



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

IDENTIFICACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA
EN *ESCHERICHIA COLI* UROPATÓGENA PERTENECIENTE A
LOS GRUPOS FILOGENÉTICOS B2 Y D AISLADA DE LA
COMUNIDAD Y EL AMBIENTE HOSPITALARIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

JUAN JOSÉ MÉNDEZ VELÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. JUAN CARLOS BRAVATA ALCÁNTARA
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

ASESORA INTERNA:

M. EN C. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

CIUDAD DE MÉXICO. ABRIL 2018



F E S
ZARAGOZA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO BAJO LA DIRECCIÓN DEL M. EN C. JUAN CARLOS BRAVATA ALCÁNTARA.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial al M. en C. Juan Carlos Bravata Alcántara, por haberme permitido trabajar bajo su dirección, por las incontables horas de trabajo, revisión y corrección invertidas, por su paciencia y cada uno de los consejos que hicieron este trabajo posible.

A la maestra Iliana Alejandra Cortés Ortiz, por todo su apoyo en la realización de este trabajo, por cada una de sus observaciones y correcciones, por su amabilidad y por estar siempre dispuesta a ayudar en todo lo que fue necesario.

A la maestra Mónica Sierra Martínez, por toda la ayuda brindada, por cada una de sus observaciones, opiniones y por su constante interés en el proyecto.

A la M. en C. Reynalda Roldán Pérez, por todo el tiempo invertido en la revisión y corrección de este trabajo.

A los miembros del jurado:

M. en C. Rosalva Rangel Corona

M. en C. Juan Carlos Bravata Alcántara

M. en C. Reynalda Roldán Pérez

M. en E.S. María Cristina Alvarado Domínguez

M. en C. Edgar Iván Torres Corioriles

DEDICATORIA

A Dios.

A él debo todo lo que soy, sin su infinito amor y sin la fortaleza que me da cada día, jamás habría podido llegar hasta aquí. Gracias por estar siempre presente; éste y los próximos logros serán siempre para honrarte a ti.

A mis padres.

Jamás podré agradecer lo suficiente todo el esfuerzo que ha hecho para hacer posible que llegara hasta aquí. Gracias por todo lo que me han dado, por cada consejo, por darme ánimo. Gracias por tener fe en mí. Quiero honrarlos con este logro alcanzado y que puedan ver el fruto de todo lo que han invertido en mí. Gracias por todo.

A mi familia.

Son mi bendición más grande, el trayecto ha sido largo y les agradezco a todos por toda la ayuda que me han brindado. Gracias por cada consejo, regaño, palabras de ánimo e incluso un techo para vivir cuando lo necesité. Agradezco a Dios infinitamente por sus vidas.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	MARCO TEÓRICO.....	2
2.1.	INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO	2
2.2.	ETIOLOGÍA	3
2.3.	EPIDEMIOLOGÍA.....	4
2.4.	GENERALIDADES DE LAS ENTEROBACTERIAS	4
2.5.	ESCHERICHIA COLI.....	6
2.5.1.	<i>Clasificación de Escherichia coli</i>	6
2.5.2.	<i>Grupos filogenéticos</i>	8
2.5.3.	<i>Factores de virulencia</i>	8
2.5.4.	<i>Mecanismo de infección</i>	12
2.5.5.	<i>Métodos de diagnóstico para Escherichia coli</i>	14
2.5.6.	<i>Tratamiento</i>	15
2.6.	RESISTENCIA BACTERIANA	16
2.6.1.	<i>Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)</i>	19
3.	ANTECEDENTES	20
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
5.	JUSTIFICACIÓN	21
6.	HIPÓTESIS.....	21
7.	OBJETIVO GENERAL.....	22
7.1.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
8.	MATERIAL Y MÉTODOS	22
8.1.	TIPO DE ESTUDIO	22
8.2.	POBLACIÓN DE ESTUDIO	22
8.3.	DURACIÓN	22
8.4.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	23
8.5.	CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN	23
8.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
8.7.	DIAGRAMA DE FLUJO.....	24
8.7.1.	<i>Consulta bibliográfica</i>	24
8.7.2.	<i>Recolección de muestras</i>	24
8.7.3.	<i>Extracción de DNA bacteriano</i>	25
8.7.4.	<i>Amplificación por PCR de Punto Final</i>	26
8.7.5.	<i>Visualización por electroforesis</i>	32
9.	RESULTADOS.....	33
9.1.	CONSULTA DE EXPEDIENTES.....	34
9.2.	VERIFICACIÓN DE INICIADORES POR PCR IN SÍLICO	35
9.3.	DETECCIÓN DEL GRUPO FILOGENÉTICO POR PCR EN MUESTRAS BIOLÓGICAS	39
9.4.	DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS ENTRE PACIENTES INTERNOS Y EXTERNOS	40
9.5.	DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA POR PCR EN MUESTRAS BIOLÓGICAS	41

9.6.	COMPARACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA ENTRE PACIENTES INTERNOS Y EXTERNOS	42
9.7.	DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA POR PCR EN MUESTRAS BIOLÓGICAS	43
9.8.	DISTRIBUCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ENTRE PACIENTES INTERNOS Y EXTERNOS	44
9.9.	RELACIÓN ENTRE GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA	45
10.	DISCUSIÓN.....	46
11.	CONCLUSIONES.....	50
12.	PERSPECTIVAS.....	50
13.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ABREVIATURAS

BLEE: Betalactamasa de espectro extendido

ECUP: Escherichia coli uropatógena

ExPEC: Escherichia coli extraintestinal patogénica

ITU: Infección del tracto urinario

LPS: Lipopolisacáridos

MLEE: Multilocus Enzyme Electrophoresis (Electroforesis de Enzimas Multilocus)

MLST: Multilocus Sequence Typing (Tipificación Multilocus de Secuencias)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

GLOSARIO

- **Antibiograma:** El antibiograma es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad de una colonia bacteriana a un antibiótico o grupo de antibióticos.
- **Antimicrobiano:** Un antimicrobiano es una sustancia química que, a bajas concentraciones, actúa contra los microorganismos, destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento.
- **Huésped:** Organismo que provee de nutrientes y/o albergue a otro organismo en diversas asociaciones biológicas.
- **Infección:** Penetración y desarrollo de microbios patógenos en un ser vivo, que invaden el organismo por vías sanguíneas o que permanecen localizados, vertiendo sus toxinas en la sangre.
- **Nosocomial:** Que se contrae durante la estancia en un medio hospitalario.
- **Resistencia:** La resistencia antimicrobiana es la capacidad de las bacterias para soportar el efecto de los antibióticos sobre ellas. Las bacterias que originalmente eran vulnerables al efecto de un medicamento antimicrobiano y que posteriormente no lo son, se consideran bacterias farmacorresistentes.
- **Sepsis:** Infección generalizada producida por la presencia en la sangre de microorganismos patógenos o de sus toxinas.
- **Virulencia:** Se utiliza la virulencia para definir la capacidad de un microorganismo de causar enfermedad.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales características microbiológicas de la familia enterobacteriaceae	5
Tabla 2. Factores de virulencia y su función en Escherichia coli.....	9
Tabla 3. Mecanismos de virulencia bacteriana y defensas del huésped.....	12
Tabla 4. Cantidades de reactivos utilizados para la identificación del grupo filogenético de Escherichia coli por PCR de punto final.	26
Tabla 5. Condiciones para la detección del grupo filogenético por PCR de punto final....	27
Tabla 6. Iniciadores para identificación del grupo filogenético de las cepas de Escherichia coli.	27
Tabla 7. Cantidades de reactivos utilizados para la identificación de genes de virulencia por PCR de punto final.....	29
Tabla 8. Condiciones para la detección de genes de virulencia por PCR de punto final. .	30
Tabla 9. Iniciadores para la amplificación por PCR de punto final de los genes de virulencia de Escherichia coli.	30
Tabla 10. Cantidades de reactivos utilizados para la identificación de genes de resistencia por PCR de punto final.....	31
Tabla 11. Condiciones para la detección de genes de resistencia por PCR de punto final.	31
Tabla 12. Iniciadores para la amplificación por PCR de punto final de los genes de resistencia de Escherichia coli.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de microorganismos en infecciones complicadas y no complicadas del tracto urinario. _____	3
Figura 2. Estructura general de las enterobacterias. _____	6
Figura 3. Mecanismo de infección de <i>Escherichia coli</i> en vías urinarias. _____	13
Figura 4. Porcentajes de antibióticos más comúnmente utilizados. _____	16
Figura 5. Porcentaje de resistencia a antibióticos por país. _____	18
Figura 6. Diagrama utilizado para la determinación del grupo filogenético. Está basado en la presencia o ausencia de los genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y <i>TspE4.C2</i> . _____	28
Figura 7. Porcentaje de muestras colectadas de acuerdo al género. _____	33
Figura 8. Características clínicas de los pacientes que padecen una ITU causada por <i>Escherichia coli</i> . _____	34
Figura 9. Resultados de la verificación de iniciadores por medio de PCR in silico en la plataforma MFEprimer 2.0. _____	35
Figura 10. Identificación del grupo filogenético por PCR de punto final. _____	36
Figura 11. Detección de genes de virulencia por PCR de punto final. _____	37
Figura 12. Detección de genes de resistencia por PCR. _____	38
Figura 13. Porcentajes de grupos filogenéticos encontrados en las 107 muestras analizadas. _____	39
Figura 14. Distribución de grupos filogenéticos en pacientes internos y externos. _____	40
Figura 15. Porcentaje de genes de virulencia encontrados en las muestras pertenecientes a los grupos filogenéticos B2 y D. _____	41
Figura 16. Distribución de genes de virulencia en pacientes internos y externos. _____	42
Figura 17. Porcentaje de genes de resistencia encontrados en las muestras pertenecientes a los grupos filogenéticos B2 y D. _____	43
Figura 18. Distribución de genes de resistencia en pacientes internos y externos. _____	44
Figura 19. Relación entre genes de virulencia y resistencia. _____	45

Resumen

Escherichia coli es el principal agente causal de las infecciones en vías urinarias, presentando una amplia variedad de genes de virulencia y resistencia a antibióticos que la ayudan a prevalecer en el tracto urinario. La detección molecular de estos genes ayudará a complementar los resultados obtenidos de otras técnicas como el antibiograma, permitiendo comprender mejor el comportamiento y dispersión de estos genes en nuestra población, y a la vez, en un futuro, otorgar al paciente un tratamiento aún más personalizado, disminuyendo los costos y la estancia intrahospitalaria. En el presente trabajo se realizó la detección del grupo filogenético, 5 genes de virulencia y 3 genes de resistencia a antibióticos en 107 muestras de *Escherichia coli* proveniente de pacientes con infección en tracto urinario en dos poblaciones: los pacientes hospitalizados y los pacientes ambulatorios o provenientes de la comunidad. Se observó una diferencia estadística en la presencia de los genes iutA y traT, encontrándose en 80.6% y 91.7% respectivamente en los pacientes internos, mientras que los externos los presentaron en 71.4% y 48.6% respectivamente. En cuanto a los genes de resistencia, también se observaron diferencias significativas, principalmente en la presencia del gen CTX-M, encontrándose en un 83.3% de los pacientes internos mientras que solo el 40% de los externos lo presentaron. También hubo diferencia estadística en la presencia del gen OXA, encontrándose en 69.4% de los pacientes internos, mientras que en los externos se presentó en 45.7%. La resistencia bacteriana es un problema importante a nivel mundial, por lo que, de acuerdo a estos resultados, principalmente en las instalaciones de cuidados a largo plazo como los hospitales, se deben implementar protocolos más rigurosos de control sobre el uso de antibióticos para disminuir la aparición de cepas resistentes. La técnica de PCR demostró ser lo suficientemente sensible y específica para la detección del grupo filogenético, genes de virulencia y genes de resistencia en las 107 muestras analizadas.

1. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia enterobacteriaceae, y aunque se considera un organismo de flora normal, existen algunas cepas que son patógenas y pueden causar infecciones ya sea intestinales o extraintestinales (ExPEC). En este último grupo se encuentran las cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC), las productoras de sepsis y meningitis. UPEC es el agente etiológico más comúnmente involucrado en las infecciones del tracto urinario (ITU) hasta en un 85% de los casos (Millán y col., 2014). Las cepas causantes de infecciones extraintestinales derivan principalmente del grupo B2 y en menor proporción del grupo D y poseen gran número de determinantes de virulencia que promueven funciones patogénicas (Moreno, 2006). Las infecciones del tracto urinario asociadas con UPEC son uretritis, cistitis y pielonefritis. Además de las propiedades antimicrobianas que presenta el tracto urinario de manera normal, ante la infección por UPEC, el hospedero presenta una respuesta del sistema inmune innato y del sistema inmune adaptativo. Una de estas respuestas es la de tipo inflamatoria, que tiene como propósito la eliminación del patógeno. Aunque el tracto urinario humano presenta varios mecanismos antimicrobianos, UPEC presenta diversos mecanismos que le permiten persistir en el sistema urinario del hospedero, fenómeno que está relacionado con la recurrencia y cronicidad del padecimiento. Actualmente se tiene gran avance en el conocimiento de la genética, factores de virulencia y la patofisiología de la enfermedad que produce este importante patógeno, sin embargo, aún falta entender la relación de UPEC con el hospedero humano. Finalmente, UPEC posee el potencial de convertirse en un patógeno epidemiológicamente importante por el incremento en el aislamiento de cepas multiresistentes a los antimicrobianos (Arenas, 2012), por lo que es importante identificar los genes responsables de esa resistencia, ayudando así a brindar un tratamiento más específico al paciente, garantizando la eliminación de la bacteria y evitar los gastos adicionales que se generan al usar antibióticos inadecuados, los cuales favorecen la resistencia de las cepas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Infecciones del tracto urinario

En condiciones normales el tracto urinario es estéril, y una infección se desarrolla solo cuando la virulencia del agente causal supera los mecanismos de defensa normales del huésped. Las infecciones del tracto urinario son de las más comunes, afectando aproximadamente un 40% de las mujeres en algún momento de su vida y pueden causar sepsis graves, pero la mayoría de las infecciones son menos severas. Aun así, estas infecciones causan dolor al individuo y están asociadas a altos costos médicos. En los Estados Unidos, las ITU son responsables de 7 millones de visitas clínicas anuales, con costos que exceden 1.6 billones de dólares (Litwin y col., 2007).

En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica reportó en el 2014 las ITU ocuparon el tercer sitio dentro de las principales causas de morbilidad, presentándose más de 4 millones de casos (Gorordo, 2017).

Las ITU están definidas por la presencia de un crecimiento de 10^4 o 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de una sola especie bacteriana en una muestra de orina reciente. En mujeres sintomáticas, el umbral es más bajo (10^2 UFC/ml) (Secretaría de Salud, 2009).

Según su localización, se clasifican en: infecciones en vías urinarias bajas o altas; en las infecciones en vías urinarias bajas se presentan cuadros característicos de cistitis, uretritis y prostatitis, mientras que en el caso de las infecciones en vías altas los casos son más complicados, presentándose cuadros de pielonefritis aguda (Monte, 2012).

2.2. Etiología

Las ITU son causadas tanto por bacterias gramnegativas como grampositivas y algunos hongos. El agente causal más frecuente en las infecciones complicadas y en las no complicadas es *Escherichia coli* uropatógena. En los agentes involucrados en ITU no complicadas, *Escherichia coli* uropatógena es seguida en prevalencia por *Klebsiellapneumoniae*, *Staphylococcussaprophyticus*, *Enterococcusfaecalis*, *Streptococcus* grupo B (GBS), *Proteusmirabilis*, *Pseudomonasaeruginosa*, *Staphylococcus* *aureus* y *Candida* spp. Para las ITU complicadas, el orden de prevalencia es, seguido de UPEC como el más frecuente, *Enterococcus* spp., *K. pneumoniae*, *Candida* spp., *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y GBS (Flores y col., 2015) (Fig. 1).

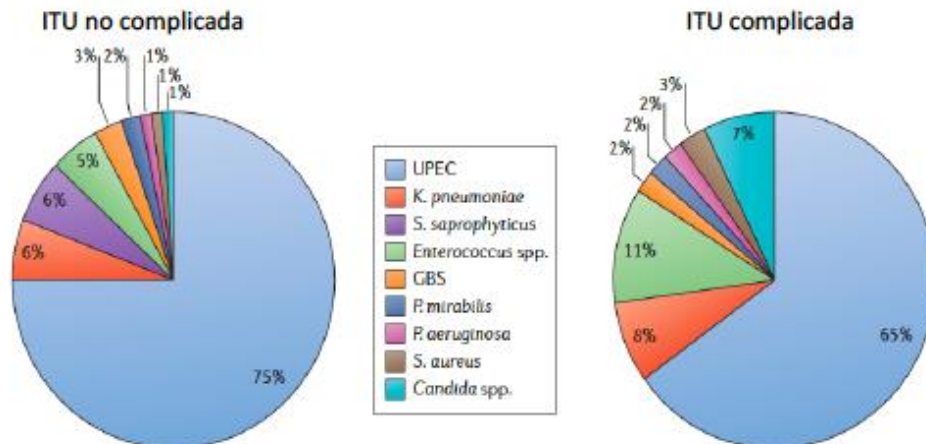


Figura 1. Prevalencia de microorganismos en infecciones complicadas y no complicadas del tracto urinario. Tomado de Flores y col., 2015.

2.3. Epidemiología

Las infecciones del tracto urinario son de las infecciones más comunes, afectando aproximadamente a 150 millones de personas cada año en el mundo (Stamm y Norrby, 2001). En México, en el 2014 y 2015, se presentaron más de 4 millones de casos, de los cuales, más de 3 millones fueron del género femenino (Boletín Epidemiológico Nacional, 2015).

Las ITU nosocomiales (adquiridas en el hospital) se desarrollan en un 25% de pacientes que requieren un catéter por más de 7 días con un riesgo diario del 5% (Sheerin, 2011).

2.4. Generalidades de las enterobacterias

La familia enterobacteriaceae constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gramnegativas. Está conformada por 41 géneros y más de 100 especies (Quinn y col., 2005). Se llaman así por su localización habitual en el tracto digestivo, aunque pueden encontrarse también en el suelo, agua y vegetación. Del mismo modo, forman parte de la microbiota normal en muchos animales además del hombre (Puerta y Mateos, 2010). En la Tabla 1 se muestra un resumen de las principales características microbiológicas de esta familia.

Esta familia incluye géneros de gran importancia a nivel epidemiológico como son *Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., *Proteus* sp., *Citrobacter* sp., *Edwardsiella* sp., *Yersinia* sp., *Morganella* sp., y *Arizona* sp. entre otras (Brooks, 2011).

Son aerobios no formadores de esporas que pueden crecer en anaerobiosis (anaerobios facultativos)
Reducen los nitratos a nitritos (con algunas excepciones)
No licuan el alginato
Fermentan la glucosa a ácido con producción de gas o sin ella

Son oxidasa-negativos, a excepción de <i>Plesiomonas</i>
Producen catalasa
No ven favorecido su crecimiento por la presencia de NaCl
La mayoría son móviles (con flagelos peritricos)
No formadores de esporas

Tabla 1. Principales características microbiológicas de la familia enterobacteriaceae. Tomada y modificada de Puerta y Mateos, 2010.

Las enterobacterias tienen forma de bastón y por lo general miden de 1-3 μm de diámetro. Al igual que en otras bacterias gramnegativas, su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar (Fig. 2). La membrana interna, formada por una doble capa de fosfolípidos, regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa siguiente, o capa externa, consiste en un peptidoglicano delgado junto con un espacio periplasmático que contiene una elevada cantidad de proteínas. La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS), los cuales son un importante factor de virulencia en estas bacterias, lipoproteínas, proteínas porinas multiméricas (facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos), y otras proteínas de membrana externa como los flagelos, los cuales se utilizan para la locomoción y que provienen de una estructura interna basal localizada, las fimbrias, con importante función como adhesinas y los pili sexuales, los cuales contienen plásmidos conjugativos y son utilizados para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido.

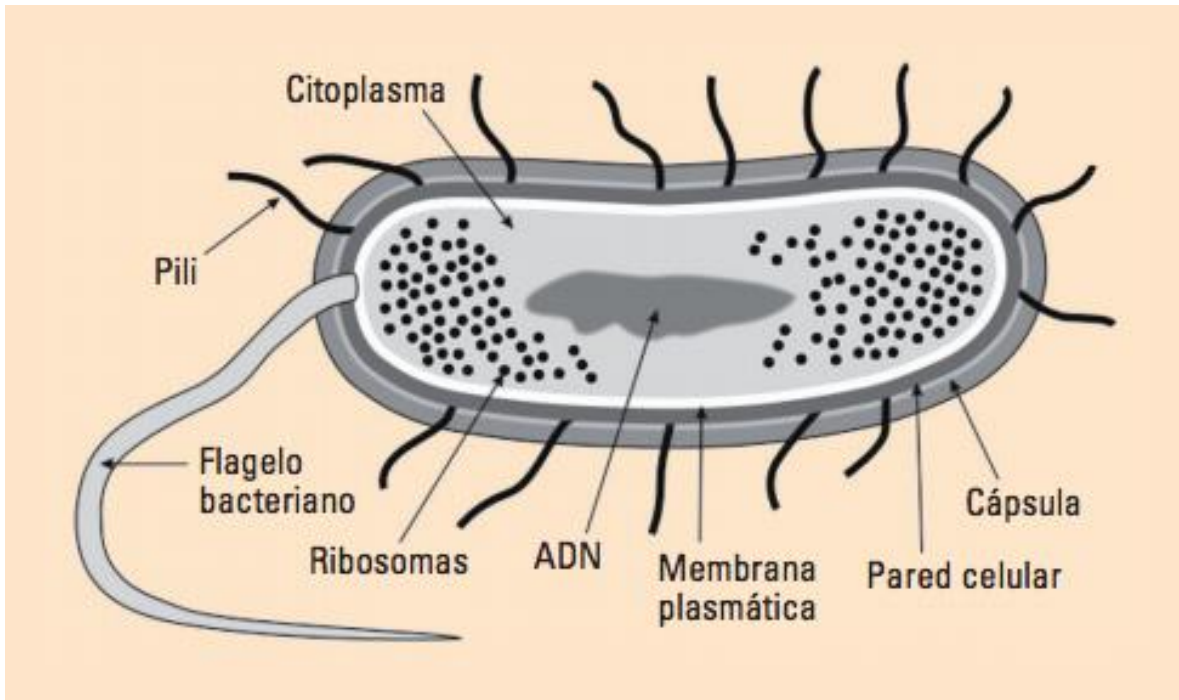


Figura 2. Estructura general de las enterobacterias. Tomada de Puerta y Mateos, 2010.

2.5. *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, la cual coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos (Rodríguez-Ángeles, 2002).

2.5.1. Clasificación de *Escherichia coli*

De forma general, *Escherichia coli* puede clasificarse, dependiendo su relación con el huésped, como comensal y patogénica, y dependiendo de su localización, como intestinal o extraintestinal, siendo estas últimas las causantes de las infecciones en vías urinarias.

2.5.1.1. *Escherichia coli* extraintestinal patógena (ExPEC)

Escherichia coli es el microorganismo gramnegativo más frecuentemente asociado a infecciones extraintestinales, las cuales acarrearán un importante impacto tanto médico como económico. Estas cepas de *E. coli* con una especial capacidad de causar infecciones extraintestinales, denominadas ExPEC (extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*), se encuentran con mucha frecuencia en la flora normal intestinal y no causan gastroenteritis en humanos (Soto, 2006). Las cepas que causan este tipo de infecciones son epidemiológica y filogenéticamente diferentes de las comensales (Johnson y col., 2002).

