaxima, ceftazidima y cefepime y son inhibidas por clavulanato y tazobactam (Shibata, Kurokawa, Doi, Yagi , & Arakawa, 2006). Se conoce que las Enterobacterias que producen CTX-M son endémicas de América Latina y del norte de Europa (Jones, Guzmán, & Gales, 2011). Además, las CTX-M tienen un impacto clínico significativo debido a su incremento y a su prevalencia en bacterias responsables de enfermedades, por lo cual se está realizando investigación acerca de epidemiología, origen y evolución de los genes *bla* que codifican para las enzimas CTX-M (Delgado, Barrigas, Astudillo, & Ausili, 2016).

### **1.3. Origen y movilización de los genes *bla*CTX-M**

En cuanto al movimiento y propagación de genes de CTX-M, este se da mediante varios mecanismos de transferencia genética dentro de los cuales están los: plásmidos,

transposones, integrones y casetes genéticos (Cantón, González, & Galán, 2012). Los plásmidos son de importancia en la propagación de los genes *bla*CTX-M, ya que poseen la capacidad para transferir los genes de resistencia, facilitando de esta manera la persistencia y prevalencia en las bacterias (Bonnet, 2004). Además, mediante los plásmidos se espera que la persistencia pueda generar una variación genética y aumentar el número de variantes de *bla*CTX-M (Cantón, González, & Galán, 2012). La incorporación de distintos genes cromosómicos relacionados con *bla*CTX-M de diferentes especies de *Kluyvera*, han derivado los distintos grupos de CTX-M encontrados. A diferencia de otros grupos BLEE, las CTX-M son un grupo complejo y no homogéneo de enzimas (Rossolini, 2008).

La diseminación eficiente de los genes que codifican a las enzimas CTX-M de betalactamasas es un problema que apareció en los últimos años, en comparación con la diseminación de otros genes de betalactamasas; por esta razón, se han realizado investigaciones relacionadas a la diseminación genética específicamente de los genes *bla*CTX-M. De acuerdo a los árboles filogenéticos realizados con las CTX-M descritas, éstas se diferencian en 5 grupos. Cada grupo de CTX-M ha sido relacionada a los genes *bla* cromosómicos presentes en diferentes especies de *Kluyvera*, por lo que sugiere la transferencia horizontal de genes con esta especie. En cuanto al género *Kluyvera*, se conoce que son bacterias saprofitas y patógenos oportunistas que forman parte del microbioma normal del intestinal humano (Cantón, González, & Galán, 2012).

Los genes *bla*CTX-M se originan de los cromosomas de especies de *Kluyvera*, asimismo el gen cromosómico *kluC* presente en *Kluyvera cryocrescens*, es considerado el ancestro del grupo CTX-M 1. El gen *kluA* proveniente de *Kluyvera ascorbata* del grupo CTX-M 2 y los tres genes cromosómicos *bla* de *Kluyvera georgiana*, *kluG* y *kluY* son el origen del grupo CTX-M 8 y CTX-M 25 respectivamente. Estos datos sugieren que la fuente ambiental de CTX-M fue el género de *Kluyvera* (Rodríguez, Power, Galleni, & Ayala, 2004);

además, el grupo CTX-M 1 ha sido relacionado con dos especies *Kluyvera* (*K. ascorbata* y *cryocrescens*), lo que indica que los genes *bla*CTX-M también han circulado entre distintas especies del género mencionado (Bevan, Jones, & Hawkey, 2017).

#### **1.4. Diseminación genética**

La diseminación de los genes *bla*CTX-M está asociada a elementos genéticos móviles como transposones, secuencias de inserción (IS) e integrones. Estos elementos genéticos son integrados en estructuras más complejas como diferentes tipos de plásmidos y clones específicos (Bevan, Jones, & Hawkey, 2017).

La importancia de los plásmidos en la diseminación de genes *bla*CTX-M ha sido estudiada desde el inicio de la aparición de este tipo de enzimas, por lo que, es de particular interés los genes *bla*CTX-M del grupo 1, ya que éstos están asociados con los plásmidos FII que son considerados como plásmidos exitosos en llevar resistencia, debido a su propensión para adquirir genes de resistencia y transferirlos entre bacterias. Se ha demostrado que, dentro de estos plásmidos, están presentes distintos tipos de replicones, los cuales promueven una rápida evolución y la diversificación del plásmido (Bevan, Jones, & Hawkey, 2017).

Entre los elementos genéticos principales que se han visto involucrados en la adquisición de los genes *bla*CTX-M, se encuentra las secuencias de inserción (IS) ISEcp1 e ISCR1 y también elementos relacionados con fagos. Se han identificado elementos de secuencia de inserción similares a ISEcp1 en asociación con genes que codifican enzimas de los grupos CTX-M-1, CTX-M-2 y CTXM-9 (Poirel, Naas, & Nordman, 2008). ISEcp1 pertenece a la familia IS1380 y es capaz de movilizar los genes *bla*CTX-M, mediante un proceso de transposición, éste moviliza secuencias adyacentes por transposición, después del reconocimiento de una variedad de secuencias de ADN como repeticiones invertidas a la derecha (IRR). Por lo tanto, una sola copia de ISEcp1 ubicada en el gen *bla*CTX-M es suficiente para movilizar el gen del cromosoma de una cepa de *Kluyvera*. En adición, el

proporcionar secuencias promotoras, ISEcp1 mejora la expresión del gen *bla*CTX-M que es baja en su especie de origen natural, pero alta cuando se moviliza en un plásmido, es decir las secuencias de inserción (IS) participan también en la sobreexpresión de los genes *bla*CTX-M (Poirel, Naas, & Nordman, 2008).

Otro mecanismo de adquisición de los genes *bla*CTX-M está asociada a la inserción de una secuencia mediada por un proceso de transposición, llamado replicación del círculo rodante (RC). Algunos genes *bla*CTX-M aparecen en estructuras de integrón de tipo sul1 que corresponde a integrones de clase 1 (Cantón, González, & Galán, 2012). Los genes *bla*CTX-M no están presentes como casetes de genes, pero se encuentran ubicados en el gen *orf513*, entre las dos repeticiones *qacED1* / *sul1* (Toleman, Bennet, & Wlsh, 2006). El gen *orf513* es parte de la región común CR1, la cual es conocida como una secuencia de inserción. ISCR1 pertenece a la familia IS91 y Orf513 es una transposasa que comparte las características estructurales y funcionales de las transposasas similares a IS91 (Poirel, Naas, & Nordman, 2008). ISCR1 carece de los IR terminales típicos de la mayoría de los elementos de secuencia de inserción y probablemente se transpone diferentemente (Toleman, Bennet, & Wlsh, 2006).

Algunas estructuras a menudo son incorporadas dentro de plásmidos conjugativos y pueden estar presentes en clones exitosos (Cantón, González, & Galán, 2012), por lo que otro aspecto importante es la dispersión clonar y el proceso de co-selección, ya que están asociados a la multiresistencia y virulencia de clones llamados de alto riesgo. Se conoce que en la dispersión de las enzimas CTX-M es de gran importancia la participación de clones específicos principalmente de los provenientes de *E. coli*; por lo que, estudios basados en MLST han demostrado que algunos clones o tipos de secuencias (ST) agrupados en complejos clonales (CC) han sido asociados a las enzimas CTX-M, lo cual sugiere que estos están involucrados en la diseminación de esas enzimas y su adaptabilidad también puede

depender en ST o CC donde están presentes frecuentemente (Cantón, González, & Galán, 2012). Distintos estudios en *E. coli* han demostrado que el clon ST131 está asociado a las enzimas que pertenecen al grupo CTX-M 1 y CTX-M 9. Se sugiere que la multiresistencia pudo facilitar la globalización de este clon. Por otro lado, muchos aislamientos que pertenecen a estos clones de *E. coli* son aislamientos uropatogénicos resistentes a las fluoroquinolonas que poseen su entorno natural en la microbiota intestinal. Finalmente, es importante mencionar que también los genes *bla*CTX-M han sido asociados con secuencias relacionadas a fagos, lo cual indica la involucración de bacteriófagos en la movilización del gen mencionado (Bevan, Jones, & Hawkey, 2017).

### **1.5. Enzimas del tipo CTX-M**

Las CTX-M se clasifican en cinco grupos de acuerdo a la similitud en las secuencias de aminoácidos y estas son: CTX-M 1, CTX-M 2, CTXM-8, CTX-M 9 y CTX-M 25 (Kim J. , Lim, Jeong, & Sung, 2005). De acuerdo a información dentro del GenBank, se han identificado variantes de genes de CTX-M en los diferentes grupos mencionados. El grupo 1 incluye las variantes CTX-M-1, -3, -10, -12,-15, -22,-23, -28, -29 7 -30. En el grupo CTX-M 2 se encuentra CTX-M-2, -4,-5,-6,-7,-8,-17, -20, -31, -35. El grupo 8 incluye a CTX-M-8, -40, -41. El grupo 9 incluye CTX-M-9, -13, -14, -16,-17,-18, -19, -21, -27, -24 y -38. Finalmente, el último grupo incluye CTX-M-25 y CTX-M-26. Las variantes de estos grupos presentan >94% de identidad de aminoácidos dentro de cada grupo y  $\leq 90\%$  de identidad entre los grupos (Pitout , Hossain, & Hanson, N, 2004).

Existe una necesidad del uso de métodos moleculares para la identificación y seguimiento de la aparición de BLEE de tipo CTX-M debido a su alarmante prevalencia (Bevan, Jones, & Hawkey, 2017). Por lo que, a nivel epidemiológico es de suma importancia identificar que grupo es el que está circulando y a su vez causando una resistencia hacia los

antibióticos en infecciones intra y extra hospitalarias (Xu , Ensor, Gossain, Nye, & Hawkey, 2005).

Desde la aparición de CTX-M en el año 2000, estudios han demostrado que los aislamientos de *E. coli* productoras de BLEE del tipo CTX-M es un problema principalmente nosocomial, y su difusión en la comunidad no es muy significativa. Sin embargo, en los últimos años su difusión en la comunidad ha incrementado de manera alarmante principalmente en establecimientos ambulatorios en pacientes con infecciones urinarias (Wollheim, y otros, 2011). Por lo que se considera que estos cambios importantes a nivel epidemiológico están asociados a la rápida diseminación de los genes que codifican las enzimas CTX-M (Casellas, 2011).

Es importante mencionar, que la creciente prevalencia de las enzimas BLEE del tipo CTX-M son una amenaza para el uso clínico de cefalosporinas de tercera generación utilizadas en el tratamiento de infecciones graves. Esto es un problema de salud pública alarmante debido a que, en muestras aisladas, es común detectar resistencia a las cefalosporinas principalmente a cefotaxima, ceftriazona y en algunos casos a ceftazidima (Delgado, Barrigas, Astudillo, & Ausili, 2016).

## **1.6. Epidemiología grupos CTX-M**

Los estudios realizados en los últimos años han revelado un incremento de las enzimas CTX-M en Enterobacteriaceae en todas las regiones geográficas, causando un desplazamiento de otras enzimas del tipo BLEE, incluyendo a TEM y SHV (Bevan, Jones, & Hawkey, 2017). Este desplazamiento ha ocurrido debido a la extraordinaria diseminación de los genes *bla*CTX-M, en plataformas genéticas altamente móviles, como los transposones y plásmidos, y también a la presencia dichas plataformas en clones exitosos. Desde el año 2000 se ha registrado un incremento de aislamientos de *E. coli* productoras de enzimas CTX-M,

involucradas en infecciones urinarias en pacientes hospitalizados y ambulatorios (Hernández, 2010).

La primera descripción de CTX-M ocurrió de manera simultánea en Europa y América del Sur en el año 1989. Se encontró la enzima CTX-M del grupo 1 en Munich, Alemania aislada de *E. coli* en un niño que padecía de Otitis (Hernández, 2010). En el mismo año, en Argentina, se describió la enzima CTX-M perteneciente al grupo 2 en pacientes con meningitis y septicemia, causada por *Salmonella typhimurium*; no obstante, en el año 1996 en España se describió por primera vez la enzima CTX-M del grupo 9 en *E. coli*, aislada de pacientes con infección al tracto urinario (Cantón, González, & Galán, 2012).

En el año 2017, Bevan y otros, indican que globalmente las enzimas CTX-M del grupo 1 y 9 han desplazado a las enzimas de los otros grupos. En Europa se ha incrementado la prevalencia de infecciones al tracto urinario causadas por *E. coli*, productoras de enzimas CTX-M del grupo 1, a excepción de España y Francia, en las cuales se ha observado un incremento de CTX-M pertenecientes al grupo 9 (Bevan, Jones, & Hawkey, 2017). De igual manera, en América del Norte, se ha reportado la prevalencia del grupo 1 y en un menor porcentaje las enzimas CTX-M del grupo 9. En América del Sur, en los últimos años se ha observado una alta prevalencia de los grupos CTX-M-1 y 9 en infecciones urinarias causadas por *E. coli*; y a diferencia de Europa, las variantes de grupo CTX-M 2 también son significativas en esta región (Segarra, Soria, & Cartelle, 2018).

En Ecuador, a nivel general, existe una alta prevalencia de CTX-M del grupo 1,2 y 9 en infecciones urinarias causadas por *E. coli*. Particularmente en las ciudades de Quito y Guayaquil se reportan resultados similares, en los cuales indican una prevalencia de CTX-M del grupo 1 en un 77% aproximadamente (Segarra, Soria, & Cartelle, 2018). Además, se han encontrado genes *bla*CTX-M en muestras aisladas de pacientes con infecciones causadas por Enterobacterias y *Pseudomonas*. En América del Sur, las Enterobacterias poseen una de las

más altas incidencias en el mundo y CTX-M son las más ampliamente distribuidas (Delgado, Barrigas, Astudillo, & Ausili, 2016). Sin embargo, en estudios hospitalarios realizados en la provincia de Loja, Ecuador indican que existe una prevalencia de CTX-M de subtipo 15 que pertenecen al grupo de CTXM-1. Las infecciones a las vías urinarias son las más preocupantes debido a que son varias las personas que acuden a hospitales y a centros de salud de pacientes ambulatorios con esta infección y su tratamiento es más complicado debido a este incremento de resistencia hacia antibióticos (Delgado, Barrigas, Astudillo, & Ausili, 2016).