2.5.1.1.1. *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC)

Entre ExPEC, cepas de *Escherichia coli* uropatógena son las más comúnmente asociadas a infecciones. Estas bacterias son la causa primaria de ITU adquiridas en la comunidad (70-95%) y una gran parte de las nosocomiales (50%) (Foxman, 2003). Las cepas de UPEC actúan como patógenos intracelulares oportunistas, tomando ventaja del comportamiento y susceptibilidad del huésped mediante el uso de un diverso repertorio de factores de virulencia para colonizar el tracto urinario (Wiles y Mulvey, 2008).

Algunos de estos factores son mecanismos de adherencia, colonización e invasión que le permiten a la bacteria competir con la flora normal y colonizar otros nichos en el organismo. Existe cierta correlación entre los factores de virulencia y el tipo de infección urinaria que se desarrolla (Johnson, 1991; Nielubowicz y col., 2010). También hay una relación entre el contenido de virulencia de las diferentes cepas y su especificidad con el huésped (Poey y col., 2012).

2.5.2. Grupos filogenéticos

Las diferencias entre *Escherichia coli* patógena y comensal se correlacionan con sus antecedentes filogenéticos. En función de las relaciones de similitud evaluadas mediante técnicas de electroforesis de diferentes enzimas (MLEE) y de secuenciación de sus genes (MLST), en *Escherichia coli* se han identificado cuatro grandes grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D (Moreno y col., 2006). Así, las cepas causantes de infecciones extraintestinales, incluyendo las infecciones urinarias y la sepsis, derivan principalmente del grupo B2 y en menor proporción del grupo D, teniendo un gran número de determinantes de virulencia que promueven funciones patogénicas (adherencia, evasión a los mecanismos de defensa del huésped, adquisición de hierro, invasión celular, etc.), mientras que los comensales derivan de los grupos A y B1 y poseen pocos determinantes de virulencia (Duriez y col., 2001). Aunque las cepas de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A o B1 conforman la flora comensal, y se consideran no patógenas, ocasionalmente han sido responsables de infecciones extraintestinales (Moreno y col., 2006). Las cepas de ECUP del grupo B2 producen el 69 % de las cistitis, 67% de las pielonefritis y el 72 % de las sepsis con punto de partida en el tracto urinario (Millán, 2014).

2.5.3. Factores de virulencia

La capacidad de *Escherichia coli* de producir infecciones extraintestinales se debe a la adquisición de genes que codifican diversos factores de virulencia, los cuales hacen posible que causen infecciones en focos distintos al intestinal, tanto en pacientes normales como en pacientes inmunodeprimidos. La mayor parte de estos genes de virulencia son distintos a los que están implicados en las infecciones intestinales (Soto, 2006).

La virulencia bacteriana es un fenómeno multifactorial. La combinación de genes de virulencia en *Escherichia coli* contribuyen a potenciar su patogenicidad, causando los distintos tipos de enfermedades intestinales y extraintestinales (Blanco y col., 2002).

La expresión de factores de virulencia específicos confiere una creciente capacidad de adaptación a nuevos nichos y permite causar un largo espectro de enfermedades (Kaper y col., 2004).

Un mejor conocimiento de las características de virulencia del microorganismo que causa la infección permitirá al clínico anticipar, hasta cierto punto, la evolución de la infección en el organismo huésped (López y col., 2014).

Algunos de estos factores son las adhesinas, toxinas, sideróforos, entre otros (Blanco y col., 2002, Donnenberg, 2002); en la Tabla 2 se muestran algunos de estos factores de virulencia y su función.

Factor de virulencia	Función
Fimbria Tipo 1	Adhesión al epitelio de la mucosa y a la matriz tisular, invasión, formación de biopelículas.
Fimbria P	Adhesión al epitelio de la mucosa y a la matriz tisular, inducción de citosinas.
Fimbria S	Adhesión al epitelio de la mucosa, células endoteliales y a la matriz tisular.
Fimbria F1C	Adhesión a las células de la mucosa y endoteliales.
α -hemolisina	Citotoxicidad, hemólisis.
Factor Citotóxico Necrotizante 1 (CNF1)	Interferencia en la fagocitosis y apoptosis.
Toxina secretada autotransportadora	Citotoxicidad.
Toxina dilatadora citoletal	Citotoxicidad.
Citolisina A	Citotoxicidad.
Enterobactina	Captación de hierro.
Aerobactina	Captación de hierro.

Tabla 2. Factores de virulencia y su función en *Escherichia coli*. Tomado y modificado de Emó y col., 2003.

Cada mecanismo de virulencia en *Escherichia coli* está mediado por diversos factores, a continuación, se describen los más importantes.

a) Adhesinas y fimbrias

La adhesión bacteriana es considerada una etapa fundamental de los procesos infecciosos en el tracto urinario, una vez allí, el microorganismo es sometido al flujo urinario y a la posibilidad de ser arrastrado y eliminado. Las cepas de *E. coli* son responsables de más de 80% de todas ITU, por lo que los mecanismos que garantizan la adherencia y colonización de este sitio anatómico son considerados como primordiales en la virulencia de cepas ECUP (Van Houdt y col., 2005, Hancock y col., 2007).

Las adhesinas fimbriales primarias de las cepas ECUP son las fimbrias tipo 1, las fimbrias P y las fimbrias F1C y por lo general esas cepas están bien equipadas de adhesinas y la mayoría expresan tres o más tipos diferentes de fimbrias (Hancock y col., 2007). Las fimbrias tipo 1 se expresan en más de un 90% en aislamientos de *Escherichia coli*, incluyendo tanto cepas patógenas como comensales (Miranda y col., 2016).

Las fimbrias tipo 1 se componen por repeticiones de subunidades de la proteína FimA, la parte distal de la fimbria está conformada por 2 adaptadores (proteínas FimF y FimG) y la adhesina unida a manosa FimH. Esta adhesina se encarga de mediar la adherencia de la bacteria a glucoproteínas y epítopes peptídicos no glucosilados en el epitelio de la vejiga que conducen a la internalización de la bacteria, y ésta a su vez forma comunidades bacterianas intracelulares (Dhakal y col., 2008; Weichhart y col., 2008; Rosen y col., 2007).

b) Toxinas

Tres tipos de toxinas son producidas por ECUP: la hemolisina (Hly), el factor citotóxico necrotizante (CNF1) y la toxina secretada autotransportadora (Sat). A la hemolisina también se le conoce como “toxina formadora de poros”, ya que se inserta en la membrana celular del huésped y provoca una lisis celular, lo cual facilita la liberación de hierro y nutrientes que son esenciales para el crecimiento bacteriano (Wiles y col., 2009).

El CNF1 provoca una activación de los miembros de la familia Rho, lo cual resulta en el rearrreglo del citoesqueleto de la célula huésped, provocando apoptosis en células de la vejiga. (Mills y col., 2000).

c) Sideróforos

En las infecciones extraintestinales, el hierro se convierte en uno de los principales factores que limitan el crecimiento bacteriano y para poder incorporarlo la mayoría de las ExPEC posee sideróforos que generalmente son formados por un compuesto quelante del hierro que la bacteria excreta y puede volver a captar (Blanco y col., 2002).

d) Resistencia al suero

Otro factor de virulencia importante distintivo de ECUP es la resistencia al suero; la habilidad que protege a la bacteria de la actividad bactericida del suero y así ésta pueda persistir en los fluidos corporales. Este factor está codificado por el gen traT (Mellata y col., 2003).

En la Tabla 3 se muestran algunos factores de defensa del huésped y el mecanismo de acción correspondiente (virulencia) bacteriano.

Defensa del huésped	Virulencia bacteriana
Arrastre por flujo de la orina	Adherencia mediada por fimbrias
Neutrófilos	Resistencia al suero
Sistema de complemento	Producción de toxinas
Péptidos antimicrobianos	Hemolisina
Catelicidinas	Sistemas de adquisición de hierro

Tabla 3. Mecanismos de virulencia bacteriana y defensas del huésped. Tomado y modificado de Sheerin, 2011.

2.5.4. Mecanismo de infección

Las infecciones en vías urinarias comienzan cuando los uropatógenos contaminan el área periuretral (Paso 1) y son capaces de colonizar la uretra. Una migración subsecuente a la vejiga (Paso 2) y la expresión de pili y adhesinas resulta en la colonización e invasión de las células superficiales del epitelio de la vejiga (Paso 3). Las respuestas inflamatorias del huésped, incluida la infiltración de neutrófilos (Paso 4), comienzan a eliminar bacterias extracelulares. Algunas bacterias evaden el sistema inmune, ya sea por invasión de las células huésped o a través de cambios morfológicos que resultan en la resistencia a neutrófilos, y estas bacterias se multiplican (Paso 5) y forman biopelículas (Paso 6). Estas bacterias producen toxinas y proteasas que inducen daño a la célula huésped (Paso 7), liberando nutrientes esenciales que promueven su supervivencia y la ascensión a los riñones (Paso 8). La colonización de los riñones (Paso 9) resulta en la producción de toxinas bacterianas y un daño al tejido del huésped (Paso 10). Si no se tratan, las ITU pueden por último progresar a una bacteremia si los patógenos cruzan la barrera epitelial de los riñones (Paso 11) (Sheerin, 2011) (Fig. 3).

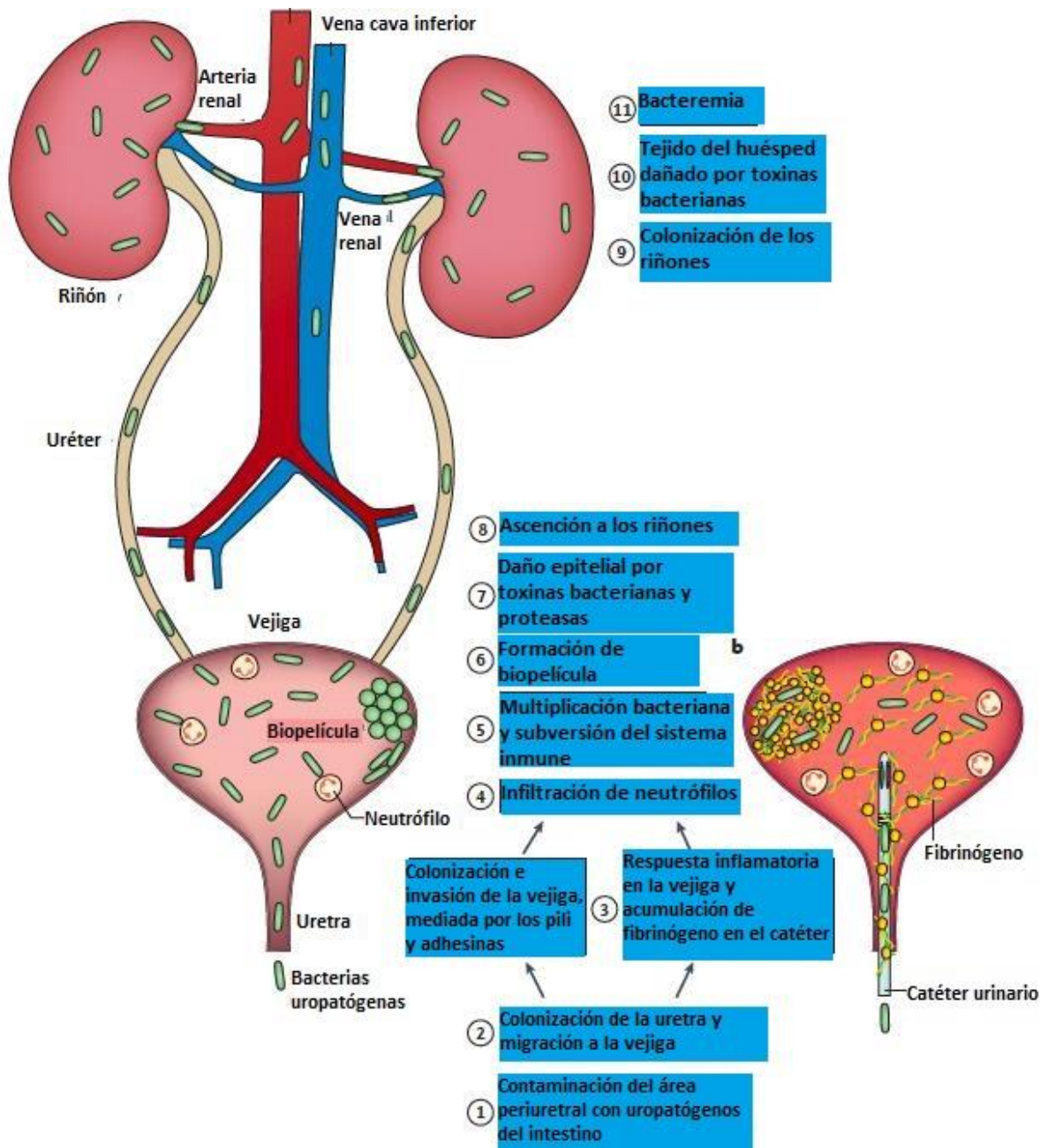


Figura 3. Mecanismo de infección de *Escherichia coli* en vías urinarias. Tomado de Sheerin, 2011.

2.5.5. Métodos de diagnóstico para *Escherichia coli*

Un diagnóstico rápido y eficaz de una infección causada por *Escherichia coli* o cualquier otro microorganismo es indispensable. En la actualidad, se cuentan con muchos métodos para realizar un diagnóstico correcto, sin embargo, el cultivo bacteriano sigue siendo el estándar de oro, aunque, como desventaja, se requieren tiempos de espera más prolongados para la obtención de un resultado. Por esta razón se han ido implementando nuevos métodos de diagnóstico como los moleculares, siendo más rápidos y altamente específicos, por lo que son cada vez más usados en la actualidad.

2.5.5.1. Métodos clásicos

El diagnóstico de las ITU debe realizarse basándose en tres cosas: 1) el urocultivo, que permite cuantificar e identificar los agentes causales de la infección, y al mismo tiempo, estudiar su sensibilidad a los antibióticos. 2) El examen de los elementos formes de la orina, que otorga información sobre la presencia de leucocitos polimorfonucleares que traducen daño tisular y de células del epitelio escamoso y microorganismos de la flora periuretral y vaginal que indican malas condiciones en la recogida de la orina. 3) La sintomatología clínica, la cual es mucho más sensible y específica en jóvenes sin factores predisponentes que en ancianos. Sin embargo, en laboratorios con un alto número de muestras, es imposible el cultivo de cada una de ellas, lo cual hace necesario descartar las orinas negativas mediante sistemas automatizados y cultivar solo aquellas positivas (Andreu y col., 2011)

2.5.5.2. Métodos moleculares

La introducción de métodos de biología molecular en los laboratorios de microbiología clínica supone un gran apoyo a la hora de obtener diagnósticos sensibles y específicos en el menor espacio de tiempo posible. Estos métodos no sustituyen, sino que complementan los ya usados métodos microbiológicos tradicionales. El análisis integrado de todos ellos está llevando a resultados más fiables y eficaces. De entre todas las técnicas moleculares utilizadas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha adquirido un gran valor diagnóstico, permitiendo la detección de agentes etiológicos, y de sus genotipos de virulencia y resistencia, con gran sensibilidad y rapidez. Desde hace algunos años, ha tomado gran interés el desarrollo de las denominadas PCR múltiples, reacciones que consiguen amplificar simultáneamente y en un único tubo diferentes secuencias blanco, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes de interés (Méndez-Álvarez y col., 2004).

2.5.6. Tratamiento

En la actualidad se cuenta con diferentes tipos de antibióticos útiles al momento de tratar una infección en vías urinarias causada por *Escherichia coli* u otras bacterias. La Fig. 4 muestra los porcentajes de los antibióticos más comúnmente utilizados para tratar este tipo de infecciones, dejando claro que los antibióticos betalactámicos son la familia de antibióticos más utilizada en la práctica clínica y además, es la más numerosa. Los antibióticos betalactámicos cuentan con un mecanismo de acción basado en la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Se trata de antibióticos de acción bactericida lenta, con actividad dependiente del tiempo, que en general tienen buena distribución y escasa toxicidad. Algunas modificaciones de la molécula original han dado lugar a compuestos con mayor espectro antimicrobiano, pero la progresiva aparición de resistencias limita su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones (Suárez, 2009).

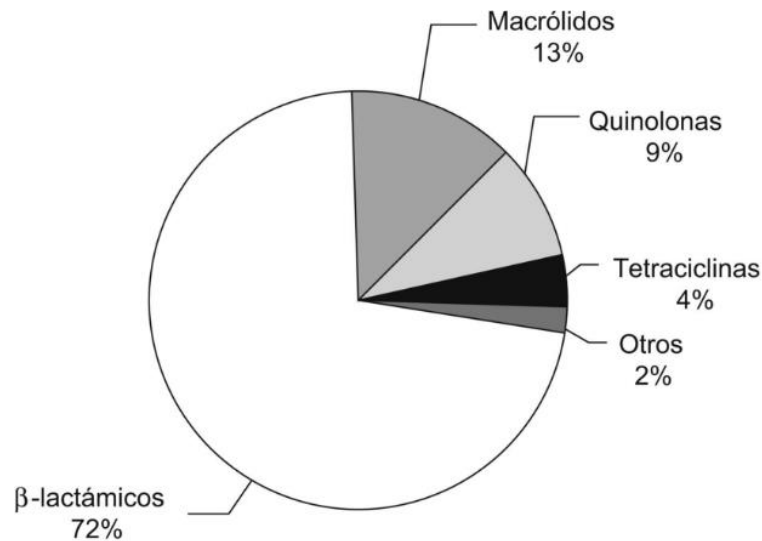


Figura 4. Porcentajes de antibióticos más comúnmente utilizados. Tomado de Suárez, 2009.

2.6. Resistencia bacteriana

El problema al tratar infecciones en vías urinarias es que algunas cepas presentan resistencia a los antibióticos. Se entiende por resistencia bacteriana la capacidad de un microorganismo de crecer en presencia de un determinado antibiótico. Se han determinado diferentes mecanismos de resistencia utilizados por las bacterias: destrucción o inactivación enzimática, cambios en la permeabilidad de la membrana externa, alteraciones del sitio blanco (de los precursores de la pared celular, de la membrana y de los ribosomas y otros) (Vázquez y col., 2008). Las bacterias han desarrollado resistencia a todas las clases de antibióticos hasta ahora descubiertas. Además, gracias a la transmisión horizontal de genes (conjugación, transformación y transducción) los genes de resistencia se dispersan rápidamente entre las poblaciones (Alanis, 2005).

Cuando los microorganismos se vuelven resistentes a los medicamentos, se reducen las opciones para tratar las enfermedades que provocan. Esto ocurre en todas partes del mundo y afecta a una amplia selección de microorganismos, con una creciente prevalencia que amenaza la salud humana y animal. Las consecuencias de una infección por microorganismos resistentes pueden ser graves, por ejemplo, enfermedades más largas, mayor mortalidad, estancias prolongadas en el hospital, pérdida de protección en el caso de los pacientes que se someten a operaciones y otros procedimientos médicos, e incremento de los costos. La resistencia a los antimicrobianos afecta a todos los ámbitos de la salud, implica a muchos sectores y tiene efectos en el conjunto de la sociedad. Las consecuencias indirectas de la resistencia a los antimicrobianos van más allá del aumento de los riesgos para la salud, pues repercuten en gran medida en la salud pública y tienen amplios efectos, por ejemplo, en el desarrollo. La resistencia a los antimicrobianos erosiona la economía mundial con pérdidas económicas debidas a la menor productividad a causa de la enfermedad (de los seres humanos y también de los animales) y al incremento de los costos de tratamiento. Para combatirla se requieren inversiones a largo plazo, por ejemplo, apoyo financiero y técnico a los países en desarrollo, en el desarrollo de nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones, y en el fortalecimiento de los sistemas de salud para utilizar los agentes antimicrobianos, y acceder a ellos, de forma más adecuada (OMS, 2015).

La Fig. 5 muestra el porcentaje de resistencia a antibióticos en algunos países, específicamente para infecciones del tracto urinario.

Los antimicrobianos más frecuentemente empleados en el tratamiento de las infecciones por cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales son la amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas, aminoglicósidos, cotrimoxazol y quinolonas. Sin embargo, la capacidad de *Escherichia coli* para adquirir genes de resistencia hace impredecible su sensibilidad, por lo que ésta debe determinarse siempre mediante antibiograma (Blanco y col., 2002).

Una proporción elevada (40 a 90%) de las cepas de *E. coli* son resistentes a la ampicilina, estreptomicina, tetraciclinas y sulfamidas. También son muchas (15 a 30%) las cepas resistentes a las cefalosporinas de 1ª generación, neomicina, kanamicina, cloranfenicol y quinolonas. Entre los antibióticos que presentan menores tasas de resistencias se dispone de amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de 2ª y 3ª generación, gentamicina, tobramicina, amikacina, colistina y polimixina B (Blanco y col., 2002).

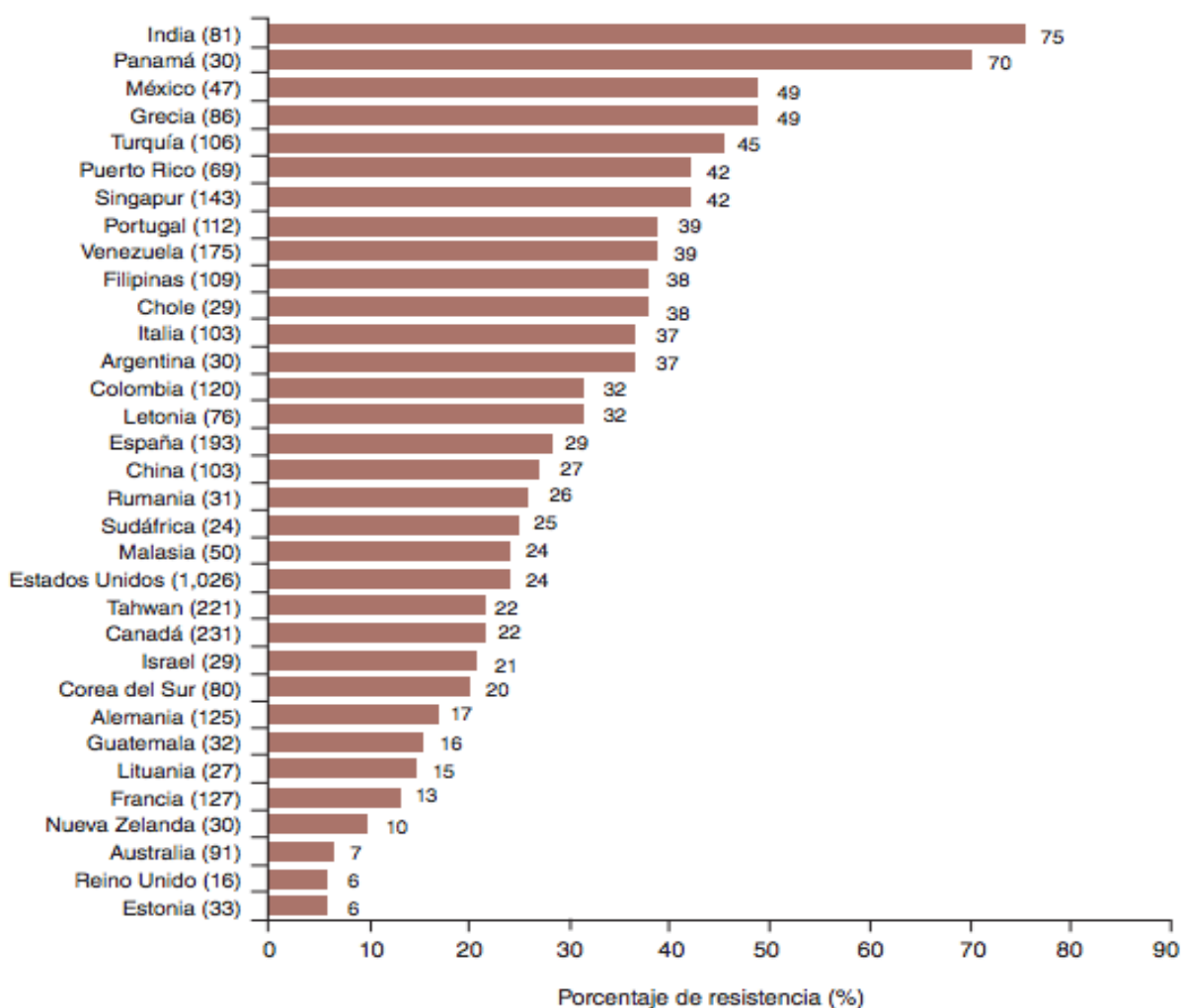


Figura 5. Porcentaje de resistencia a antibióticos por país. Tomado de Bouchillon y col., 2012.