En Europa el grupo CTX-M-2 no ha sido reportado, por lo que es probable que los genes *bla*CTX-M de dicho grupo hayan evolucionado en América del Sur y posiblemente llegó a Europa, pero carecía de características evolutivas exitosas para competir con los genes *bla*CTX-M dominantes en este continente; por lo que es importante mencionar que el grupo CTX-M-2 fue el primero en ser reportado en 1989 en Argentina (Cantón, González, & Galán, 2012), a diferencia de Europa en el cual, en el mismo periodo se describió solamente genes *bla*CTX-M del grupo 1 (Bevan, Jones, & Hawkey, 2017). Durante los últimos 10 años en Ecuador y en América del Sur se ha observado una disminución de los genes *bla*CTX-M del grupo 2, siendo este desplazado por los grupos CTX-M-1 y 9 principalmente con sus variantes 15 y 14 respectivamente (Zurita, Solis, Romero, Ortega, & Cartelle, 2016). Por lo que es evidente, que el grupo CTX-M-2 es evolutivamente menos exitoso, que dichos grupos (Segarra, Soria, & Cartelle, 2018). Además, un estudio realizado en el Reino Unido indica que una de las posibles causas para el incremento de los genes CTX-M del grupo 1 y 9 es la migración, esto debido a que se demostró que viajeros que visitan países con una alta prevalencia de dicho grupo se convierten en portadores asintomáticos (Wickramasinghe, Xu, & Eustace, 2012). De acuerdo a Wickramasinghe y otros, en el Reino Unido en el 2012, se estudió a un grupo de viajeros que llegaron de India y se encontró que un 75% adquirieron

bacterias productoras BLEE del tipo CTX-M-15 (grupo CTX-M-1). Los genes de resistencia *bla*CTX-M en dicho estudio fueron aislados de *E. coli* en heces fecales

La prevalencia de los genes *bla*CTX-M es mayor en pacientes hospitalarios, sin embargo, ha incrementado significativamente su prevalencia en pacientes ambulatorios. Además, nuevos estudios revelan que la introducción de estos genes de resistencia también se adquiere mediante rutas de exposición como el agua y la comida. Se ha registrado la presencia de *E. coli* productora de CTX-M en agua de Francia y Estados Unidos, principalmente las variantes CTX-M-1, CTX-M-15 y CTX-M-9 que pertenece al grupo CTX-M-1 y CTX-M-9 respectivamente (Franz, Veenman, Hoek, Husman, & Blaak, 2015). Por otro lado, en Ecuador se encontró *E. coli* productora de CTX-M-1 en agua proveniente de un río de la ciudad de Quito, mientras que en el agua destinada al consumo humano no se encontró la presencia de estas enzimas. Sin embargo, se registró la variante CTX-M-15 del grupo CTX-M-1 en vegetales crudos como la alfalfa y lechuga que son distribuidos en la ciudad (Ortega , Barba , Mena, Espinel, & Zurita, 2018). Estos hallazgos sugieren que el agua puede ser una fuente importante de exposición comunitaria de los genes *bla*CTX-M y que estos pueden ser diseminados por bacterias de la familia Enterobacteriaceae que no se detectan en las pruebas microbiológicas estándar del agua (Tanner, 2019).

En el presente estudio se busca conocer el grupo de CTX-M que circula en una población de pacientes ambulatorios que han adquirido infecciones urinarias, de los cuales se aisló *E. coli* uropatógenas productoras de BLEE (beta lactamasas de espectro extendido) obtenido en un estudio previo. En dicho estudio, se aisló *E. coli* uropatógena se determinó que cepas eran BLEE positivas, a través de pruebas moleculares se determinó el tipo de BLEE, CTX-M fue el gen que se identificó en mayor porcentaje, éste resultado sirve como base para el presente investigación.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La capacidad de los microorganismos para generar resistencia a los diferentes antibióticos ha generado un problema de salud pública, es por ello que el fenómeno de resistencia bacteriana principalmente a los antibióticos betalactámicos como las cefalosporinas, es una preocupación que ha llevado a realizar varias investigaciones en el tema (Paterson y otros, 2003). Según el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública del Ecuador (INSPI), en los últimos años se ha encontrado una alta incidencia en la resistencia de los microorganismos que causan infecciones urinarias, como *E. coli* hacia las cefalosporinas (Reyes y otros, 2014). Este es un problema de salud pública debido a implicaciones económicas y terapéuticas que puede causar una mala respuesta a un tratamiento, altos costos de salud y morbilidad de los pacientes (Davies, 2010).

Se conoce que la producción de enzimas betalactamasas es uno de los principales mecanismos de resistencia microbiana, ya que estas son enzimas que inactivan a los betalactámicos. Estudios actuales han demostrado que hay una predominancia de las betalactamasas de amplio espectro (BLEE) (Wageith et al, 2014). Uno de sus grupos principales se denomina CTX-M y se ha observado una prevalencia de este grupo alrededor del mundo (Ghasemi, Archin, Kargar y Mohkam, 2013). Las CTX-M poseen una alta actividad hidrolítica sobre las cefalosporinas principalmente de tercera generación como cefotaxima y ceftriaxona (Bonnet, 2004).

De acuerdo a estudios previos en América del sur, principalmente en países como Colombia y Perú, las CTX-M están ampliamente distribuidas, particularmente el grupo CTX-M 2 seguido del grupo CTX-M 8 y 9. Mientras que, estudios realizados en el Ecuador, indican que existe una mayor prevalencia del grupo CTX-M 1. Esta investigación busca proveer información acerca del grupo de CTX-M que está circulando en una población

ambulatoria, que presentó infección de vías urinarias por *E. coli* uropatógenas productoras de BLEE.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo General:

Identificar los grupos de CTX-M en *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), responsable de infección de vías urinarias, mediante la técnica de PCR.

#### 3.2. Objetivos Específicos:

- Comparar el grupo predominante de CTX-M aislado en pacientes ambulatorios del presente estudio.
- Determinar la co-existencia de genes de *bla*CTX-M en una misma cepa de *E. coli*.
- Determinar a través de la secuenciación la variante de CTX-M que predomina.

### 4. AREA DE ESTUDIO

El presente estudio partió de una investigación previa (Determinación de Betalactamasas de Espectro Extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* a través de pruebas moleculares en urocultivos provenientes de pacientes ambulatorios con infecciones de vías urinarias) (Ortega M. , 2017). En dicho estudio, durante un año se realizó el aislamiento de bacterias a partir de muestras de orina, se procesó 2,281 urocultivos, de los cuales 793 presentaron infecciones urinarias por *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* y 148 de ellos fueron positivos para la prueba fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). A través de pruebas moleculares se determinó que el grupo CTX-M se encontraba

en un porcentaje del 96,67%. Por lo que, para el presente estudio se usó un universo de 100 *E. coli* uropatogénicas BLEE positivas que fueron almacenadas del anterior estudio, las cuales debían cumplir la condición de ser positivas para el gen *blaCTX-M*

## 5. MATERIALES

### 5.1. Extracción de ADN por ebullición

- Ultracongelador -80°C.
- Hisopos estériles
- Medio de cultivo (agar nutritivo)
- Agua destilada estéril
- Estufa
- Tubos eppendorf de 1,5 ml
- Congelador de -20°C.
- Micropipeta
- Puntas de micropeta (100 µl – 1000 µl)

### 5.2. Cuantificación y dilución de ADN

- Puntas de micropipeta ( 20 µl – 200 µl)
- Puntas de micropipeta ( 10 µl – 100 µl)
- Tubos 0,6 ml
- Espectofotómetro NANOVUE General Electric

### 5.3. PCR: Amplificación genes *blaCTX-M*

- Buffer 5X Promega
- Dntps 2mM
- Taq Polimerasa Promega 5U/ul

- MgCl<sub>2</sub> Promega 25mM
- Primers para grupos CTX-M (tabla No.1)
- Tubos Eppendorf 0,2 ml
- Agua libre de ADNAsas y ARNAsas

#### **5.4. Electroforesis gel de agarosa**

- TBE 1X (Tris-borato EDTA)
- Agarosa (Invitrogen)
- Bromuro de Etidio
- Ladder 100pb (Invitrogen)
- Balanza analítica (ADAM)
- Cámara de electrophoresis (LABNET)

## **6. MÉTODOS**

### **6.1. Solicitud al Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos USFQ**

Para empezar con el proyecto de investigación, se solicitó una autorización al Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ). Para ello, se envió una solicitud junto a los formularios de aplicación y se registró la investigación con el código 2017-144T (Anexo A). La autorización fue necesaria debido a que, se utilizó bacterias aisladas de urocultivos de pacientes con infecciones del tracto urinario; sin embargo, el permiso fue registrado como “No consentimiento informado”, ya que las muestras de las cuales se aisló *E. coli*, estaban destinadas a ser descartadas después de los correspondientes análisis, por lo que no existió contacto directo con los pacientes. Se usó una codificación para mantener la confidencialidad de la información del paciente, es decir que dicha información no será usada bajo ninguna circunstancia.

## 6.2. Extracción ADN por el método de ebullición

Para la extracción de ADN, primero se reactivó las bacterias *E. coli* en agar nutritivo y se incubó durante 24 horas a una temperatura de 37°C. Se realizó la técnica de extracción por ebullición. Para empezar con la extracción, se tomó 500µl de agua destilada estéril y se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1.5ml; con la ayuda de un hisopo se colocó de 6-10 colonias aisladas de bacterias en el tubo eppendorf, después de esto, se llevó los tubos a baño maría a una temperatura de 100°C durante 10 minutos; seguido se congeló las muestras a -20°C durante 24 horas. A continuación, se realizó la centrifugación a 1300 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf estéril de 1,5ml y se almacenó en el congelador a una temperatura de -20°C (Fang, Ataker, Hedin y Dornbusch, 2008)

## 6.3. Cuantificación y dilución ADN

Se realizó la cuantificación del ADN mediante el espectrofotómetro NANOVue, siguiendo el protocolo establecido por el equipo. Posterior a ello, se realizó una dilución 50:50 con agua grado PCR, de las muestras que tenían una concentración mayor de 100ng/µl. Finalmente, se realizó una nueva cuantificación del ADN diluido.

## 6.4. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa): Amplificación genes *bla*CTX-M

### 6.4.1. Amplificación de genes específicos de grupo CTX-M-1.

Para la amplificación de los genes específicos del grupo CTX-M 1 se siguió con el protocolo establecido por Xu y colaboradores 2005 con las siguientes modificaciones. Se utilizó una concentración de 0,2 µM para primer forward CTX-M 7 y el primer reverse CTX-M 8 (tabla 1). La amplificación se realizó en un volumen final de 15 µl para cada reacción con una concentración de 1X de buffer; 2mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM de dNTPs; 0,70 U/µl de Taq Polimerasa y finalmente se añadió 5 µl de ADN.

#### **6.4.2. Amplificación de genes específicos de grupo CTX-M-2.**

Para la amplificación de los genes específicos del grupo CTX-M 2 se siguió con el protocolo establecido por Xu y colaboradores 2005, con las siguientes modificaciones. Se utilizó una concentración de 0,4  $\mu\text{M}$  para primer forward CTX-M 17 y el primer reverse CTX-M 18 (tabla 1). La amplificación se realizó en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$  para cada reacción con una concentración de 1X de buffer; 2mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2mM de dNTPs; 0,70 U/ $\mu\text{l}$  de Taq Polimerasa y finalmente se añadió 5  $\mu\text{l}$  de ADN.

#### **6.4.3. Amplificación de genes específicos de grupo CTX-M-8, 25.**

Para la amplificación de los genes específicos del grupo CTX-M 8, 25 se siguió con el protocolo establecido por Xu y colaboradores, 2005 con las siguientes modificaciones. Se utilizó una concentración de 0,6  $\mu\text{M}$  para primer forward CTX-M 19 y el primer reverse CTX-M 20 (tabla 1). La amplificación se realizó en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$  para cada reacción con una concentración de 1X de buffer; 2mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2mM de dNTPs; 0,75 U/ $\mu\text{l}$  de Taq Polimerasa y finalmente se añadió 5  $\mu\text{l}$  de ADN. Los primers CTX-M19 y CTX-M20 fueron utilizados para amplificar a los dos grupos (CTX-M-8 y CTX-M-25) debido a que tienen una similitud de secuencia del 100% y CTX-M-25 posee solo una incompatibilidad en una base en los extremos 59 y 39 con el grupo CTX-M-8.

#### **6.4.4. Amplificación de genes específicos de grupo CTX-M-9.**

Para la amplificación de los genes específicos del grupo CTX-M 9 se siguió con el protocolo establecido por Xu y colaboradores, 2005 con las siguientes modificaciones. Se utilizó una concentración de 0,6  $\mu\text{M}$  del primer forward CTX-M-11 y el primer reverse CTX-M 12 (tabla 1). La amplificación se realizó en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$  para cada reacción con una concentración de 1X de buffer; 2mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2mM de dNTPs; 0,75U/ $\mu\text{l}$  de Taq Polimerasa y finalmente se añadió 5  $\mu\text{l}$  de ADN.

Tabla 1: Primers utilizados para amplificar genes específicos de los grupos CTX-M

Grupos	Primers	Secuencia (5' a 3')
CTX-M grupo 1	F: CTXM7	GCG TGA TAC CAC TTC ACC TC
	R: CTXM8	TGA AGT AAG TGA CCA GAA TC
CTX-M grupo 2	F: CTX17	TGA TAC CAC CAC GCC GCTC
	R: CTX18	TAT TGC ATC AGA AAC CGT GGG
CTX-M grupo 8 y 25/26	F: CTXM19	CAA TCT GAC GTT GGG CAA TG
	R: CTXM20	ATA ACC GTC GGT GAC AATT
CTX-M grupo 9	F: CTXM11	ATC AAG CCT GCC GAT CTG GTTA
	R: CTXM12	GTA AGC TGA CGC AAC GTC TGC

Fuente: (Xu , Ensor, Gossain, Nye, & Hawkey, 2005)

Tabla 2: Concentración de primers

Grupos	Primers	Concentración ( $\mu$ M)	Tamaño producto PCR
CTX-M grupo 1	F: CTXM7	0,2	260
	R: CTXM8	0,2	
CTX-M grupo 2	F: CTX17	0,4	341
	R: CTX18	0,4	
CTX-M grupo 8 y 25/26	F: CTXM19	0,4	300
	R: CTXM20	0,4	
CTX-M grupo 9	F: CTXM11	0,4	293
	R: CTXM12	0,4	

Fuente: (Xu , Ensor, Gossain, Nye, & Hawkey, 2005)

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C por un minuto y extensión a 72°C por 1 minuto y por último una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Tabla 3: Resumen de concentración de reactivos de PCR para la amplificación de los genes específicos de los grupos de CTX-M

Reactivo	Unidad	Grupos			
		CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8,25	CTX-M-9
PCR buffer	X	1,0	1,0	1,0	1,0
MgCl <sub>2</sub>	Mm	1,5	1,5	1,5	1,5
Primer Forward	$\mu$ M	0,20	0,40	0,40	0,40
Primer Reverse	$\mu$ M	0,20	0,40	0,40	0,40
dNTPs	Mm	0,20	0,20	0,20	0,20
Taq polimerasa	U/ $\mu$ l	0,70	0,70	0,75	0,75

## **6.5. Electroforesis del gel de agarosa**

La identificación de los productos amplificados se llevó a cabo mediante la electroforesis de gel de agarosa, para lo cual se utilizó agarosa al 2% en TBE 1X y bromuro de etidio al 1%; con un voltaje de 100V durante 42 minutos. El tamaño de los productos de PCR fue comparado con un ladder de 100pb y los tamaños esperados se encuentran en la tabla 2.

## **6.6. Secuenciación de productos amplificados por PCR**

En un inicio, se seleccionó los primeros productos de PCR obtenidos de los grupos CTX-M-1 y 9 como control positivo y se envió a secuenciar con el fin de tener resultados confiables. Asimismo, al finalizar la amplificación de los genes específicos cada grupo se seleccionó 10 productos de PCR del grupo CTX-M-1, 2 y 9; y los 2 únicos productos de PCR obtenidos del grupo CTX-M-8,25 y se envió a secuenciar a la empresa Functional Bio-Sciences. Las secuencias fueron analizadas en MEGA 7 y su identificación se realizó mediante la comparación con secuencias antes reportadas en la base de datos NCBI (National Center For Biotechnology Information) mediante el programa de alineación de secuencias denominado BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Seguido a ello, se construyó un diagrama de árbol en MEGA 7, para lo cual primero se alinearon las secuencias y se seleccionó la opción de Neighbor-joining tree, que permite establecer relaciones entre las secuencias según su distancia genética. Además, se utilizó el método "bootstrap" basado en 100 réplicas.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Análisis grupos CTX-M en *E. coli* uropatogénicas

Según los datos obtenidos mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional, para la determinación de los grupos de CTX-M, se registró que un 75% de las muestras poseen los genes específicos del grupo CTX-M-1, seguido del 12% del grupo CTX-M-9, un 11% no identificable y finalmente un 2% para el grupo CTX-M-8,25.

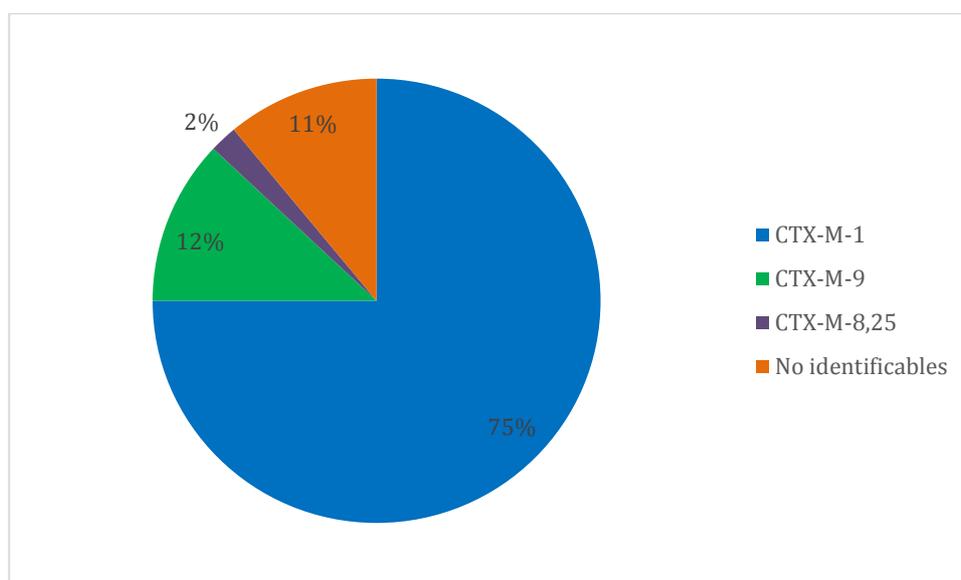


Figura 1: Porcentaje de grupos de CTX-M

### 7.2. Análisis de dos o más genes de grupos CTX-M en *E. coli* uropatogénicas

#### 7.2.1. Análisis de coexistencia de genes específicos del grupo CTX-M-1 y CTX-M-9.

En la figura 2 se indica la coexistencia entre dos genes específicos que pertenecen a distintos grupos de CTX-M. Se observa que el 2% de las muestras obtenidas presentan los genes específicos de los grupos CTX-M-1 y CTX-M-9.

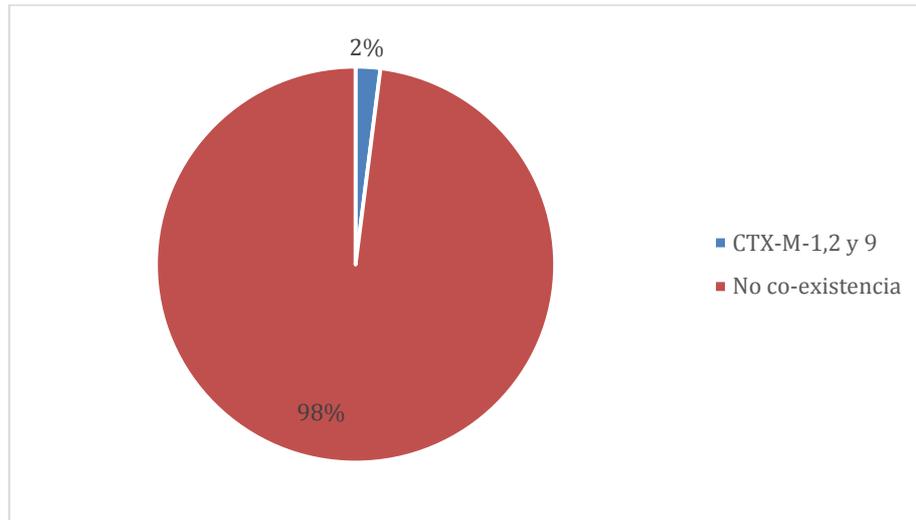


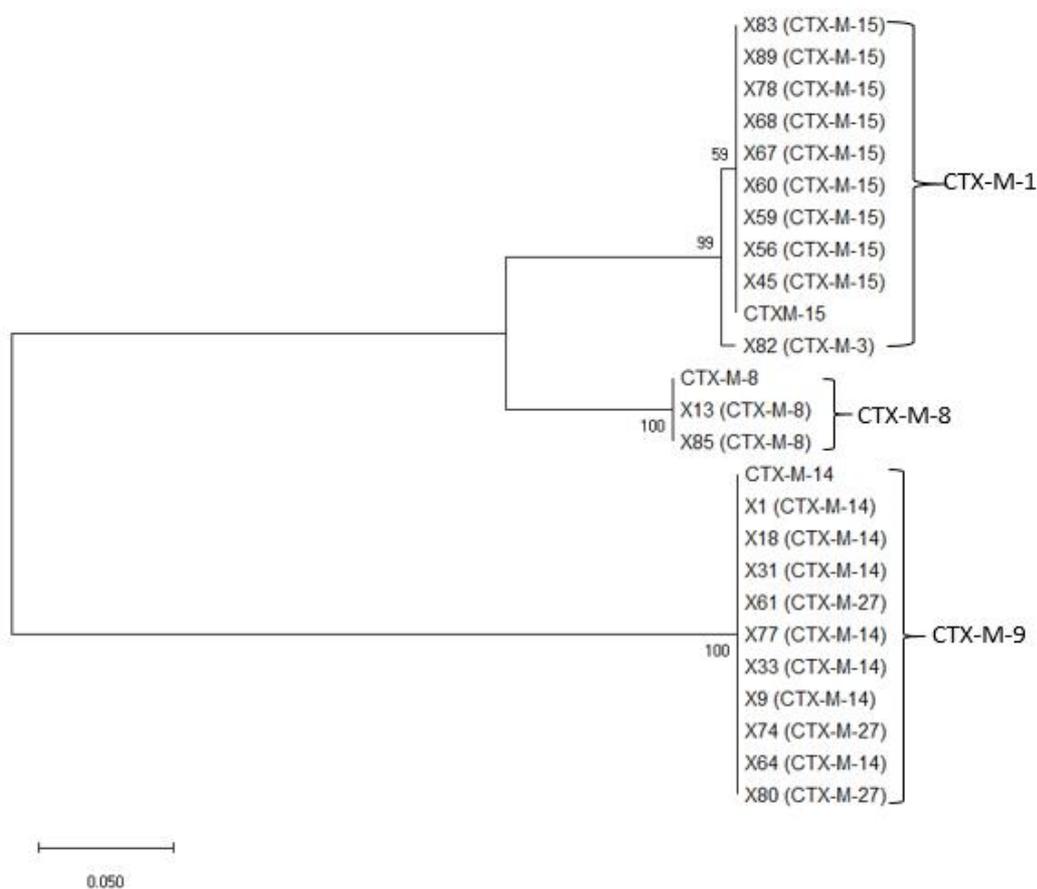
Figura 2: Porcentaje de cepas de *E. coli* que presentan coexistencia entre el grupo CTX-M-2 y CTX-M-8.

### 7.2.2. Análisis *in silico* de *E. coli* uropatógenicas productoras de BLEE del tipo CTX-M

Para el análisis *in silico*, primero se envió a secuenciar 10 muestras que amplificaron para los grupos CTX-M-1, 2, 9 y dos para el grupo CTX-M-8, debido a que solo estas amplificaron en la PCR para dicho grupo. La identificación en el BLAST fue realizada para conocer si efectivamente los grupos CTX-M están presentes en *E. coli* uropatógena. Asimismo, mediante este análisis se identificó la variante de los genes *bla*CTX-M correspondiente de cada grupo presente en las muestras que fueron enviadas a secuenciar. En la tabla 4 se observa la identificación molecular de una de las muestras, donde con un 100% de identidad se identificó a *E. coli* productora de betalactamasas de espectro extendido del grupo CTX-M-1 y la variante CTX-M-15. En el anexo G se indican todos los resultados del análisis *in silico*. Además, en el anexo F se indica el blast de los primers realizados.

Tabla 4: Identificación molecular de las muestras enviadas a secuenciar

Muestra	Identificación molecular	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession number	Grupo	Variante
E. coli 89	<i>Escherichia coli</i> class A extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 (blaCTX-M) gene, blaCTX-M-15 allele, complete cds	335	335	100%	3,00E-88	100%	MK23485.1.1	CTX-M-1	CTX-M-15

Figura 3: Diagrama de árbol de genes blaCTX-M identificados en *E. coli* uropatógenicas

(Fuente: Mega 7)

El diagrama de árbol (Neighbor joining tree) indica la similitud entre las secuencias de los grupos CTX-M. Se asignó la letra X a cada secuencia junto a la variante identificada de cada grupo. Las secuencias obtenidas fueron comparadas en el árbol con secuencias reportadas de cada grupo. El árbol fue generado con MEGA 7 y el método bootstrap se basó

en 100 réplicas. El valor de barra de escala (0,050) indica el número de sustituciones de nucleótidos por sitio.

## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1. Análisis de grupos CTX-M**

Las betalactamasas del tipo CTX-M (CTX-M) son de relevancia clínica y epidemiológica en pacientes comunitarios y hospitalarios. Los estudios realizados se han enfocado principalmente en pacientes hospitalarios debido a que se encuentran sometidos a múltiples procedimientos que favorecen la diseminación de Enterobacterias resistentes. Sin embargo, actualmente el desarrollo de investigaciones relacionadas a la resistencia de Enterobacterias como *E. coli* en infecciones urinarias en pacientes ambulatorios es de gran importancia e interés, debido al incremento alarmante de la resistencia microbiana en este grupo de pacientes causada por CTX-M.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican un alto porcentaje del grupo CTX-M-1 (75%), CTX-M-9 (12%) y finalmente CTX-M-8,25 (2%) (figura 1); mientras que el 11% no fue identificado en ningún grupo CTX-M de los mencionados, por explicaciones que más adelante serán mencionadas. Nuestros resultados concuerdan con los estudios realizados por Delgado y colaboradores 2016, donde indican que Ecuador y países vecinos existe una alta prevalencia los grupos CTX-M-1 y 9.

### **8.2. Análisis de genes específicos del grupo CTX-M-1**

Está ampliamente reportado que las Enterobacterias principalmente *E. coli* uropatógenicas productoras de BLEE poseen una de las incidencias más altas en el mundo y las CTX-M son el tipo de enzimas que más predominan (Delgado, Barrigas, Astudillo, & Ausili, 2016). En particular el grupo CTX-M-1 es el más frecuente globalmente con una

mayor prevalencia en el continente americano, principalmente en América del Sur, en países como Ecuador, Colombia y Perú. Segarra y colaboradores 2018, reportaron que en Guayaquil existe una prevalencia de dicho grupo de 77% en muestras aisladas de *E. coli* uropatógenicas, lo cual se correlaciona con nuestros resultados debido a que se encontró que el 75% de las muestras de *E. coli* uropatógenicas poseen los genes específicos del grupo CTX-M-1. Se conoce que dentro del grupo CTX-M-1 se encuentran las variantes CTX-M-1, -3, -10, -12,-15, -22,-23, -28, -29 7 -30. Es importante mencionar que, en las ciudades de Quito, Guayaquil y Loja se conoce que el mecanismo de resistencia más prevalente es CTX-M-15 que está dentro del grupo CTX-M-1 y confiere resistencia a los antibióticos ceftazidima y cefotaxima. Por lo tanto, al conocer que la variante CTX-M-15 posee una amplia distribución mundial, principalmente en América del Sur, se puede inferir que dicha variante está presente en las cepas de *E. coli* uropatógenicas analizadas. Esta prevalencia se debe a su gran capacidad de diseminación en *E. coli* y otras Enterobacterias mediante los distintos elementos móviles. Por otro lado, León reportó en el año 2014 en Quito, una alta prevalencia de la variante CTX-M-28 en pacientes hospitalarios y ambulatorios con infecciones urinarias, por lo que es posible que dicha variante esté presente en las cepas de *E. coli* uropatógenicas.

En el presente estudio se obtuvo un mayor porcentaje de muestras que poseen los genes específicos del grupo CTX-M-1, el cual está ampliamente distribuido debido a la gran diseminación principalmente de la variante CTX-M-15. Se conoce que la transmisión de los genes *bla*CTX-M-15 tanto en pacientes hospitalarios como ambulatorios ha incrementado de manera que es una amenaza en la salud pública (Upadhyay , Hussain , Mishra, & Mauraya, 2015). Por lo que la variante CTX-M-15 del grupo CTX-M-1 es uno de los genes BLEE ampliamente distribuidos y tiene un impacto significativo en el tratamiento de infecciones adquiridas en el hospital y en la comunidad. La mayoría de los genes *bla*CTX-M-15 encontrados en infecciones nosocomiales y ambulatorias se obtienen de mujeres

diagnosticadas con infección al tracto urinario (ITU), en pacientes hospitalarios inmunodeprimidos y en otras infecciones relacionadas a Enterobacterias en pacientes ambulatorios (Upadhyay , Hussain , Mishra, & Mauraya, 2015).