2.6.1. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Cuando aparecieron los antibióticos, se asumió que la evolución de la resistencia a antibióticos era improbable. Esto estaba basado en la suposición de que la frecuencia de mutaciones causantes de bacterias resistentes era demasiado baja (Davies, 1994). Sin embargo, el tiempo probó lo contrario, ya que las bacterias desarrollaron resistencia a antibióticos en una gran variedad de mecanismos (Van Hoek y col., 2011)

La primera enzima reportada que destruía a la penicilina fue una Betalactamasa AMPc de *E. coli* (Abraham y Chain, 1940). El mecanismo más común e importante por el cual una bacteria puede convertirse en resistente a betalactámicos es la expresión de betalactamasas, por ejemplo, Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) (Bradford, 2001).

Las Betalactamasas de Espectro Extendido son definidas como enzimas producidas por ciertas bacterias que son capaces de hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro. Por lo tanto, son efectivas contra betalactámicos como ceftazidima, ceftriaxona y cefotaxima (Bradford, 2001; Paterson y Bonomo, 2005). Generalmente, las BLEE son inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam. Las BLEE se encuentran en bacterias gramnegativas, especialmente en enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* (Bradford, 2001).

Las BLEE están en continua mutación, provocando el desarrollo de nuevas enzimas que presentan sustratos de acción más amplios. Hasta ahora, hay más de 300 diferentes variables de BLEE y han sido agrupadas en 9 diferentes familias, basándose en sus secuencias de aminoácidos. Las variables TEM y SHV fueron los grupos más grandes. Aun así, CTX-M es más común en algunos países (Paterson y col., 2003).

Conocer el bagaje de genes de resistencia contribuye a tomar mejores políticas de uso antibiótico que intenten controlar la diseminación de estos genes.

3. ANTECEDENTES

En el año 2000, Clermont y col. diseñan un método para una identificación rápida de los diferentes grupos filogenéticos de *Escherichia coli* basado en una PCR triplex. Este método usa una combinación de dos genes (*chuA* y *yjaA*) y un fragmento de ADN (*TspE4.C2*) fue probado en 230 cepas y mostró una excelente correlación con otros métodos de referencia (Clermont y col., 2000).

En un estudio realizado en el 2006 por Moreno y col. en 105 casos de *E. coli* aislados de orina se estudiaron: 15 genes de virulencia, antígenos O asociados a infección extraintestinal y sensibilidad a fluoroquinolonas. Obtuvieron que los grupos filogenéticos A y B1 presentaron menos determinantes de virulencia que los del grupo B2; sin embargo, los grupos A y B1 se asociaron con frecuencia significativa a resistencia a fluoroquinolonas, mientras que los del grupo B2 se asociaron a sensibilidad (Moreno y col., 2006).

En el 2011 se realizó un trabajo donde se detectaron genes de virulencia y resistencia en aislados de *Escherichia coli*. Ellos encontraron que *E. Coli* ST131 presentaba altos niveles de resistencia a antibióticos, aunque no poseía, en comparación con otras ST, ningún grupo de genes de virulencia específico, al cual se le pudiera atribuir la alta virulencia con la cual está reportada (Croxall y col., 2011).

Gholipour y col. en el 2014 realizaron un estudio en diferentes cepas de *E. coli* (245) y *K. pneumoniae* (55) aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario en búsqueda de cepas productoras de ESBL. Utilizaron la técnica de PCR y los productos fueron corridos en geles de agarosa. De los 300 aislados, 107 de *E. coli* y 21 de *K. pneumoniae* fueron confirmados como potenciales productores de BLEE (Gholipour y col., 2014).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica reportó a las infecciones del tracto urinario como la tercera causa de morbilidad, siendo *Escherichia coli* uropatógena (ECUP) la causante de hasta el 80% de los casos. Estas infecciones son causadas principalmente por cepas pertenecientes a los grupos filogenéticos B2 y D, las cuales presentan factores de virulencia que le confieren potencial patogénico, facilitando la colonización e invasión en los tejidos del huésped, generándole daños y una respuesta inflamatoria. Aunado a esto, algunas cepas de *Escherichia coli* llegan a presentar genes que les confieren resistencia a ciertos antibióticos. De forma rutinaria, la resistencia a los antibióticos es analizada a través de un antibiograma, pero esta técnica no permite conocer los genes responsables de este mecanismo, haciendo necesario el uso de técnicas complementarias.

5. JUSTIFICACIÓN

La detección molecular de los genes de virulencia y resistencia ayudará a complementar los resultados obtenidos de las técnicas fenotípicas rutinarias como el antibiograma, lo cual nos permitirá comprender mejor el comportamiento y dispersión de estos genes en nuestra población, y a la vez, en un futuro, otorgar al paciente un tratamiento aún más personalizado, disminuyendo los costos y la estancia intrahospitalaria.

6. HIPÓTESIS

Debido al amplio uso de antibióticos en los hospitales y a la fuerte presión selectiva que éstos generan sobre las bacterias, se espera encontrar una mayor frecuencia de genes productores de betalactamasas en los pacientes hospitalizados.

7. OBJETIVO GENERAL

Realizar la detección molecular de genes de virulencia y resistencia en muestras de *Escherichia coli* de pacientes del Hospital Juárez de México.

7.1. Objetivos particulares

- Identificar, por medio de una PCR de punto final, el grupo filogenético de las cepas de *Escherichia coli*.
- Identificar los genes de virulencia más frecuentes en nuestra población.
- Comparar los genes de resistencia presentes en los pacientes internos y los que presentan los pacientes comunitarios.
- Comparar los genes de virulencia y resistencia presentes en cada una de las muestras de ambas poblaciones para encontrar posibles relaciones.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Tipo de estudio

Estudio comparativo.

8.2. Población de estudio

Se realizó un muestreo no probabilístico y se obtuvieron 107 muestras procedentes del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Juárez de México. Estas muestras pertenecieron a pacientes internos y externos de edad y género indistinto que padecían alguna ITU causada por *Escherichia coli*.

8.3. Duración

Abril de 2016 a enero de 2017.

8.4. Criterios de inclusión

- Urocultivo positivo a *Escherichia coli*
- Sin tratamiento
- Edad indistinta
- Género indistinto
- > 100 000 UFC.

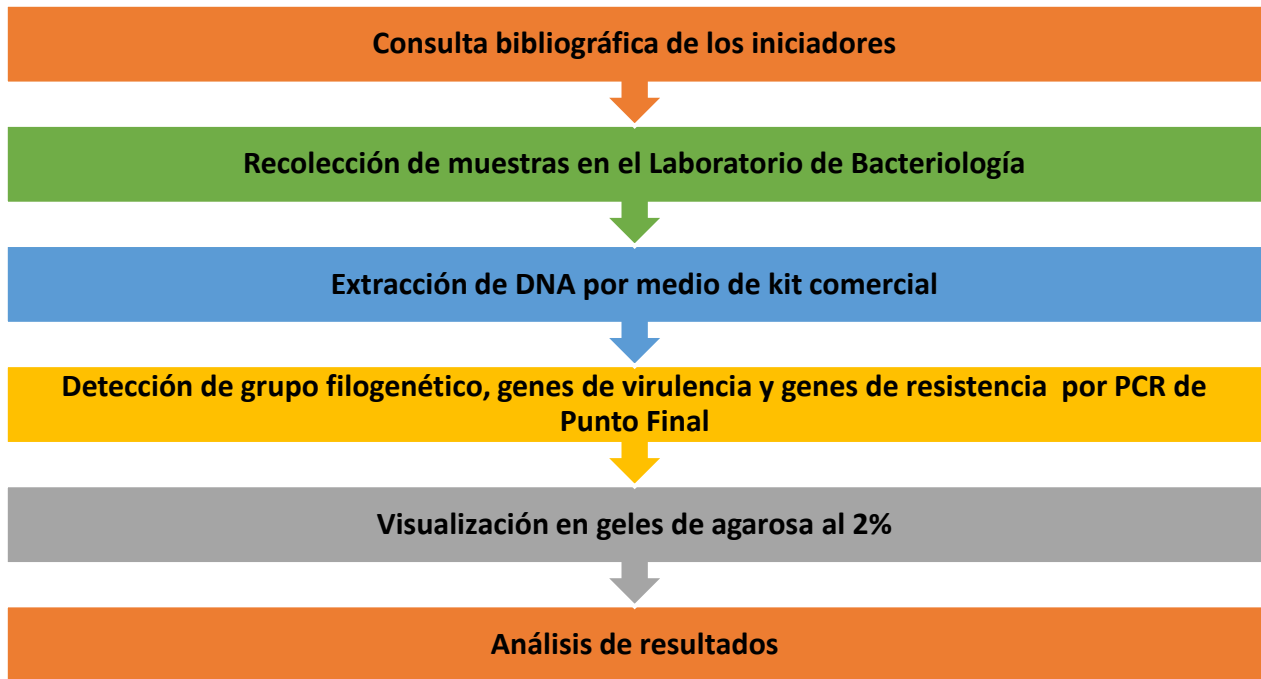
8.5. Criterios de no inclusión

- Urocultivo negativo a *Escherichia coli*
- <100 000 UFC
- Muestra insuficiente

8.6. Análisis estadístico

Se realizó la prueba de X^2 y de Fisher con el programa IBM SPSS Statistics 24 para comparar la distribución de la resistencia antimicrobiana y genes de virulencia entre pacientes hospitalarios y comunitarios.

8.7. Diagrama de flujo



8.7.1. Consulta bibliográfica

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los diferentes iniciadores utilizados para la detección del grupo filogenético, genes de virulencia y resistencia en *Escherichia coli*, para posteriormente verificarlos mediante un PCR *in silico*, el cual es una herramienta bioinformática que nos da un alineamiento teórico en el genoma de la bacteria. Para esto, se utilizaron las plataformas de <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> y MFEprimer 2.0.

8.7.2. Recolección de muestras

Se acudió al laboratorio de bacteriología del hospital Juárez de México para recolectar las 107 muestras de pacientes internos y externos, tomando como referencia un urocultivo positivo a *Escherichia coli*.

8.7.3. Extracción de DNA bacteriano

La extracción de ADN bacteriano se llevó a cabo usando el QIAamp DNA Mini Kit (Cat No./ID: 51304) siguiendo las instrucciones del proveedor, las cuales se resumen a continuación:

Se agregaron 200 µl de cada muestra en tubos eppendorf de 1.5 ml, y posteriormente se le adicionaron 20 µl de proteinasa K y 200 µl de *buffer* AL, se homogeneizaron y se calentaron en un termoblock a 65°C por 15 minutos.

Una vez hecho esto, se agitaron y se colocó todo el contenido a una columna de filtración con su respectivo tubo colector y se centrifugaron a 11 000 rpm durante 2 minutos (NOTA: todos los pasos de centrifugación se llevaron a cabo a temperatura ambiente de 15-25°C).