Se ha registrado una alta prevalencia del gen *bla*CTX-M-15 en carne cruda, vegetales, agua e incluso en alimentos listos, lo cual aumenta significativamente su diseminación colonización principalmente en la flora intestinal (Ortega , Barba , Mena, Espinel, & Zurita, 2018). La incidencia de la variante CTX-M-15 en los alimentos puede servir como reservorio potencial de patógenos prevalentes en entornos hospitalarios y ambulatorios. Por lo que tales situaciones plantean un alto riesgo de exposición de seres humanos sanos a estas cepas resistentes a múltiples fármacos durante el manejo y consumo de carne, vegetales y agua; y pueden contribuir a la colonización de estas cepas en el intestino humano junto con comensales (Wickramasinghe , Xu , & Eustace, 2012). Es importante mencionar que el grupo CTX-M-1 no solo están asociados a infecciones nosocomiales y ambulatorias en humanos, sino también en infecciones en animales domésticos como perros, gatos y vacas; e incluso en aves silvestres (Wang, y otros, 2017). La presencia de los genes CTX-M en aves silvestres sugiere que estos pueden servir como importantes reservorios de bacterias resistentes. A pesar de que el origen de los genes CTX-M no está claro debido a que los animales no están expuestos directamente a los antibióticos, el contacto con aguas residuales o estiércol animal pueden ser la posible forma de diseminación. Por lo tanto, es posible que la contaminación de alimentos y agua por la vida silvestre puede ser un factor de riesgo importante para la transmisión de resistencia (Wang, y otros, 2017).

### **8.3. Análisis de genes específicos del grupo CTX-M-2**

Para el análisis de los genes específicos del grupo CTX-M-2 es importante conocer sus variantes principales, las cuales son: CTX-M-2, -4,-5,-6,-7, -20, -31, -35. En cuanto a los resultados, inicialmente se obtuvo que un 70% de las cepas de *E. coli* aisladas son positivas

para el grupo CTX-M-2. Sin embargo, al enviar a secuenciar 10 de los productos amplificados para este grupo, no se identificó los genes específicos de dicho grupo. Por lo que los resultados obtenidos acerca de este grupo no son confiables. Esto se debe principalmente a que los primers utilizados (CTX-M-17 y CTX-M-18) no son específicos para el grupo CTX-M-2 y pueden amplificar otros genes de *E. coli*. Sin embargo, es importante mencionar que los genes específicos de este grupo son aislados con mayor frecuencia en nuestra región. En países como Bolivia y Brasil, la variante CTX-M-2 posee una alta prevalencia y también es aislada de manera permanente en el continente asiático, a partir de *Proteus mirabilis* de origen comunitario y hospitalario (Nakano, Nakano, Abe, Inoue, & Okamo, 2012). Al ser CTX-M-2 una de las variantes con mayor prevalencia en América del Sur, se puede inferir que en nuestro estudio es posible la presencia de dicha variante en las cepas de *E. coli* uropatogénicas. Por último, Jones y colaboradores en el 2011, indican que existe una tendencia a la producción de CTX-M-2 por *E. coli* y *Proteus mirabilis* uropatogénicas (Dehshiri, M, y otros, 2018).

#### **8.4. Análisis de genes específicos del grupo CTX-M-9**

Dentro del grupo CTX-M-9 se encuentran las variantes CTX-M-9, -13, -14, -16,-17,-18,-19, -21, -27, -24 y -38. Sin embargo, la variante de mayor importancia es CTX-M-14, debido a su amplia distribución principalmente en Europa (Bevan, Jones, & Hawkey, 2017). Se conoce que el grupo CTX-M-9 se encuentra ampliamente distribuido principalmente en Europa y América del norte y en los últimos años se ha reportado un incremento de dicha variante en América del Sur. En cuanto a nuestros resultados se obtuvo un 12% de aislados positivos para el grupo CTX-M-9 y por los casos reportados en el país, se puede inferir que la variante CTX-M-14 sea la que está circulando. A pesar, de ser un grupo de alta distribución mundial, el porcentaje obtenido es bajo comparado con el 75% obtenido para CTX-M-1 , esto se debe principalmente a que en nuestra región dicha variante está incrementando y aún no se

registra una alta prevalencia como en Europa. Además, en algunos casos reportados en el Ecuador existe una mayor prevalencia del grupo CTX-M-9 y su variante CXT-M-14 en Enterobacterias aisladas de pacientes hospitalarios y una menor prevalencia de dicha variante en pacientes de origen comunitario como los analizados en el presente estudio (León, 2014). En relación al tema de una sola salud, es importante destacar que este grupo al igual que los genes específicos de CTX-M-1, han sido aislados en animales como vacas, aves, cerdos y cabras; los cuales sirven de alimento para la población. Por lo que se sugiere, una posible colonización de *E. coli* y de genes de resistencia, específicamente la variante CTX-M-14 perteneciente al grupo CTX-M-1 (Wang, y otros, 2017)

### **8.5. Análisis de genes específicos del grupo CTX-M-8**

La figura 3 indica los resultados obtenidos para el grupo CTX-M-8, en el cual se obtuvo un 2% de cepas de *E. coli* positivas para dicho grupo. Por consiguiente, este es el grupo de CTX-M es el de menor porcentaje del presente estudio. Los resultados obtenidos concuerdan con la literatura debido a que los genes específicos de este grupo poseen la menor prevalencia a nivel mundial y en América del Sur (Dropa, y otros, 2016). Es importante mencionar, que en el grupo 8 las variantes principales son CTX-M-8, -40, -41. En Brasil, la variante CTX-M-8 posee una alta prevalencia después de los genes específicos del grupo CTX-M-1 y 2 (Rocha, Teixeira, & Barrosa, 2015). Asimismo, el grupo CTX-M-25 y sus variantes CTX-M-25 y CTX-M-26 poseen una baja prevalencia en Ecuador, por lo que existen pocos estudios en relación a este grupo. Sin embargo, los genes específicos de este grupo han sido aislados en países del continente asiático (Vervoort, Baraniak, Gazin, & Sabirova, J, 2012). Es importante mencionar, que el grupo CTX-M-25 es relativamente nuevo comparado con los otros grupos y es el menos prevalente. No obstante, ha sido descrito en varias especies de Enterobacterias. La presencia de este grupo en especies

codificadas en diferentes plásmidos y localizadas incluso en el cromosoma sugiere una diseminación basada en integrones (Navon, Chmelnitsky, Leavitt, & Carmeli, 2008).

### **8.6. Dos o más genes de grupos CTX-M en *E. coli* uropatogénicas**

La coexistencia de dos o más betalactamasas del tipo CTX-M en la misma cepa ya no es un evento inusual como hace algunos años atrás. Por lo que es posible que las CTX-M estén evolucionando por recombinación homóloga entre los genes específicos de los diferentes grupos reportados (Li , Zhao, Liu, & Miao, 2016). En los resultados se obtuvo una coexistencia entre los grupos de CTX-M en la misma cepa de *E. coli* uropatogénicas. En la figura 2 se observa que un 2% de las cepas de *E. coli* aisladas poseen los genes específicos de los grupos CTX-M-1 y 9. La coexistencia entre los genes *bla*CTX-M de los grupos 1 y 9 y su prevalencia está incrementando principalmente en países de Asia. Li y colaboradores en el 2016, reportaron la presencia de genes de los grupos CTX-M-1 y CTX-M-9, específicamente de las variantes CTX-M-15 y 14. Esta coexistencia es posible debido a que los genes de dichos grupos poseen varias regiones homólogas, por lo que otras enzimas recombinantes pueden emerger en el futuro (Li , Zhao, Liu, & Miao, 2016). Según Fernández y colaboradores en el 2018, los grupos CTX-M poseen una alta resistencia a las cefalosporinas principalmente a cefotaxima y en un menor porcentaje a otras cefalosporinas como la ceftazidima. Sin embargo, la coexistencia entre los genes CTX-M-15 y 14, poseen una alta resistencia hacia el antibiótico ceftazidima.

Por último, en cuanto a los resultados de *E. coli* uropatogénicas, el 89% de las mismas poseen genes *bla*CTX-M de los grupos 1,8 y 9; mientras que el 11% restante no amplificó para los grupos mencionados. Sin embargo, es posible que dentro de este 11% se encuentren los genes específicos del grupo CTX-M-2 u otro tipo de genes que codifican para las enzimas betalactamasas causantes de la resistencia.

## **8.7. Análisis *in silico* de *E. coli* uropatógenicas productoras de BLEE del tipo CTX-M**

En los últimos años se ha reportado aproximadamente 140 variantes de los genes *bla*CTX-M dentro de los distintos grupos. En el presente estudio, se envió a secuenciar 10 productos amplificados para los grupos CTX-M-1, CTX-M-2 y CTX-M-9 y dos para el grupo CTX-M-8, 25, esto con el fin de conocer si efectivamente se amplificó los genes específicos de CTX-M y para conocer las variantes que predominan en nuestro estudio. Como se mencionó antes, mediante la secuenciación se determinó que los primers utilizados para la amplificación no son específicos para el grupo CTX-M-2 por lo que no se logró tener resultados confiables acerca de este grupo. Además, al realizar un alineamiento de los primers para el grupo CTX-M-2 (CTX-M-17 y CTX-M-18) con las secuencias obtenidas se obtuvo que un 60% de nucleótidos se pegan con los primers en las 10 secuencias analizadas. Estos resultados obtenidos sugieren un error al momento de diseñar los primers, por lo que es importante considerar distintos parámetros para su diseño adecuado.

Por otro lado, como indica la tabla 4, se identificó con un 100% de identidad a las variantes CTX-M-15 y CTX-M-3, las dos pertenecen al grupo CTX-M-1. Estos resultados concuerdan con la literatura, ya que la variante CTX-M-15 presenta una amplia distribución a nivel mundial. Sin embargo, la presencia de la variante CTX-M-3 es un resultado de gran interés debido a que este posee una alta prevalencia en Europa, a diferencia de Ecuador, en donde ha sido reportada en un menor porcentaje (Poirel, Decousser, & Nordmann, , 2003).

Poirel y colaboradores en el 2002 indicaron que la variante CTX-M-15 y CTX-M-3 difieren en un solo aminoácido, por lo que demostraron que esta diferencia da como resultado un aumento en la hidrólisis de la cefotaxima, ceftazidima y la resistencia a los antibióticos por parte de CTX-M-15 en comparación con CTX-M-3 (Kim J. , Lim, Jeong, & Sung, 2005). Esta alta frecuencia de encontrar aislamientos que contienen *bla*CTX-M-15 concuerda con

estudios anteriores en donde *bla*CTX-M-15 es la BLEE más común a nivel mundial. Este predominio creciente del alelo *bla*CTX-M-15 podría deberse a la poderosa capacidad de sus productos genéticos para hidrolizar cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, lo que probablemente ofrece a las bacterias una ventaja selectiva, especialmente cuando los antibióticos múltiples se prescriben de forma constante (Ramadan, Abdelaziz, y Magdy , 2019). Los resultados de la secuenciación también indican una posible asociación del gen *bla*CTX-M-15 con la secuencia de inserción ISEcp1 como indica información previa (Poirel, Naas, & Nordman, 2008). Se conoce que los genes específicos de este grupo se encuentran en una clase de integron tipo I asociada con la secuencia de inserción ISEcp1 adyacente al gen que posiblemente actúa como un factor clave en la dispersión de estos genes. Este modo de diseminación, puede explicar la existencia del mismo gen varios plásmidos (Navon, Chmelnitsky, Leavitt, & Carmeli, 2008).

Por otro lado, se identificó con 100% de identidad a la variante CTX-M-8 que pertenece al grupo del mismo nombre, dos secuencias fueron identificadas de dicho grupo, esto posiblemente se debe a que en nuestra región el gen *bla*CTX-M-8 posee una baja prevalencia (Cantón, González, & Galán, 2012). Sin embargo, es importante mencionar que en Brasil el gen *bla*CTX-M-8 posee una alta prevalencia, siendo así uno de los genes identificados en mayor porcentaje junto con la variante CTX-M-15 (Dropa, y otros, 2016). Además, los resultados de la secuenciación indican que es posible que el gen *bla*CTX-M-8 este asociado a la secuencia de inserción IS26, lo cual concuerda con información previa y con un estudio realizado en Brasil, en donde se encontró que este plásmido es el principal asociado a dicho gen (Dropa, y otros, 2016). Por otro lado, en cuanto al grupo CTX-M-25, no se logró identificar a la variante del mismo nombre, lo cual concuerda con la literatura debido a su baja prevalencia en nuestra región.

Asimismo, se identificó con un 100% al gen *bla*CTX-M-14 y al gen *bla*CTX-M-27, este resultado es similar a lo encontrado en estudios en nuestra región (Delgado, Barrigas, Astudillo, & Ausili, 2016), ya que se conoce que la variante CTX-M-14 tiene una alta prevalencia y está incrementado. Es importante mencionar, que es posible la presencia de secuencias de inserción ISEcp1 y IS26 asociadas a la movilización de estas variantes, lo cual sugiere que estas secuencias están relacionadas a la transferencia de estos genes en los plásmidos y por lo tanto en la rápida diseminación a nivel mundial (Lartigue, Poirel, & Nordmann, 2006). La información previa indica que la secuencia de inserción ISEcp1 es clave para la diseminación de los genes *bla*CTX-M, el mecanismo de movilización generado por este elemento corresponde a una transposición normal. Es posible que los genes *bla*CTX-M y las secuencias similares a ISEcp1 deben haber estado en contacto cercano para permitir la formación de estructuras genéticas híbridas (Poirel, L, Gniadkowski, & Nordmann, 2002). Además, es importante mencionar que los genes *bla*CTX-M poseen la presencia de un promotor fuerte, a diferencia de los genes *bla*klu de *Kluyvera* spp., los cuales no poseen un nivel alto de expresión. En especies de Enterobacterias como *E. coli*, las secuencias similares a ISEcp1 pueden proporcionar un mayor nivel de expresión de los genes *bla*CTX-M ubicados en el plásmido (Poirel, Decousser, y Nordmann, 2003).

Por último, como indica la figura 3, de acuerdo al árbol filogenético obtenido, se estableció las relaciones entre las secuencias de los grupos CTX-M según su distancia genética. Se determinó que las variantes de los genes *bla*CTX-M están agrupados de acuerdo al grupo que pertenecen. Finalmente, es importante mencionar que la evolución de los elementos genéticos que codifican las enzimas CTX-M está mediada por mutaciones aleatorias y la recombinación entre diferentes genes de resistencia, en particular los que codifican las enzimas CTX-M-1 y CTX-M-9. Es decir, desde el punto de vista evolutivo las

CTX-M divergieron por mutaciones puntuales por la presión selectiva de los antibióticos (Cantón, González, & Galán, 2012).

## 9. CONCLUSIONES

- En este estudio se determinó los grupos de CTX-M presentes en *E. coli* uropatógenicas, se obtuvo que un 75% de las bacterias analizadas presentan los genes específicos del grupo CTX-M-1, seguido del 12% de los genes específicos de CTX-M-9 y un 2% para el grupo CTX-M-8, el grupo CTX-M-2 no se pudo identificar.
- Se identificó la presencia de dos genes *bla*CTX-M en una misma cepa, en donde se encontró los genes específicos de los grupos CTX-M-1 y 2 en un 2%. Dicha coexistencia sugiere una recombinación homóloga entre los genes específicos de los diferentes grupos de CTX-M. Es posible que en un futuro se registre una mayor prevalencia entre los genes de resistencia de CTX-M.
- Los resultados de la secuenciación indicaron la presencia de las variantes CTX-M-15, CTX-M-3, CTX-M-8, CTX-M-25, CTX-M-14 y CTX-M-27, lo cual concuerda con la literatura ya que estas son las variantes con mayor prevalencia en el Ecuador. Además, se determinó que los resultados obtenidos del grupo CTX-M-2 no son confiables debido a que los primers utilizados no son específicos y pueden amplificar otros genes de *E. coli*.

## 10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un estudio de los grupos y genes *bla*CTX-M en un universo más grande que incluya muestras hospitalarias y comunitarias en diferentes provincias del Ecuador, para de esta manera conocer lo que ocurre a nivel nacional respecto a la resistencia por parte de Enterobacterias productoras de BLEE del tipo CTX-M. Por otro

lado, una sola salud se refiere a que factores ambientales pueden afectar a la salud humana, por lo que se recomienda investigar la distribución de los tipos de CTX-M con este enfoque. Es decir, analizar la presencia de los genes *bla*CTX-M en humanos, animales y a nivel ambiental, y de esta forma entender la relación entre ellos

- Diferentes elementos genéticos móviles están involucrados en la diseminación de genes *bla*CTX-M, entre ellos las secuencias de inserción como los ISEcp1 que son las más frecuentes, por ello se recomienda realizar estudios de los elementos móviles con los plásmidos asociados a la diseminación de los grupos CTX-M; y de esta manera conocer los elementos involucrados en la movilización de estos genes.
- Durante los últimos años se ha registrado la presencia de dos o más genes *bla*CTX-M en una misma cepa de *E. coli*, por lo que es necesario realizar estudios que determinen esta coexistencia en el Ecuador y de esta manera identificar su prevalencia a nivel nacional.
- Los genes *bla*CTX-M están presentes en las Enterobacterias, por lo que es importante analizar la prevalencia de estos en genes en otras Enterobacterias.
- Realizar secuenciación de todas las muestras que amplificaron para los grupos de CTX-M para conocer las variantes presentes, ya que en el presente estudio se identificaron las variantes de CTX-M en 32 de las 100 muestras analizadas.
- Se recomienda estandarizar la PCR múltiple para la identificación de los grupos CTX-M simultáneamente.
- En relación a los primers utilizados para la PCR, es importante su adecuada selección para lograr los objetivos propuestos. Por lo que se recomienda utilizar nuevos primers con mayor especificidad para el grupo CTX-M-2 y de esta manera conocer si el 11% de las cepas que no amplificaron para los otros grupos, poseen los genes específicos de CTX-M-2.

- Se recomienda realizar una comparación de las secuencias del grupo CTX-M-2 con los primers utilizados (CTX-M-17 y CTX-M-18).

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bevan, E., Jones, A., & Hawkey, P. (2017). Global epidemiology of CTX-M b-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother*, 72, 2145-2155.
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.*, 48, 1-14.
- Cantón, R., González, J., & Galán, J. (2012). CTX-M enzymes: origin and diffusion. . *Frontiers in microbiology*, 3(110), 1-19.
- Casellas, J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev. Panam Salud Pública*, 30(6), 519-528.
- Davies, J. (2010). Origins and Evolution of antibiotic resistance, *Microbiol. Biol.Rev.* 74: 417:433
- Dehshiri, M, Sajjad, S., Mohammad, Z., Abdolmajid, S., Parhizgari, N., Hossein, M., . . . Sharifi, A. (2018). The frequency of Klebsiella pneumonia encoding genes for CTX-M, TEM-1 and SHV-1 extended-spectrum beta lactamases enzymes isolated from urinary tract infection. *Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 17(4), 2-7.
- Delgado, D., Barrigas, Z., Astudillo, S., & Ausili, A. (2016). Detection and molecular characterization of beta lactamasa genes in clinical isolates of Gram negative bacteria in Southern Ecuador. . *The Brazilian Journal of Infection Diseases*, 20(6), 627-630.
- Dropa, M., Lincopan, N., Balsalobre, L., Oliveira, D., Moura, R., & Rodríguez, M. (2016). Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing

- Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 4953–4958.
- Fang, H., Ataker, F., Hedin, G., & Dornbusch, K. (2008). Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum B-Lactamases among Escherichia coli Isolates Collected in a Swedish Hospital and Its Associated Health Care Facilities from 2001 to 2006. *Journal of Clinical Microbiology*, 707-712.
- Flores, A., Caparon, M., Hultgren, S., & Walker, J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 1-15.
- Forsyth, V., Armbruster, C., Smith, S., Pirani, A., Springman, C., Walters, M., . . . Mobley, H. (2018). Rapid Growth of Uropathogenic Escherichia coli during Human Urinary Tract Infection. *American Society For Microbiology*, 9(2), 1-12.
- Franz, E., Veenman, C., Hoek, A., Husman, A., & Blaak, H. (2015). Pathogenic Escherichia coli producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases isolated from surface water and wastewater. *Nature*, 14372, 1-8.
- Ghasemi, Y., Archin, T., Kargar, M y Mohkam, M. (2013). A simple multiplex PCR for assessing prevalence of extended-spectrum Beta-lactamases producing *Klebsiella pneumonia* in Intensive Care Units of a referral hospital in Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10: 703-707
- Hernández, E. (2010). E. coli productores de BLEE aislados de urucultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria. España: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina.
- Johnson, J. (1991). Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. *American Society For Microbiology*, 4(1), 81-89.

- Jones, R., Guzmán, M., & Gales, A. (2011). Susceptibility rates in Latin America nations: report from regional resistance surveillance program. *Braz J Infect Dis.*, 17, 672-818.
- Kim, J., Lim, Y., Jeong, Y., & Seol, S. (2005). Occurrence of CTX-M3, CTX-M15, CTX-M14 y CTX-M9. Extended Spectrum Lactamases in Enterobacteriaceae Clinical Isolates in Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), 1572-1575.
- Lartigue, M., Poirel, L., & Nordmann, P. (2006). Diversity of genetic environment of blaCTX-M genes. *Microbiology Letters*, 234(2), 201-207.
- León, A. (2014). *Determinación de variantes genéticas de enzimas betalactamasas procedentes de cepas bacterianas aisladas de Centros Hospitalarios en Quito*. (Tesis de pregrado), Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Li, S., Zhao, M., Liu, J., & Miao, Z. (2016). Prevalence and Antibiotic Resistance Profiles of Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing Escherichia coli Isolated from Healthy Broilers in Shandong Province, China. *Journal of Food Protection*, 79(7), 1169-1173.
- Nakano, R., Nakano, A., Abe, M., Inoue, M., & Okamoto, R. (2012). Regional outbreak of CTX-M-2  $\beta$ -lactamase-producing *Proteus mirabilis* in Japan. *Journal of Medical Microbiology*, 61(12), 1727-1735.
- Navon, S., Chmelnitsky, I., Leavitt, A., & Carmeli, Y. (2008). Dissemination of the CTX-M-25 family  $\beta$ -lactamases among *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* and identification of the novel enzyme CTX-M-41 in *Proteus mirabilis* in Israel. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(2), 289-295.
- Oromi, J. (2000). Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Elsevier*, 26(10), 367-405.
- Ortega, D., Barba, P., Mena, S., Espinel, N., & Zurita, J. (2018). *Escherichia coli* hyperepidemic clone ST410-A harboring bla CTX-M-15 isolated from fresh

- vegetables in a municipal market in Quito-Ecuador. *International Journal of Food Microbiology*, 280, 41-45.
- Ortega, M. (2017). Determinación de Beta-lactamasas de Espectro Extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* a través de pruebas moleculares en urocultivos provenientes de pacientes ambulatorios con infecciones de vías urinarias. Quito.
- Paterson, D., Hujer, K., Hujer, A., Yeiser, B., Bonomo, M., Rice, L., & Bonomo, R. (2003). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 47(11), 3554-3560.
- Pitout, J., Hossain, A., & Hanson, N. (2004). Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5715-5721.
- Poirel, L., L., Gniadkowski, M., & Nordmann, P. (2002). Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 1031–1034.
- Poirel, L., Decousser, J., & Nordmann, P. (2003). Insertion Sequence ISEcp1B Is Involved in Expression and Mobilization of a blaCTX-M  $\beta$ -Lactamase Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), 2938-2945.
- Poirel, L., Naas, T., & Nordman, P. (2008). Genetic support of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol*, 14(1), 75-81.
- Ramadan, A., Abdelaziz, N., & Magdy, A. (2019). Novel blaCTX-M variants and genotype-phenotype correlations among clinical isolates of extended spectrum beta lactamase-producing *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 9(4224), 1-12.
- Reyes, J., Vásquez, R., Villacis, J., Villavicencia, F., Ushiña, L., et al. (2014). Resistencia bacteriana en el Ecuador 2014. Recuperado el 04 de Octubre de 2018 de:

[https://www.researchgate.net/publication/277597647\\_Resistencia\\_Bacteriana\\_en\\_el\\_Ecuador\\_2014](https://www.researchgate.net/publication/277597647_Resistencia_Bacteriana_en_el_Ecuador_2014)

- Rocha, F., Teixeira, V., & Barrosa, F. (2015). The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum B-Lactamases in Brazil: A Systematic Review. *Microbial Drug Resistance*, 0, 3-11.
- Rodríguez, M., Power, M., Galleni, A., & Ayala, J. (2004). Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob. Agents Chemother*, 48, 4895–4897.
- Rossolini, G. (2008). The spread of CTX-M extended spectrum beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Infect*, 14: 33-41
- Segarra, C., Soria, E., & Cartelle, G. (2018). High Prevalence of CTX-M 1 Like Enzymes in Urinary Isolates of *E. coli* in Guayaquil, Ecuador. *Liberpub*, 0(0), 2-9.
- Shibata, N., Kurokawa, H., Doi, Y., Yagi, Y., & Arakawa, Y. (2006). PCR Classification of CTX-M Type Lactamase Genes Identified in Clinically Isolated Gram Negative Bacilli in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherap*, 50(2), 791-795.
- Tanner, W. (2019). Multi-state study of Enterobacteriaceae harboring extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase genes in U.S. drinking water. *Nature*, 9(3938), 1-8.
- Toleman, M., Bennet, P., & Wlsh, T. (2006). Common Regions orf513 antibiotic resistance: IS91-like elements involving complex class 1 integrons. *J Antimicrob Chemother*, 58, 1-6.
- Upadhyay, S., Hussain, A., Mishra, S., & Mauraya, P. (2015). Genetic Environment of Plasmid Mediated CTX-M-15 Extended Spectrum Beta-Lactamases from Clinical and Food Borne Bacteria in North-Eastern India. *PLOS ONE*, 11, 1-11.

- Vervoort, J., Baraniak, A., Gazin, M., & Sabirova, J. J. (2012). Characterization of two new CTX-M-25-group extended-spectrum  $\beta$ -lactamase variants identified in *Escherichia coli* isolates from Israel. *PLOS ONE*, 7(9), 463-92.
- Wageith, E., Wafy, A., Nashwa, et al. (2014). Multiplex PCR for detection of *bla* CTX-M Genes among the extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) Producing Gram-negative Isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 23(3): 107-114
- Wang, K., Ma, Z., Zeng, Z., Yang, X., Huang, Y., & Liu, J. (2017). The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. *Zoo Res*, 38(4), 212.
- Wickramasinghe, N., Xu, L., & Eustace, A. (2012). High community faecal carriage rates of CTX-M ESBL-producing *Escherichia coli* in a specific population. *J Antimicrob Chemother*, 1108-1113.
- Wollheim, C., Guerra, M., Conte, V., Schreiner, F., Delamare, A., . . . Costa, S. (2011). Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLA) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. . *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(2), 138-143.
- Xu, L., Ensor, V., Gossain, S., Nye, K., & Hawkey, P. (2005). Rapid and simple detection of *bla*CTX-M genes by multiplex assay. *Journal of Medical Microbiology*, 54(12), 1183-1187.
- Yan, J., Ko, W., & Tsai, S. (2000). Dissemination of CTX-M 3 and CTX-M 2  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *E. coli* in southern Taiwan. *J Clin Microbiol*, 38(3), 3420-4325.
- Zurita, J., Solis, M., Romero, J., Ortega, D., & Cartelle, M. (2016). Characterization and Clinical Impact of Bacteremia Caused by ESBL-Producing *E. coli* in a Third Level Hospital in Ecuador. *Zurita&Zurita*.

## 12. ANEXOS

### Anexo A: Solicitud Comité de Bioética

2017-144T



Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos  
Universidad San Francisco de Quito

El Comité de Revisión Institucional de la USFQ  
The Institutional Review Board of the USFQ

Aprobación MSP, Oficio No. MSP-VGVS-2016-0244-O, 26 de Abril de 2016

Quito, 03 de abril de 2018

Señorita  
Doménica Alejandra Vargas Arias  
Investigadora Principal  
UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO  
Ciudad

De mi mejor consideración:

Por medio de la presente, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito se complace en informarle que su solicitud de revisión y aprobación del estudio de investigación **“Determinación de grupos de CTX-M de E.coli uropatógenas productoras de beta lactamasa de espectro extendido (BLEE) mediante pruebas moleculares”**, ha sido aprobada el día de hoy como un estudio expedito, debido a que la investigación va a tomar datos personales pero el investigador asegura que serán codificados para el análisis y presentación de los resultados y una vez concluido el estudio cualquier dato que pudiese identificar al participante será borrado.