La columna se puso en un tubo colector nuevo y se le agregaron 500 µl del *buffer* de lavado AW1. Se centrifugaron a 11 000 rpm durante 2 minutos. Posteriormente se realizó un segundo lavado con el *buffer* AW2 y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 5 minutos.

Por último, para el proceso de elución la columna se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo, se le agregaron 60 µl del *buffer* de elución AE y se centrifugaron a 11 000 rpm durante 2 minutos. El ADN extraído se almacenó a -20°C hasta su uso.

8.7.4. Amplificación por PCR de Punto Final

a) Grupo filogenético

La identificación de los 4 grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Clermont y col., 2000 (Fig. 6). La *master mix* se preparó con las siguientes cantidades de reactivo por cada muestra a analizar:

REACTIVO	CANTIDAD
Buffer	3.25 μ l X N
DNPT's	1 μ l X N
F _{chuA}	1 μ l X N
R _{chuA}	1 μ l X N
F _{yjaA}	1 μ l X N
R _{yjaA}	1 μ l X N
F _{TspE4.C2}	1 μ l X N
R _{TspE4.C2}	1 μ l X N
Taq Polimerasa	0.25 μ l X N
Agua libre de endonucleasas	7.5 μ l X N

Tabla 4. Cantidades de reactivos utilizados para la identificación del grupo filogenético de *Escherichia coli* por PCR de punto final.

Para esta identificación se usaron 2 µl del ADN extraído y los iniciadores utilizados se muestran en la Tabla 6. La PCR se realizó con las siguientes condiciones:

94°C por 4 minutos	
30 ciclos	94°C por 5 minutos
	59°C por 10 segundos
	72°C por 30 segundos
72°C por 5 min	
4°C HOLD	

Tabla 5. Condiciones para la detección del grupo filogenético por PCR de punto final.

Para estos ensayos se utilizaron como cepas control: *E. coli* LMM36-ULA (*chuA* + y *yjaA* +) y *E. coli* LMM32-ULA (*TspE4.C2* +).

GEN	INICIADORES 5'-3'	REFERENCIA
chuA F chuA R	TGCCGCCAGTACCAAAGACA GACGAACCAACGGTCAGGAT	Clermont y col., 2000
yjaA F yjaA F	TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	Clermont y col., 2000
TspE4C2 F TspE4C2 R	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	Clermont y col., 2000

Tabla 6. Iniciadores para identificación del grupo filogenético de las cepas de *Escherichia coli*.

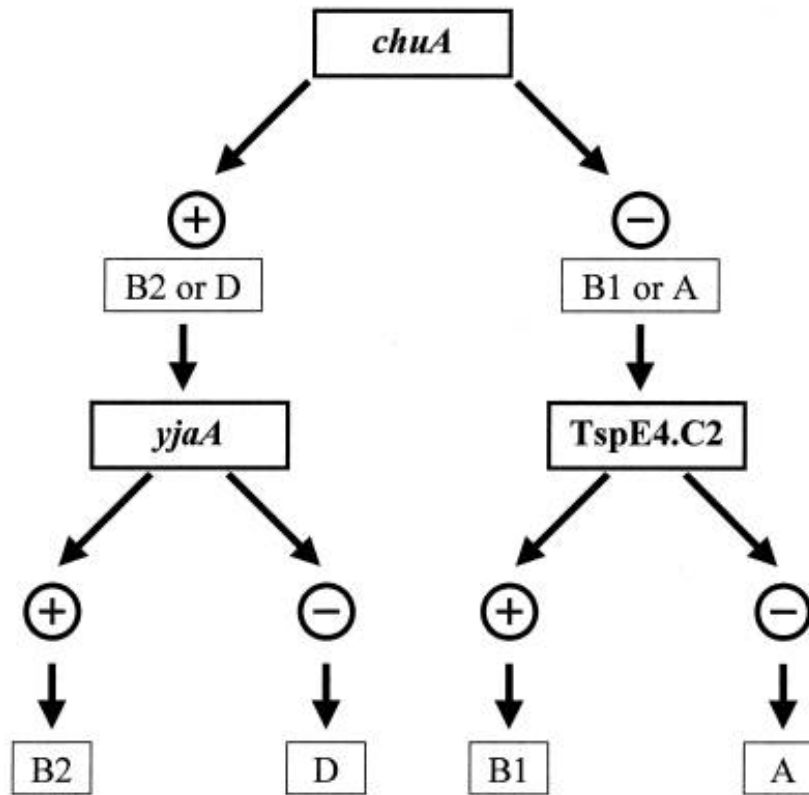


Figura 6. Diagrama utilizado para la determinación del grupo filogenético. Está basado en la presencia o ausencia de los genes *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2*. Tomado de Clermont y col., 2000.

b) Genes de virulencia

Se realizó la detección de los siguientes genes de virulencia: fimH, traT, cnf1, iutA y papC y para esto se utilizaron 2 μ l del DNA previamente extraído y las cantidades de reactivos mostrados en la Tabla 7. Los iniciadores utilizados y las condiciones de la PCR se muestran en las Tablas 8 y 9.

REACTIVO	CANTIDAD
Buffer	3.25 μ l X N
DNTP's	1 μ l X N
F _{fimH}	1 μ l X N
R _{fimH}	1 μ l X N
F _{tratT}	1 μ l X N
R _{tratT}	1 μ l X N
F _{cnf1}	1 μ l X N
R _{cnf1}	1 μ l X N
F _{papC}	1 μ l X N
R _{papC}	1 μ l X N
F _{iutA}	1 μ l X N
R _{iutA}	1 μ l X N
Taq Polimerasa	0.25 μ l X N
Agua libre de endonucleasas	PCR dúplex: 9.5 ul X N PCR triplex: 7.5 ul X N

Tabla 7. Cantidades de reactivos utilizados para la identificación de genes de virulencia por PCR de punto final.

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones:

94°C por 4 minutos	
30 ciclos	94°C por 5 minutos
	59°C por 10 segundos
	72°C por 30 segundos
72°C por 5 min	
4°C HOLD	

Tabla 8. Condiciones para la detección de genes de virulencia por PCR de punto final.

GENES DE VIRULENCIA	SECUENCIA 5'-3'	REFERENCIA
traT F traT R	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	Neamati y col., 2015
fimH F fimH R	TCGAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	Adams y col., 2012
iutA F iutA R	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	Ahmed y col., 2013
papC F papC R	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	White y col., 2011
cnf1 F cnf1 R	TCACGGGAATGAACTTATCACCC GTGACATGGCAAATGATTACAGC	Pass y col., 2000

Tabla 9. Iniciadores para la amplificación por PCR de punto final de los genes de virulencia de *Escherichia coli*.

c) Genes de resistencia

Se realizó la amplificación de los siguientes genes de resistencia: bla_{CTX-M}, bla_{OXA} y bla_{SHV} utilizando los iniciadores mostrados en la Tabla 12. Las cantidades de reactivos utilizadas se muestran en la Tabla 10.

REACTIVO	CANTIDAD
Buffer	3.25 µl X N
DNPT's	1 µl X N
F _{CTX-M}	0.5 µl X N
R _{CTX-M}	0.5 µl X N
F _{SHV}	1.5 µl X N
R _{SHV}	1.5 µl X N
F _{OXA}	1 µl X N
R _{OXA}	1 µl X N
Taq Polimerasa	0.25 µl X N
Agua libre de endonucleasas	PCR dúplex: 9.5 µl X N PCR individual: 11.5 µl X N

Tabla 10. Cantidades de reactivos utilizados para la identificación de genes de resistencia por PCR de punto final.

La PCR se llevó a cabo bajo las condiciones mostradas en la Tabla 11.

94°C por 4 minutos	
30 ciclos	94°C por 5 minutos
	59°C por 10 segundos
	72°C por 30 segundos
72°C por 5 min	
4°C HOLD	

Tabla 11. Condiciones para la detección de genes de resistencia por PCR de punto final.

GENES DE RESISTENCIA	SECUENCIA 5'-3'	REFERENCIA
BLA_{CTX-M}	GACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGC AGCCGCCGACGCTAATACA	Geyer y Hanson, 2013
BLA_{OXA}	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	Magoué y col., 2013
BLA_{SHV}	GATGAACGCTTTCCCATGATG CGCTGTTATCGCTCATGGTAA	Hassan y Shobrak, 2015

Tabla 12. Iniciadores para la amplificación por PCR de punto final de los genes de resistencia de Escherichia coli.

8.7.5. Visualización por electroforesis

Los productos de la PCR de punto final obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y un marcador de peso molecular de 50 y 100 pb según fue necesario. Después de esto, las imágenes de los geles fueron analizadas con el software ImageLab 5.

Por último, se analizaron los resultados obtenidos para conocer los genes de factores de virulencia y resistencia a antibióticos más frecuentes en pacientes hospitalizados y pacientes externos del Hospital Juárez de México.

9. Resultados

En este trabajo se recolectaron 107 muestras provenientes de diferentes servicios del hospital que fueron confirmadas como positivas a *Escherichia coli* en el laboratorio de Bacteriología, de las cuales 70/107 (65%) pertenecieron al género femenino y 37/107 (35%) al género masculino (Fig. 7).

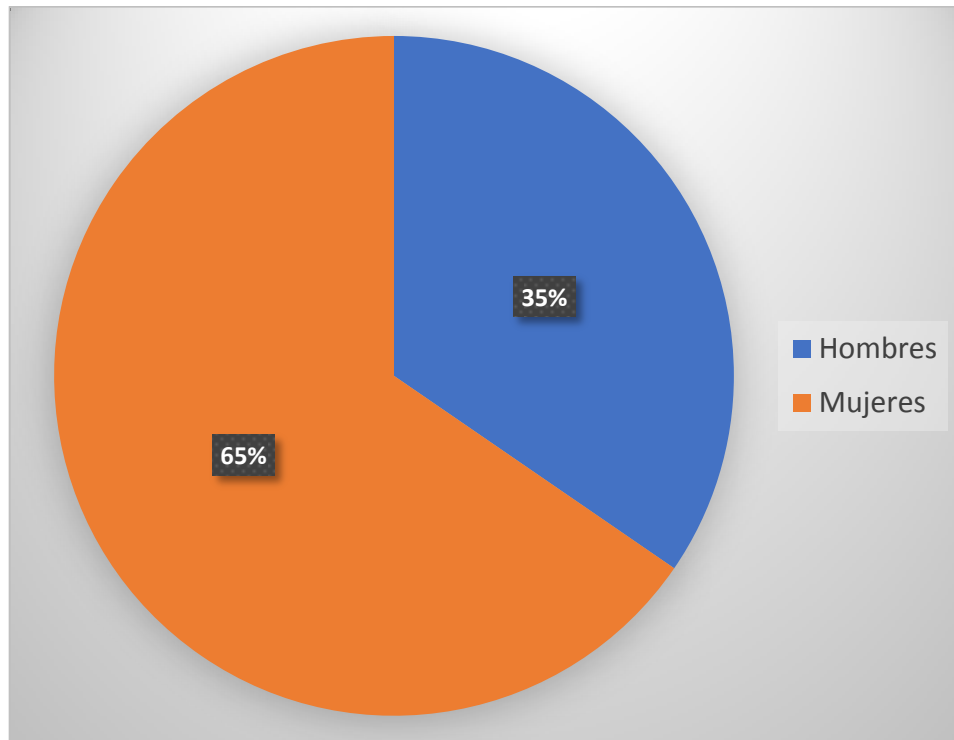


Figura 7. Porcentaje de muestras colectadas de acuerdo al género.

9.1. Consulta de expedientes

Se realizó una consulta de los expedientes de los 107 pacientes para conocer las manifestaciones clínicas que presentaban al momento de la infección en vías urinarias. La presencia de nitritos y leucocitos en la orina no es normal en una persona sana, así que se investigaron principalmente esas dos variables, obteniéndose que el 55% de los pacientes obtuvo un resultado positivo a nitritos en el examen general de orina.