El CEISH - USFQ aprueba el estudio ya que cumple con los siguientes parámetros:

- El proyecto de investigación muestra metas y/o objetivos de significancia científica con una justificación y referencias.
- El protocolo de investigación cuenta con los procedimientos para minimizar sus riesgos de sus participantes.
- El protocolo cuenta con provisiones para proteger la privacidad y confidencialidad de los participantes del estudio en sus procesos de recolección, manejo y almacenamiento de datos
- El protocolo detalla las responsabilidades del investigador

Además el investigador principal de este estudio ha dado contestación a todas las dudas y realizado todas las modificaciones que este Comité ha solicitado en varias revisiones. Los documentos que se aprueban y que sustentan este estudio es la versión # 1 de marzo 21, 2018 que incluyen:

- Solicitud de revisión y aprobación de estudio de investigación, 5 páginas;
- Solicitud de NO aplicación al consentimiento informado por escrito, 2 páginas;
- Hoja de vida de la investigadora principal, 1 página;
- Hoja de vida de la co- investigadora principal, 2 páginas.

Casilla Postal 17-12-841, Quito, Ecuador  
[comitebioetica@usfq.edu.ec](mailto:comitebioetica@usfq.edu.ec)  
PBX (593-2) 297-1700 ext 1149

2017-144T

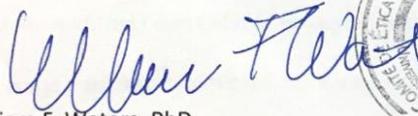
Esta aprobación tiene una duración de **un año (365 días)** transcurrido el cual se deberá solicitar una extensión si fuere necesario. En toda correspondencia con el Comité de Bioética favor referirse al siguiente código de aprobación: **2017-144T**. El Comité estará dispuesto a lo largo de la implementación del estudio a responder cualquier inquietud que pudiese surgir tanto de los participantes como de los investigadores.

Favor tomar nota de los siguientes puntos relacionados con las responsabilidades del investigador para este Comité:

1. El Comité no se responsabiliza por los datos que hayan sido recolectados antes de la fecha de esta carta; los datos recolectados antes de la fecha de esta carta no podrán ser publicados o incluidos en los resultados.
2. El Comité ha otorgado la presente aprobación en base a la información entregada por los solicitantes, quienes al presentarla asumen la veracidad, corrección y autoría de los documentos entregados.
3. De igual forma, los solicitantes de la aprobación son los responsables por la ejecución correcta y ética de la investigación, respetando los documentos y condiciones aprobadas por el Comité, así como la legislación vigente aplicable y los estándares nacionales e internacionales en la materia.

Deseándole los mejores éxitos en su investigación, se solicita a los investigadores que notifiquen al Comité la fecha de terminación del estudio.

Atentamente,



William F. Waters, PhD  
Presidente Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos USFQ  
cc. Archivo general, Archivo protocolo

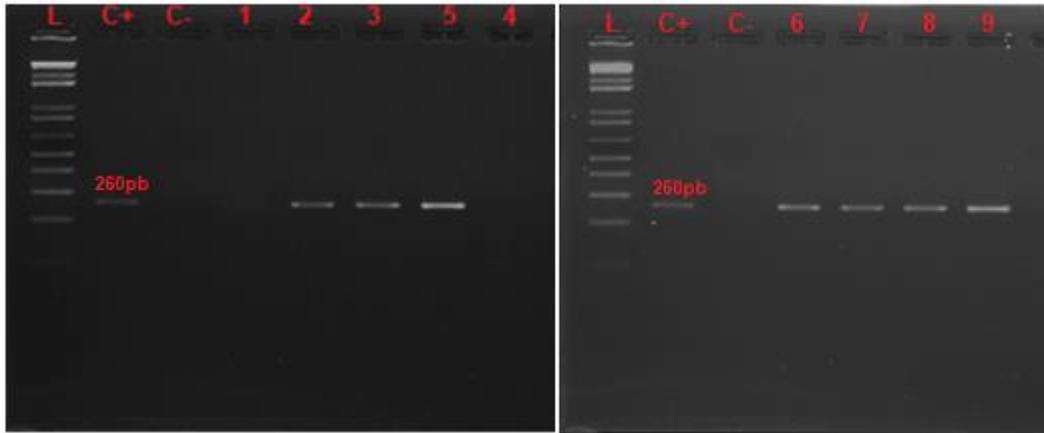
**Anexo B: Amplificación de los genes específicos del grupo CTX-M-1**

Imagen 1: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-1.  
Muestra *E. coli* 1 a *E. coli* 9

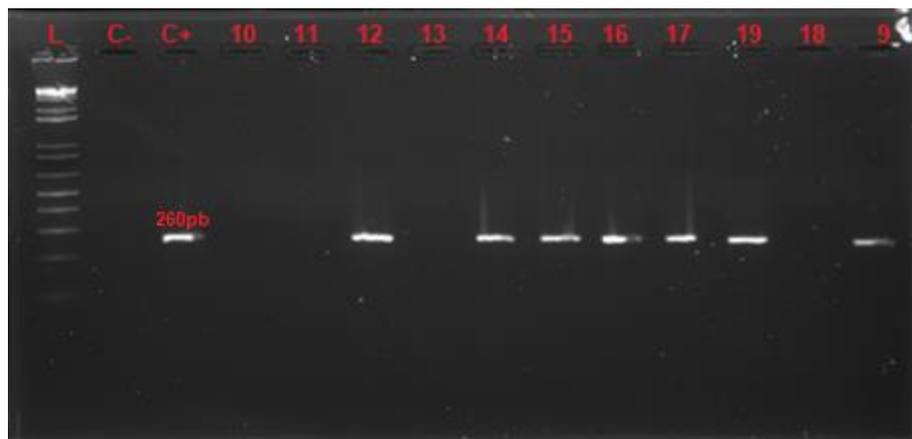


Imagen 2: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-1.  
Muestra *E. coli* 10 a *E. coli* 19

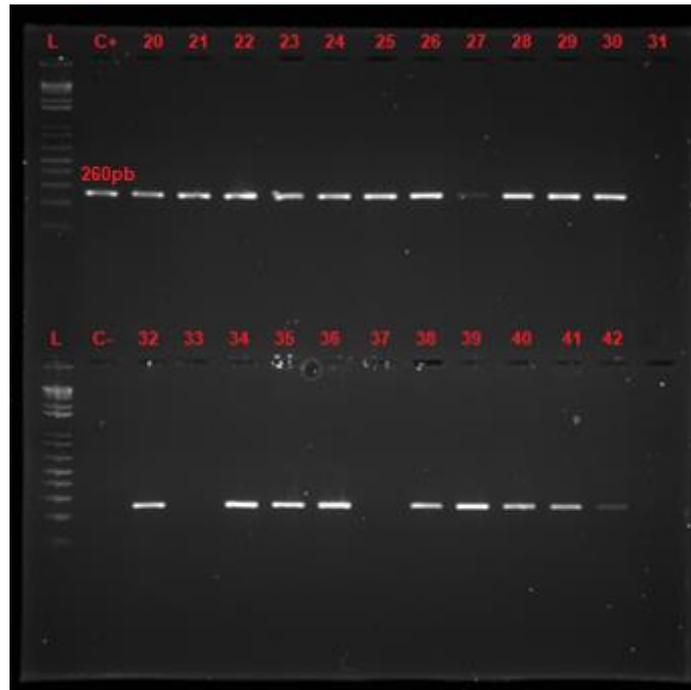


Imagen 3: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-1.  
Muestra *E. coli* 20 a *E. coli* 42



Imagen 4: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-1.  
Muestra *E. coli* 42 a *E. coli* 65

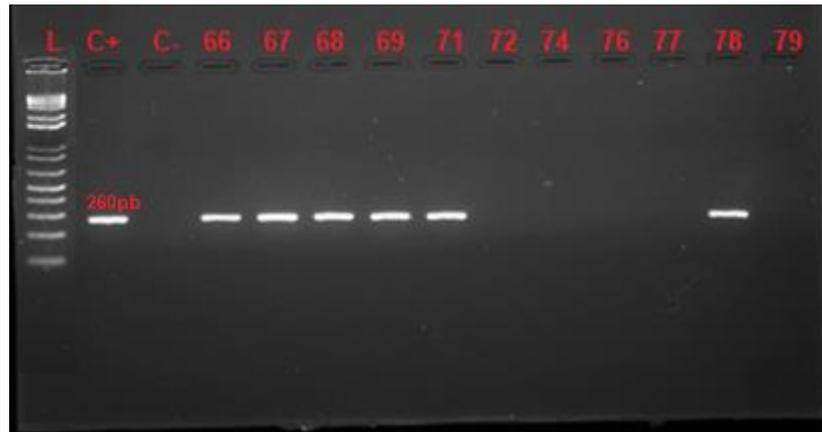


Imagen 5: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-1.  
Muestra *E. coli* 66 a *E. coli* 79



Imagen 6: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-1.  
Muestra *E. coli* 80 a *E. coli* 104

**Anexo C: Amplificación de los genes específicos del grupo CTX-M-2**



Imagen 7: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-2.  
Muestra *E. coli* 1a *E. coli* 22



Imagen 8: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-2.  
Muestra *E. coli* 23 a *E. coli* 44

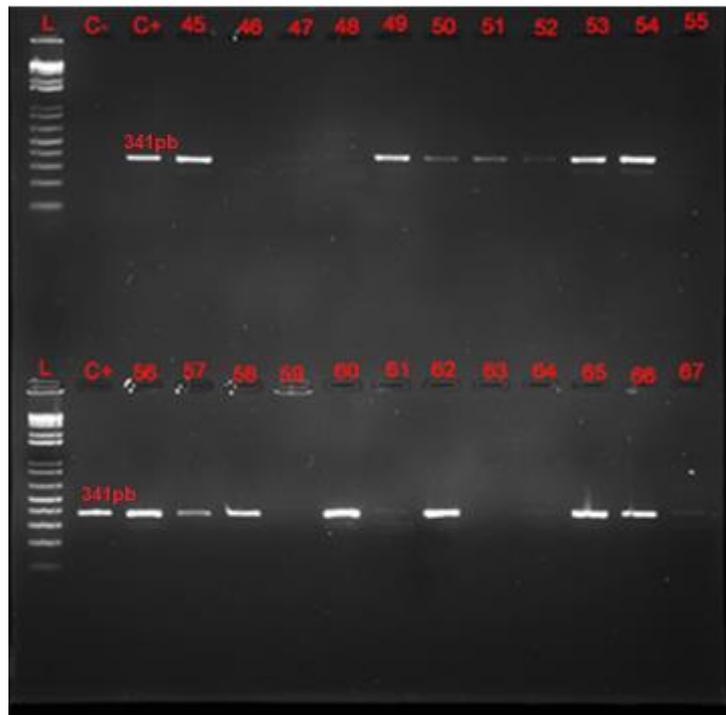


Imagen 9: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-2.  
Muestra *E. coli* 45 a *E. coli* 67

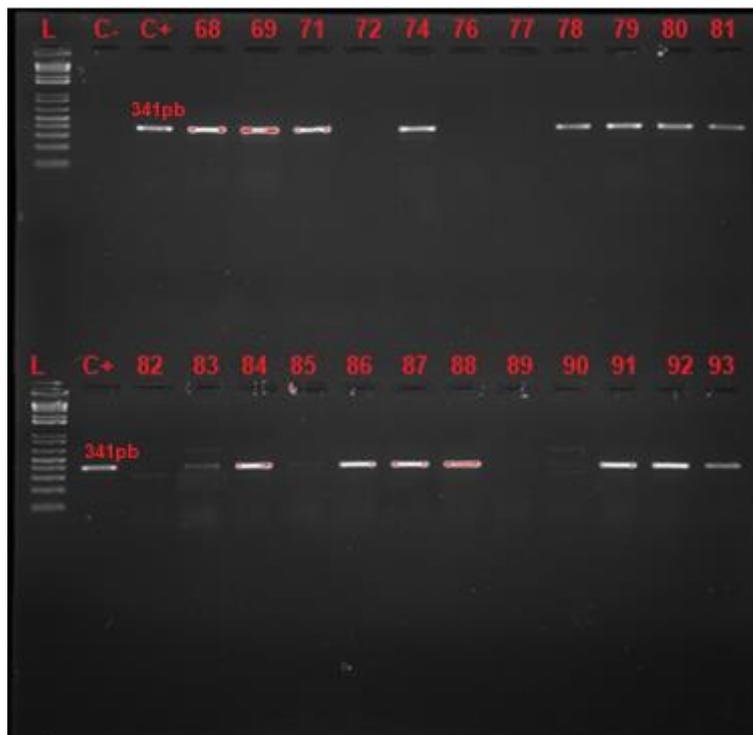


Imagen 10: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-2.  
Muestra *E. coli* 68 a *E. coli* 93

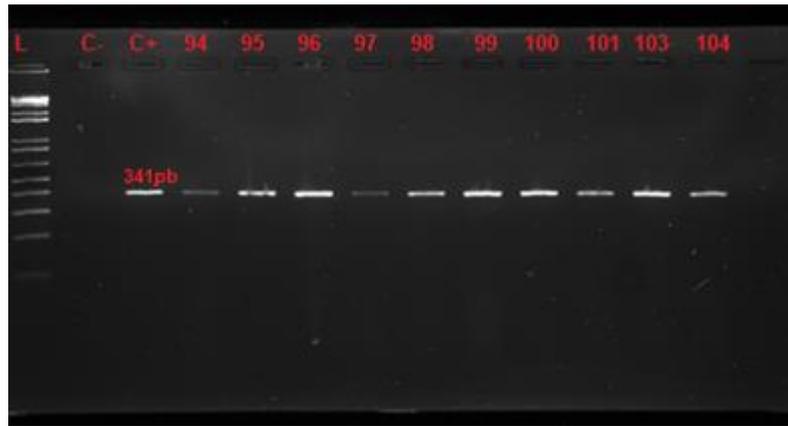


Imagen 11: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-2.  
Muestra *E. coli* 94 a *E. coli* 104

**Anexo D: Amplificación de los genes específicos del grupo CTX-M-8**

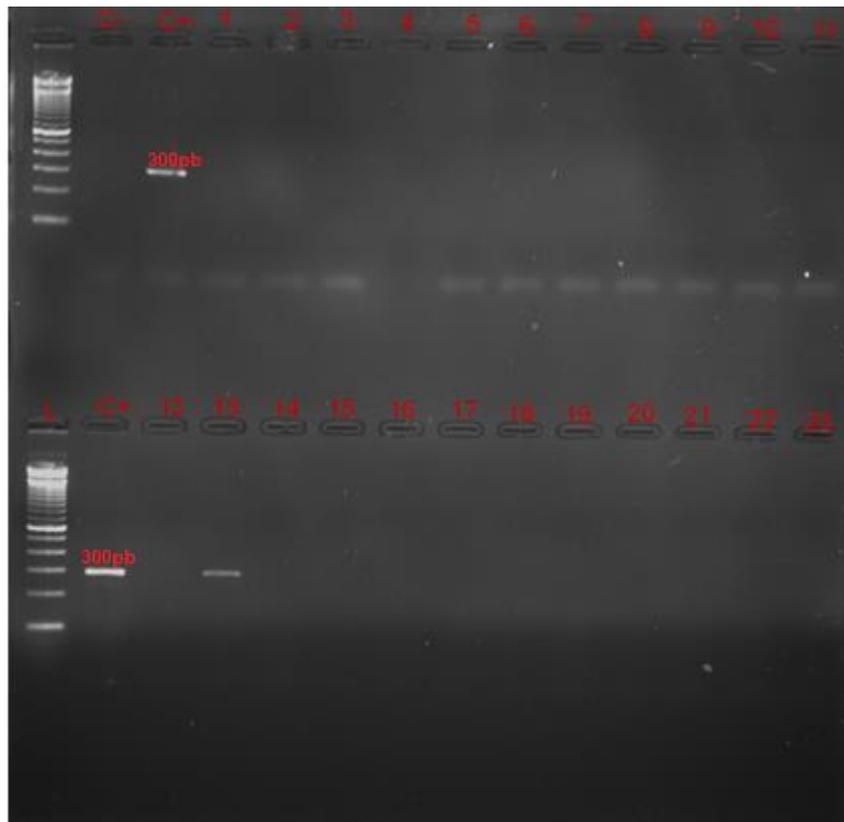


Imagen 12: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-8.  
Muestra *E. coli* 1 a *E. coli* 23

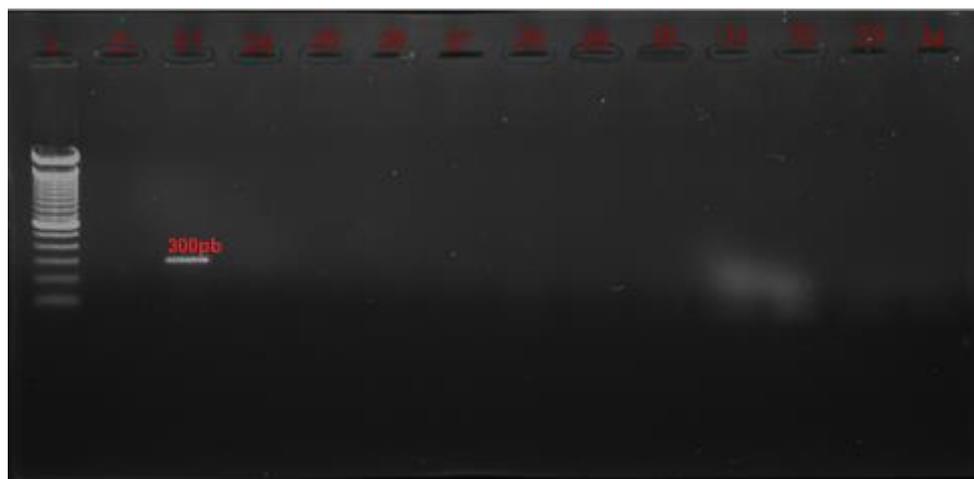


Imagen 13: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-8.  
Muestra *E. coli* 24 a *E. coli* 34

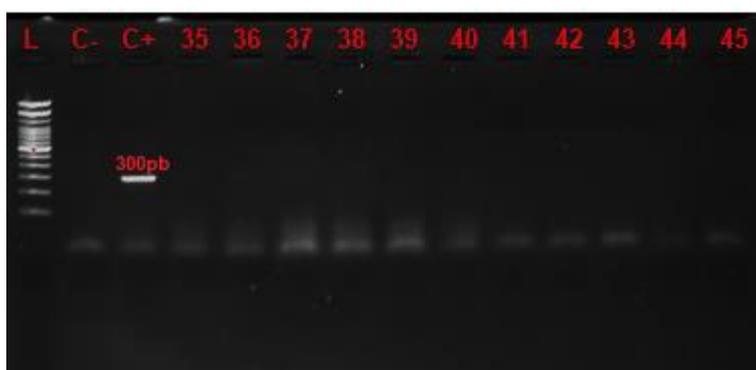


Imagen 14: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-8.  
Muestra *E. coli* 35 a *E. coli* 45

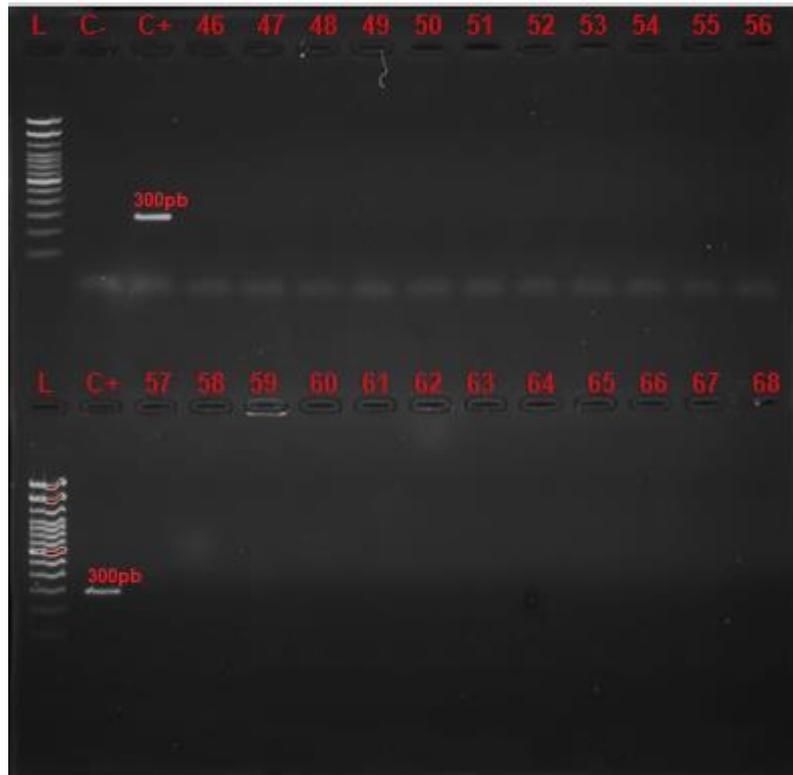


Imagen 15: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-8.  
Muestra *E. coli* 46 a *E. coli* 68

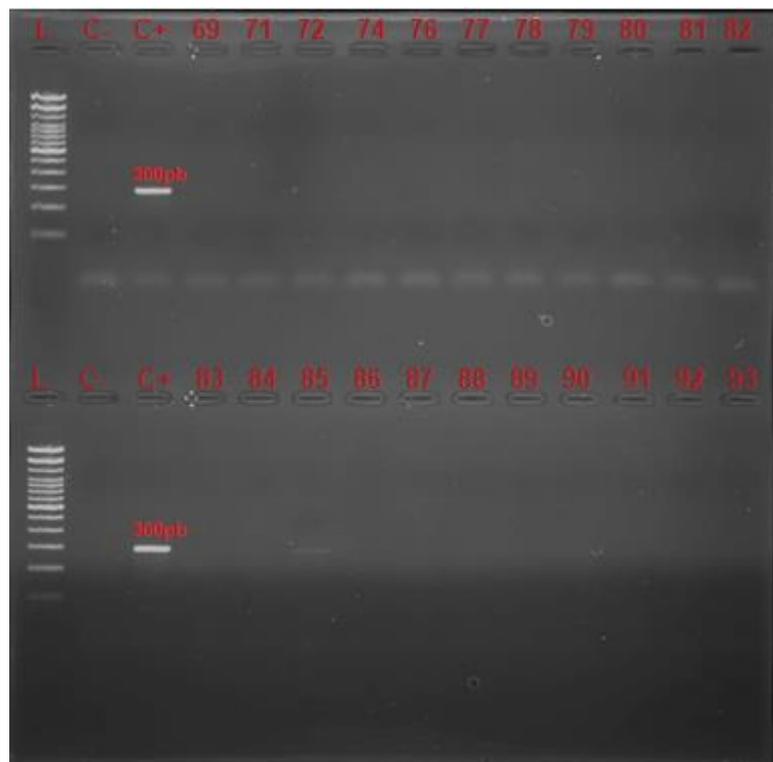


Imagen 16: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-8.  
Muestra *E. coli* 69 a *E. coli* 93

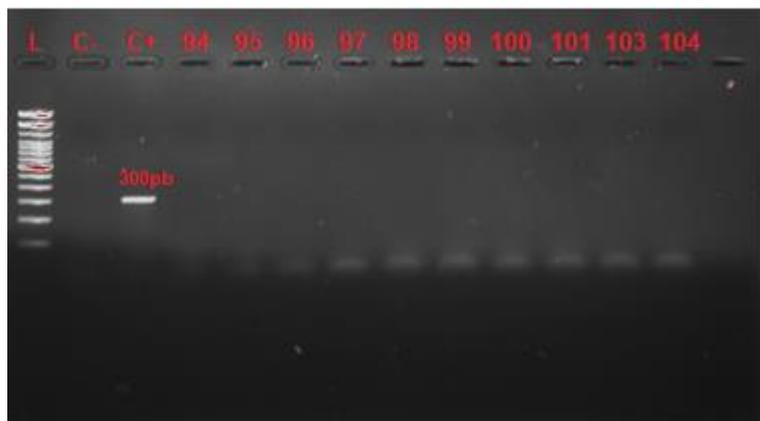


Imagen 17: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-8.  
Muestra *E. coli* 94 a *E. coli* 104

#### Anexo E: Amplificación de los genes específicos del grupo CTX-M-9



Imagen 18: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-9.  
Muestra *E. coli* 1 a *E. coli* 11

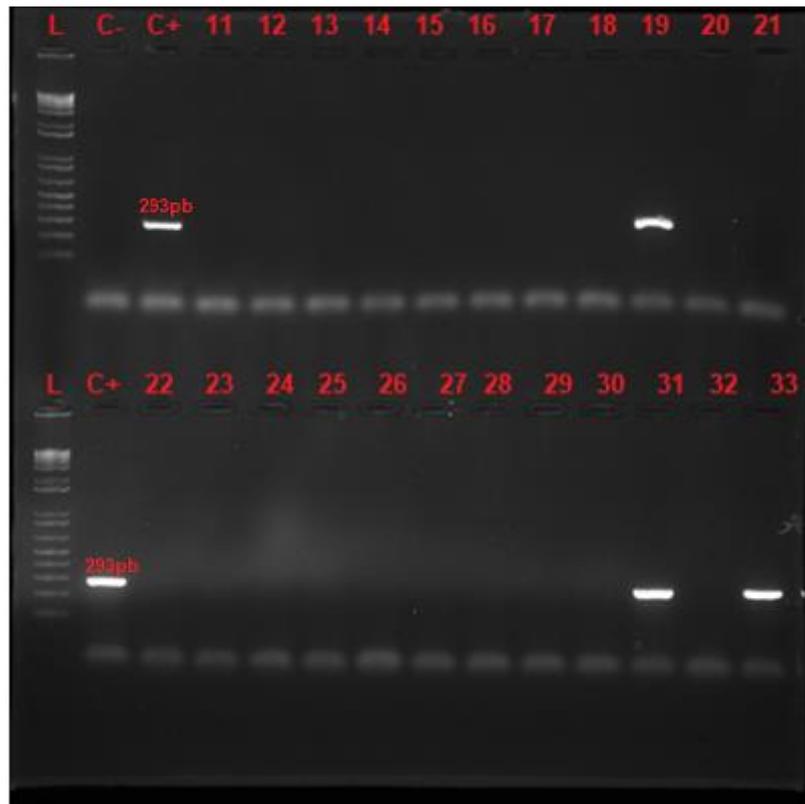


Imagen 19: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-9.  
Muestra *E. coli* 11 a *E. coli* 33

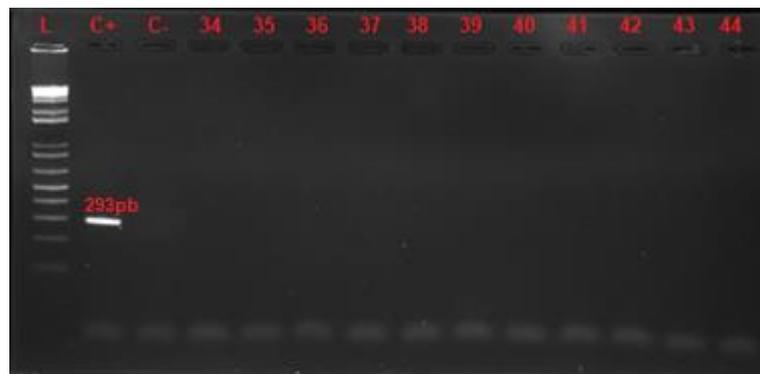


Imagen 20: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-9.  
Muestra *E. coli* 34 a *E. coli* 44

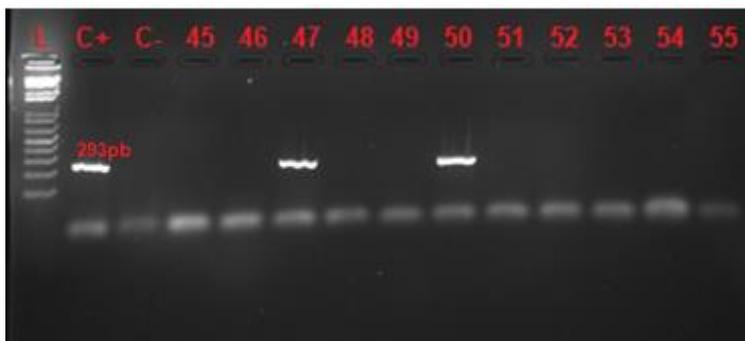


Imagen 21: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-9.  
Muestra *E. coli* 45 a *E. coli* 55