Por otro lado, el 75% de los pacientes presentaba leucocitos en orina por encima de los valores normales (0 – 10 leucocitos/ μ l), encontrándose la mayoría en un rango de 70 – 500 leucocitos/ μ l. También se observó que el 20% de los pacientes presentaba eritrocitos en orina por encima de los valores considerados como normales (1 – 5 eritrocitos/ μ l).

Aunque la presencia de células epiteliales abundantes es común en pacientes con infección en vías urinarias, se observó que solo el 2.5% de los pacientes presentaba células epiteliales abundantes (Fig. 8).

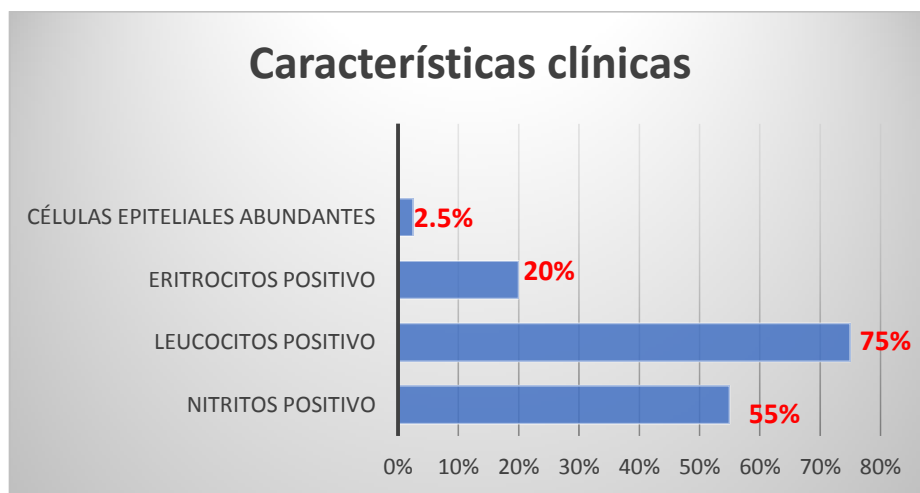


Figura 8. Características clínicas de los pacientes que padecen una ITU causada por *Escherichia coli*.

9.2. Verificación de iniciadores por PCR *in silico*

Antes de comenzar la detección de cada uno de los genes, se realizó la verificación de los iniciadores por medio de una PCR *in silico* (Fig. 9), esto ayudó a conocer diferentes factores que podrían afectar la eficiencia de la reacción, como el contenido de CG, temperatura de alineamiento y especificidad, evitando así el alineamiento en secuencias no deseadas. Todos los iniciadores se alinearon de forma correcta en la plataforma.

MFEprimer-2.0
A fast thermodynamics-based program for checking PCR primer specificity

Single Mode Check Dimer Batch Mode Virtual Electrophoresis

Background database selection: (Multiple database selection)
E. coli - Genomic & RNA

Enter the primer sequences (5' → 3'): (Batch primer sequences) Example Clear
Sequence 1: TCGAGAACGGATAAGCCGTGG Clear
Sequence 2: GCGATCACCTGCCCTCCGGTA Clear
Add + Del - Run Reset

Results filter settings [optional]:
Tm (°C): From: 30.0 To: 80.0 PPC (%): From: 30.0
Size (bp): From: 50 To: 2000

Experimental settings [optional]:
Concentration of monovalent cations (usually KCl, mM): 50.0 Concentration of dNTPs (mM): 0.25
Concentration of divalent cations (usually MgCl₂, mM): 1.5 Annealing oligo concentration (nM): 50.0

Amplicon details

1: Seq1 + Seq2 ==> NC_007946.1 Escherichia coli UTI89 chromosome, complete genome.

PPC = 100.0%, Size = 506 (bp), GC content = 53.4%
Fp: Tm = 62.8 (°C), ΔG = -24.0 (kcal/mol), 3'ΔG = -4.2 (kcal/mol)
Rp: Tm = 66.8 (°C), ΔG = -25.7 (kcal/mol), 3'ΔG = -3.3 (kcal/mol)
Binding sites: 4913906(21/21) ... 4914411(21/21)

```
>>>Seq1
1          21
5' TCGAGAACGGATAAGCCGTGG 3'
.....
5' TCGAGAACGGATAAGCCGTGGcccggtggcgctttatttgac...ttaacggcaattacgcacgTACCGGAGGGCAGGTGACTGC 3'
4913906
3' TACCGGAGGGCAGGTGACTGC 5'
21          1
Seq2<<<
```

>Amp_1 Seq1 + Seq2 ==> NC_007946.1 Escherichia coli UTI89 chromosome, complete genome.
TCGAGAACGGATAAGCCGTGGcccggtggcgctttatttgaccccggtgagcagtgccgggggagtgccgattaaagctgg
ctcaattaattgccgtgcttattttgacagaccaacaactataacagcgatgatttccagtttgtgtggaatatttacg
ccaataatgatgtggtggccactggcggtgctgcatgtttctgctcgtgatgtcaccgttactctgccgactaccct
ggttcagtgccgattccttaccggtttatttgccgaaaagccaaaacctggggattacotctccggcacaaccgcaga
tgcgggcaactcgattttcaccaaataccgctgctttaccocgcgcagggcgtggcggtacagttgacgcgcaacggta
cgattattccagcgaataacacgggtatogttaggagcagtagggacttoggcggaagtctgggattaaocgcaattac
gcacgTACCGGAGGGCAGGTGACTGC

Figura 9. Resultados de la verificación de iniciadores por medio de PCR *in silico* en la plataforma MFEprimer 2.0.

Verificación de iniciadores por PCR de punto final

Una vez hecho esto, cada par de iniciadores se probó mediante una PCR de punto final para verificar su funcionamiento. Todos los iniciadores se alinearon correctamente y no hubo productos inespecíficos. Posteriormente, tomando en cuenta el tamaño de los amplicones, se optimizaron las condiciones para una serie de reacciones multiplex, quedando de la siguiente manera: para la identificación del grupo filogenético, se diseñó una PCR triplex con los genes *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2* (Fig. 10).

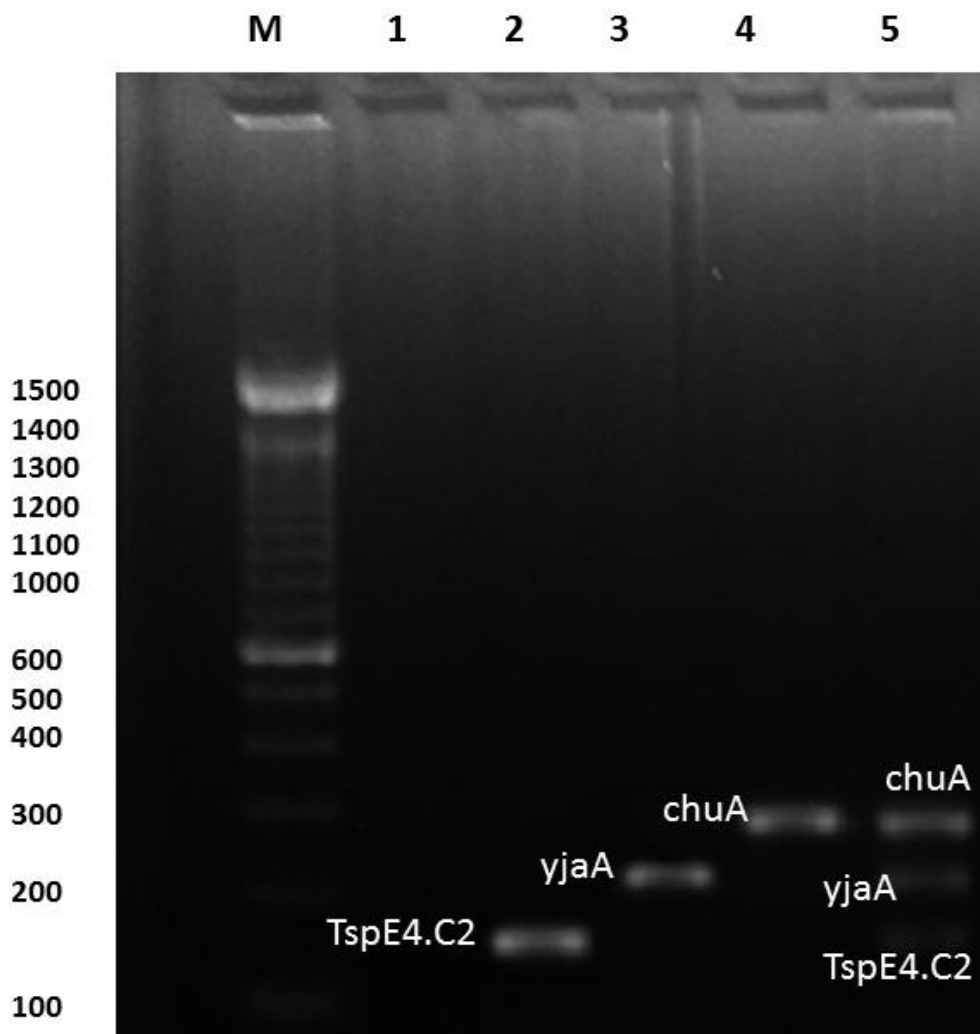


Figura 10. Identificación del grupo filogenético por PCR de punto final. Los carriles 2-4 muestran los genes detectados de forma individual, mientras que en el carril 5 se muestran detectados en una sola reacción multiplex.

Para el caso de los genes de virulencia, *fimH* y *traT* se detectaron simultáneamente en una PCR dúplex y *papC*, *iutA* y *cnf1* en una segunda PCR triplex (Fig. 11).

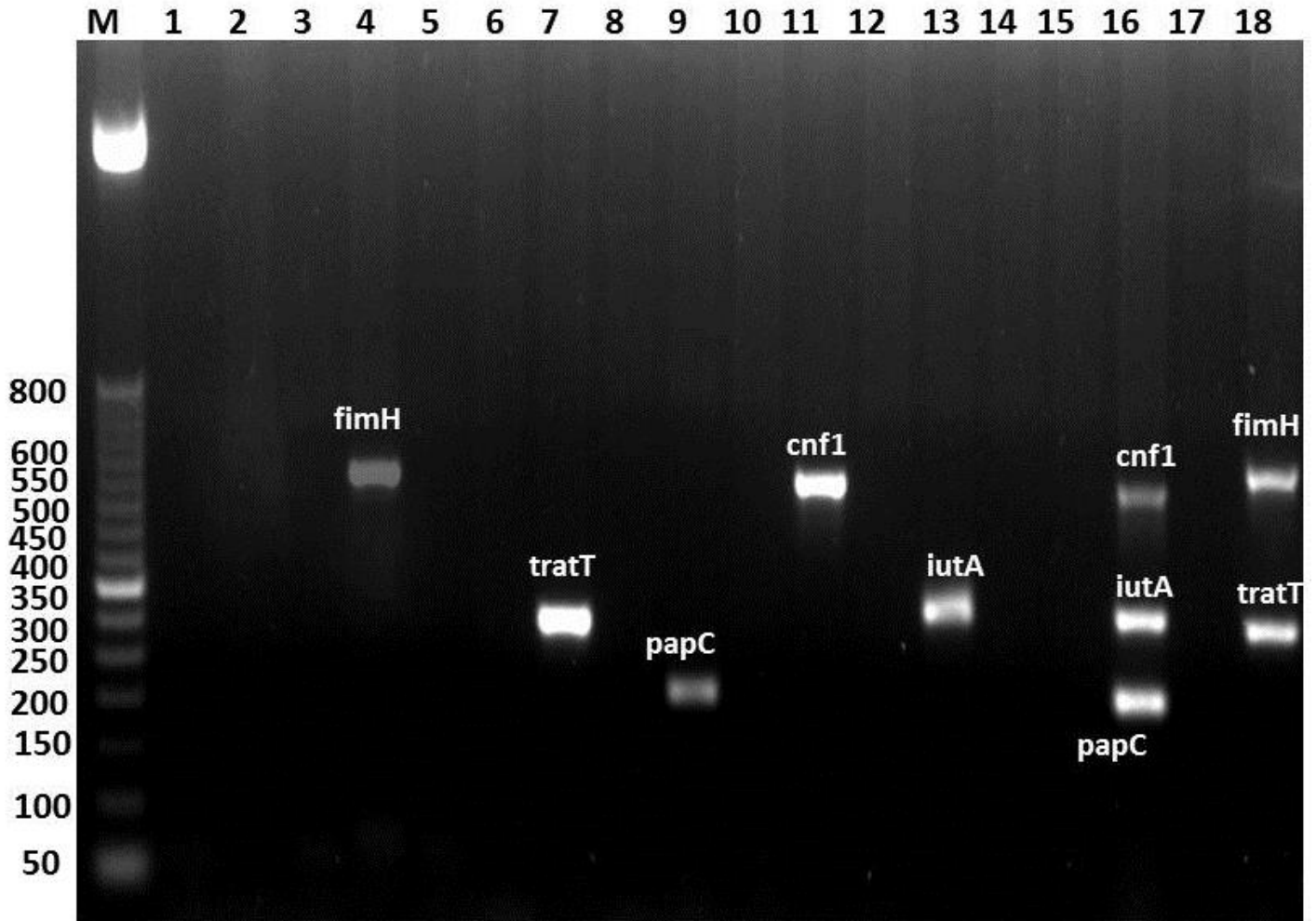


Figura 11. Detección de genes de virulencia por PCR de punto final. Los carriles 4-13 muestran los genes detectados de forma individual, mientras que en los carriles 16 y 18 se muestran detectados en dos reacciones multiplex.