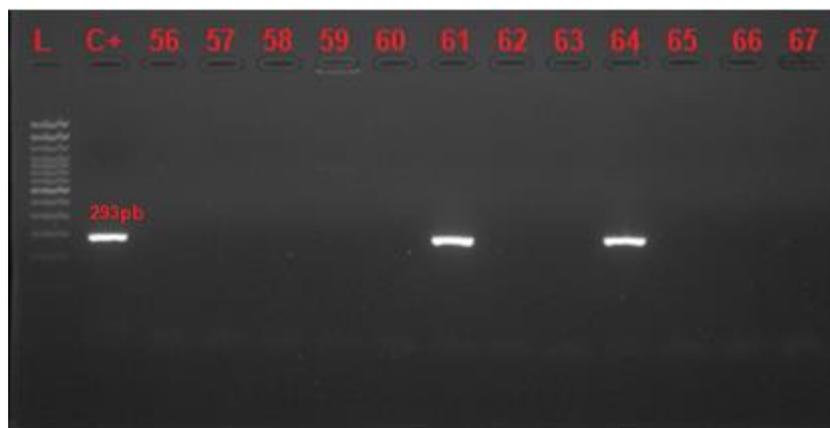


Imagen 22: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-9.  
Muestra *E. coli* 56 a *E. coli* 67

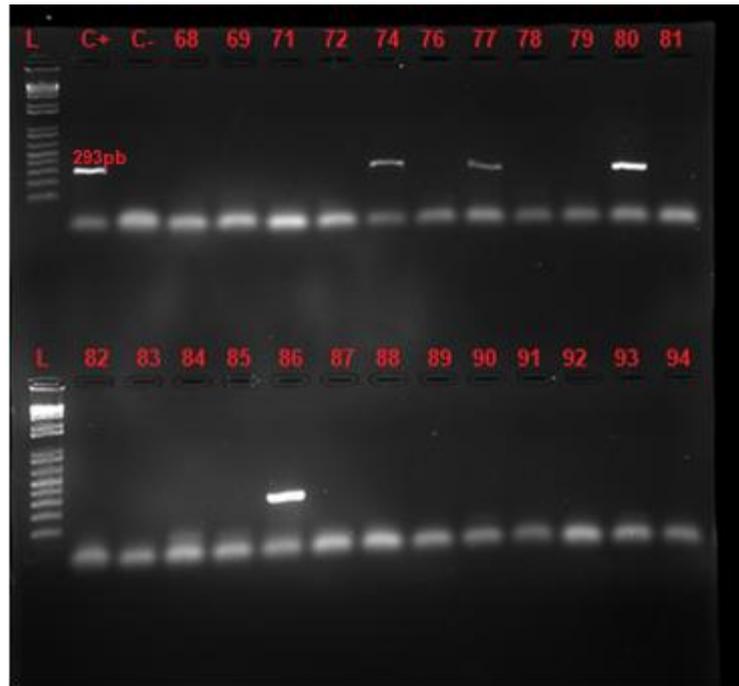


Imagen 23: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-9.  
Muestra *E. coli* 68 a *E. coli* 94

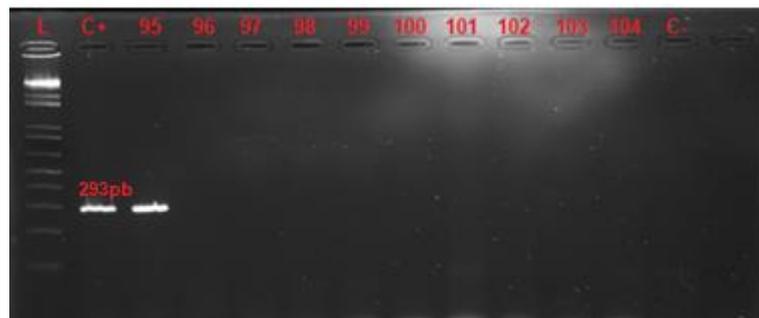


Imagen 24: Gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes específicos de CTX-M-9.  
Muestra *E. coli* 95 a *E. coli* 104

## Anexo F: Blast de Primers

Primers	Identificación molecular	Max score	Total score	Quer y cover	E value	Ident	Accesion number	Grupo
F: CTX-M-7	Escherichia coli class A extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 (blaCTX-M) gene, blaCTX-M-15 allele, complete cds	40	40	0,34	0,34	100%	MK23485 1.1	CTX-M-1
R: CTX-M-8	Escherichia coli strain EK274 extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 (blaCTX) gene, blaCTX-M-15 allele, complete cds	40	40	0,01	0,01	100%	MG70131 8.1	
F: CTX-M-17	Escherichia coli strain BR/2011/S137 extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 gene, partial cds	38	38	0,03	0,03	100%	KJ820995 .1	CTX-M-2
R: CTX-M-18	Escherichia coli DNA, insertion sequence:ISCR1, blaCTX-M-2 gene, Orf3/QacEdelta1 fusion protein, strain: BR-79	42	42	0,04	0,04	100%	AB97658 6.1	
F:CTX-M-19	Escherichia coli strain ASF221 extended spectrum beta-lactamase CTX-M-25 (blaCTX-M) gene, blaCTX-M-25 allele, partial cds	40	40	0,01	0,01	100%	MH98671 3.1	CTX-M-8,25
R: CTX-M-20	Escherichia coli strain LV23529 plasmid pLV23529-CTX-M-8, complete sequence	30	30	7,70	7,70	100%	KY96406 8.1	
F: CTX-M-11	Escherichia coli strain EK34 extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-27 (blaCTX) gene, blaCTX-M-27 allele, complete cds	44	44	0,01	0,01	100%	MG70131 9.1	CTX-M-9

Primers	Identificación molecular	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession number	Grupo
F: CTX-M-12	Escherichia coli strain B95 insertion sequence ISEcp1 TnpA (tnpA) gene, complete cds; and beta-lactamase (blaCTX-M-14) gene, complete cds	42	42	0,004	0	100%	MF61468 9.1	

### Anexo G: Identificación molecular de las muestras enviadas a secuenciar

Muestra	Identificación molecular	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession number	Grupo	Variante
<i>E. coli</i> 100 (control positivo CTX-M-1).	Escherichia coli class a extended-spectrum beta-lactamase ctx-m-15 (blactx-m) gene, blactx-m-15 allele, complete cds	460	460	100%	8,00E-126	99.21 %	mk23485 1.1	CTX-M-1	CTX-M-15
<i>E. coli</i> (control positivo CTX-M-9)	Escherichia coli strain miae02083 extended spectrum beta lactamase ctx-m-14 (bla ctx-m-14) gene, partial cds.	486	486	100%	1,00E-133	100%	mf977549 .1	CTX-M-9	CTX-M-14
<i>E. coli</i> 1	Escherichia coli strain ICBEc05 class A extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-14 (blaCTX-M) gene, blaCTX-M-14 allele, partial cds	361	361	100%	6,00E-96	99,49 %	MK04334 5.1	CTX-M-9	CTX-M-14
<i>E. coli</i> 9	Escherichia coli strain MIAE02099 extended spectrum beta lactamase CTX-M-14 (bla CTX-M-14) gene, partial cds	346	346	100%	2,00E-91	100%	MF97754 3.1	CTX-M-9	CTX-M-14
<i>E. coli</i> 13	Escherichia coli strain FSP1373/09 insertion sequence IS26, partial sequence; insertion sequence IS10, complete sequence; and CTX-M-8 extended spectrum beta-lactamase (blaCTX-M-8) gene,	342	342	100%	2,00E-90	100%	KT00147 4.1	CTX-M-8	CTX-M-8

<b>Muestra</b>	<b>Identificación molecular</b>	<b>Max score</b>	<b>Total score</b>	<b>Query cover</b>	<b>E value</b>	<b>Ident</b>	<b>Accession number</b>	<b>Grupo</b>	<b>Variante</b>
<i>E. coli</i> 100 (control positivo CTX-M-1).	Escherichia coli class a extended-spectrum beta-lactamase ctx-m-15 (blactx-m) gene, blactx-m-15 allele, complete cds	460	460	100%	8,00E-126	99.21 %	mk23485 1.1	CTX-M-1	CTX-M-15
<i>E. coli</i> 18	Escherichia coli strain B95 insertion sequence ISEcp1 TnpA (tnpA) gene, complete cds; and beta-lactamase (blaCTX-M-14) gene, complete cds	361	361	100%	6,00E-96	100%	MH35736 9.1	CTX-M-9	CTX-M-14
<i>E. coli</i> 31	Escherichia coli strain B95 insertion sequence ISEcp1 TnpA (tnpA) gene, complete cds; and beta-lactamase (blaCTX-M-14) gene, complete cds	370	370	100%	1,00E-98	100%	MH35736 9.1	CTX-M-9	CTX-M-14
<i>E. coli</i> 33	Escherichia coli strain B95 insertion sequence ISEcp1 TnpA (tnpA) gene, complete cds; and beta-lactamase (blaCTX-M-14) gene, complete cds	361	361	100%	6,00E-96	100%	MH35736 9.1	CTX-M-9	CTX-M-14
<i>E. coli</i> 45	Escherichia coli strain MIAE02105 extended-spectrum class A beta-lactamase CTX-M-15 (bla CTX-M15) gene, partial cds	289	289	100%	2,00E-74	100%	MF97751 7.1	CTX-M-1	CTX-M-15
<i>E. coli</i> 56	Escherichia coli beta-lactamase CTX-M-15 (blaCTX-M) gene, blaCTX-M-15 allele, partial cds	324	324	100%	7,00E-85	100%	MK03476 4.1	CTX-M-1	CTX-M-15
<i>E. coli</i> 59	Escherichia coli strain MIAE02104 extended-spectrum class A beta-lactamase CTX-M-15 (bla CTX-M15) gene, partial cds	276	276	100%	2,00E-74	100%	MF97751 6.1	CTX-M-1	CTX-M-15
<i>E. coli</i> 60	Escherichia coli strain MIAE02094 extended-spectrum class A beta-lactamase CTX-M-	278	278	100%	5,00E-71	100%	MF97751 3.1	CTX-M-1	CTX-M-15

Muestra	Identificación molecular	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession number	Grupo	Variante
<i>E. coli</i> 100 (control positivo CTX-M-1).	Escherichia coli class a extended-spectrum beta-lactamase ctx-m-15 (blactx-m) gene, blactx-m-15 allele, complete cds	460	460	100%	8,00E-126	99.21 %	mk23485 1.1	CTX-M-1	CTX-M-15
	15 (bla CTX-M15) gene, partial cds								
<i>E. coli</i> 61	Escherichia coli strain EK34 extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-27 (blaCTX) gene, blaCTX-M-27 allele, complete cds	370	370	100%	1,00E-98	100%	MG70131 9.1	CTX-M-9	CTX-M-27
<i>E. coli</i> 64	Escherichia coli strain MIAE02099 extended spectrum beta lactamase CTX-M-14 (bla CTX-M-14) gene, partial cds	370	370	100%	1,00E-98	100%	MF97754 3.1	CTX-M-9	CTX-M-14
<i>E. coli</i> 67	Escherichia coli strain MIAE02086 extended-spectrum class A beta-lactamase CTX-M-15 (bla CTX-M15) gene, partial cds	329	329	100%	2,00E-86	100%	MF97750 8.1	CTX-M-1	CTX-M-15
<i>E. coli</i> 68	Escherichia coli strain EK274 extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 (blaCTX) gene, blaCTX-M-15 allele, complete cds	329	329	100%	2,00E-86	100%	MG70131 8.1	CTX-M-1	CTX-M-15
<i>E. coli</i> 74	Escherichia coli strain MIAE02072 extended spectrum beta lactamase CTX-M-27 (bla CTX-M-27) gene, partial cds	353	353	100%	1,00E-93	100%	MF97754 1.1	CTX-M-9	CTX-M-27
<i>E. coli</i> 77	Escherichia coli plasmid disrupted beta-lactamase-like (blaCTX-M-14) gene, partial sequence; and insertion sequence IS903D transposase (tnpA) gene, partial cds	370	370	100%	1,00E-98	100%	MF61468 9.1	CTX-M-9	CTX-M-14

Muestra	Identificación molecular	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession number	Grupo	Variante
<i>E. coli</i> 100 (control positivo CTX-M-1).	Escherichia coli class a extended-spectrum beta-lactamase <i>ctx-m-15</i> ( <i>blactx-m</i> ) gene, <i>blactx-m-15</i> allele, complete cds	460	460	100%	8,00E-126	99.21 %	mk23485 1.1	CTX-M-1	CTX-M-15
<i>E. coli</i> 78	Escherichia coli strain MIAE02092 extended-spectrum class A beta-lactamase CTX-M-15 ( <i>bla</i> CTX-M15) gene, partial cds	355	355	98%	3,00E-94	100%	MF97751 1.1	CTX-M-1	CTX-M-15
<i>E. coli</i> 80	Escherichia coli strain M57 insertion sequence IS26 TnpA ( <i>tnpA</i> ) gene, partial cds; insertion sequence ISEcp1, complete sequence; and beta-lactamase ( <i>bla</i> CTX-M-27) gene, complete cds	359	359	100%	2,00E-95	100%	MH35737 0.1	CTX-M-9	CTX-M-27
<i>E. coli</i> 82	Escherichia coli strain c43 plasmid beta-lactamase CTX-M-3 ( <i>bla</i> CTX-M) gene, <i>bla</i> CTX-M-3 allele, partial cds; and tryptophan synthase beta chain like-protein gene, complete cds	272	272	100%	2,00E-69	99,33 %	MH03703 6.1	CTX-M-1	CTX-M-3
<i>E. coli</i> 85	Escherichia coli strain FSP1333/09 insertion sequence IS26, partial sequence; insertion sequence IS10, complete sequence; and CTX-M-8 extended spectrum beta-lactamase ( <i>bla</i> CTX-M-8) gene, partial cds	348	348	90%	6,00E-92	100%	KT00147 2.1	CTX-M-8	CTX-M-8
<i>E. coli</i> 83	Escherichia coli strain MIAE02078 extended-spectrum class A beta-lactamase CTX-M-15 ( <i>bla</i> CTX-M15) gene, partial cds	307	307	100%	7,00E-80	100%	MF97750 6.1	CTX-M-1	CTX-M-15

<b>Muestra</b>	<b>Identificación molecular</b>	<b>Max score</b>	<b>Total score</b>	<b>Query cover</b>	<b>E value</b>	<b>Ident</b>	<b>Accession number</b>	<b>Grupo</b>	<b>Variante</b>
<i>E. coli</i> 100 (control positivo CTX-M-1).	Escherichia coli class a extended-spectrum beta-lactamase ctx-m-15 (blactx-m) gene, blactx-m-15 allele, complete cds	460	460	100%	8,00E-126	99.21 %	mk23485 1.1	CTX-M-1	CTX-M-15
<i>E. coli</i> 89	Escherichia coli class A extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 (blaCTX-M) gene, blaCTX-M-15 allele, complete cds	335	335	100%	3,00E-88	100%	MK23485 1.1	CTX-M-1	CTX-M-15