Por último, para los genes de resistencia, una PCR dúplex fue realizada para los genes *CTX-M* y *SHV*, y el gen *OXA* se detectó de manera individual (Fig. 12).

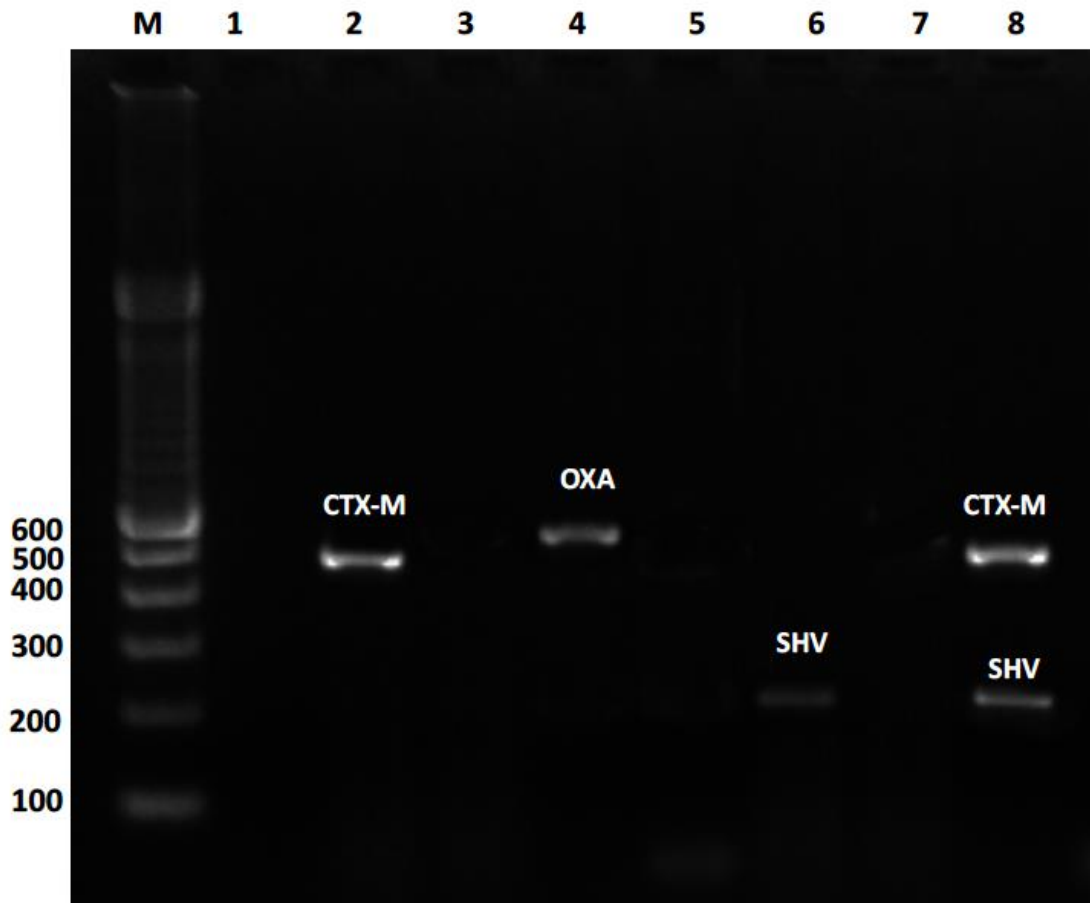


Figura 12. Detección de genes de resistencia por PCR. Los carriles 2-6 muestran los 3 genes detectados de forma individual. El carril 8 muestra la detección de los genes *CTX-M* y *SHV* en una sola reacción.

9.3. Detección del grupo filogenético por PCR en muestras biológicas

Una vez verificados cada uno de los iniciadores, se realizó la identificación del grupo filogenético en las 107 muestras, obteniéndose como más frecuente el grupo B2 con 45/107 (42%), seguido por el grupo A con 29/107 (27%). Los grupos D y B1 se encontraron en proporciones menores, 26/107 (24%) y 7/107 (7%) respectivamente (Fig. 13).

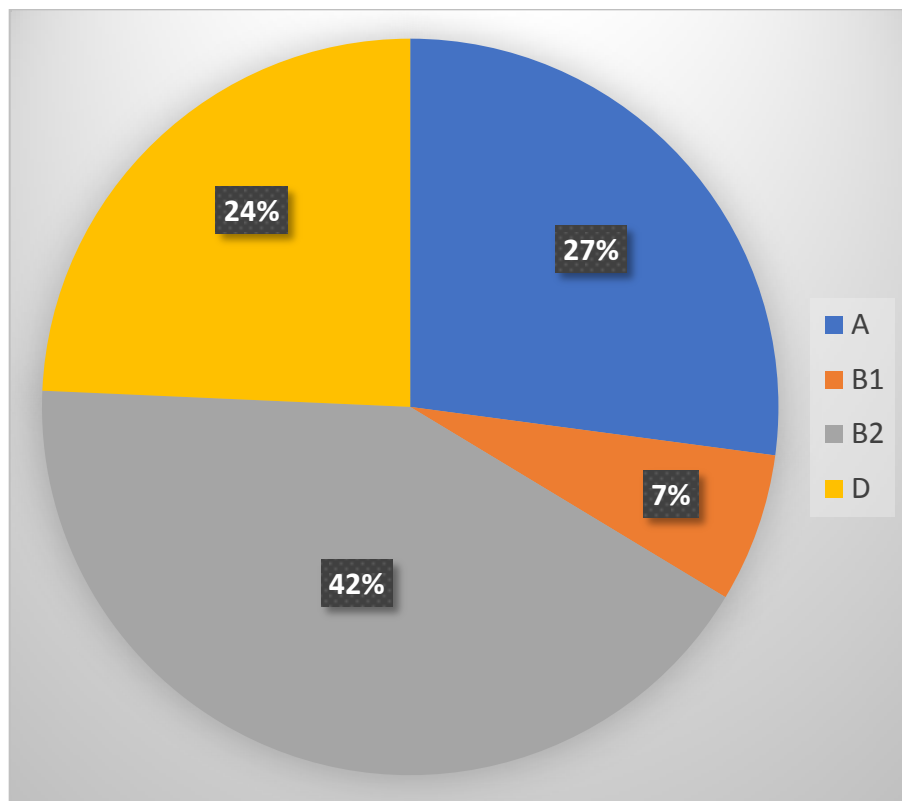


Figura 13. Porcentajes de grupos filogenéticos encontrados en las 107 muestras analizadas.

9.4. Distribución de grupos filogenéticos entre pacientes internos y externos

Con la ayuda del software SPSS 24, se compararon las frecuencias de cada grupo filogenético tanto en pacientes internos como externos y se observó que los pacientes internos parecen ser más afectados por las cepas pertenecientes a los grupos B2 y B1, mientras que los pacientes externos sufren más infecciones por cepas de los grupos A y D, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$) (Fig. 14).

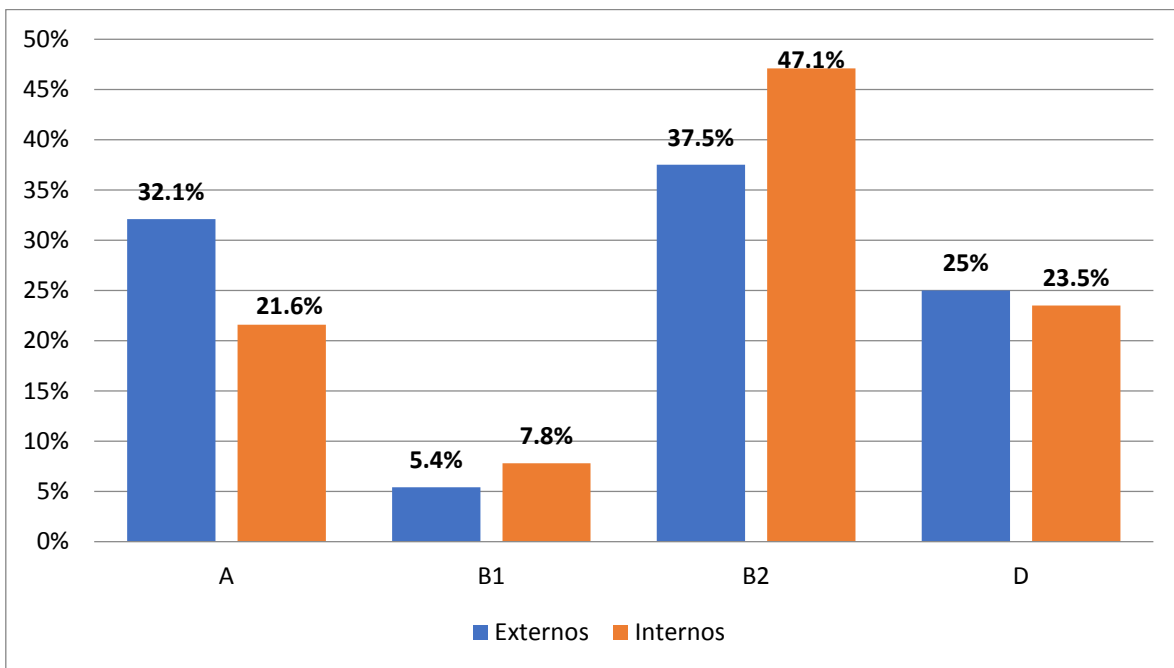


Figura 14. Distribución de grupos filogenéticos en pacientes internos y externos. La gráfica muestra el porcentaje de pacientes con infecciones causadas por cepas pertenecientes a cada grupo filogenético.

Una vez realizada la identificación del grupo filogenético, se seleccionaron solamente las muestras pertenecientes a los grupos B2 y D para la identificación de los genes de virulencia y resistencia y su distribución en los pacientes internos y externos, quedando un total de 71 muestras.

9.5. Detección de genes de virulencia por PCR en muestras biológicas

Seguido de hacer la identificación de los grupos filogenéticos, se realizó la detección de los 5 genes de virulencia en las 71 muestras pertenecientes a los grupos B2 y D tanto de pacientes externos como internos, obteniéndose que 66/71 (93%) muestras presentaron el gen fimH; 46/71 (64.8%) presentaron el gen traT; 15/71 (21.1%) fueron positivas al gen cnf1; 35/71 (49.3%) presentaron el gen papC y 58/71 (81.7%) presentaron el gen iutA (Fig. 15).

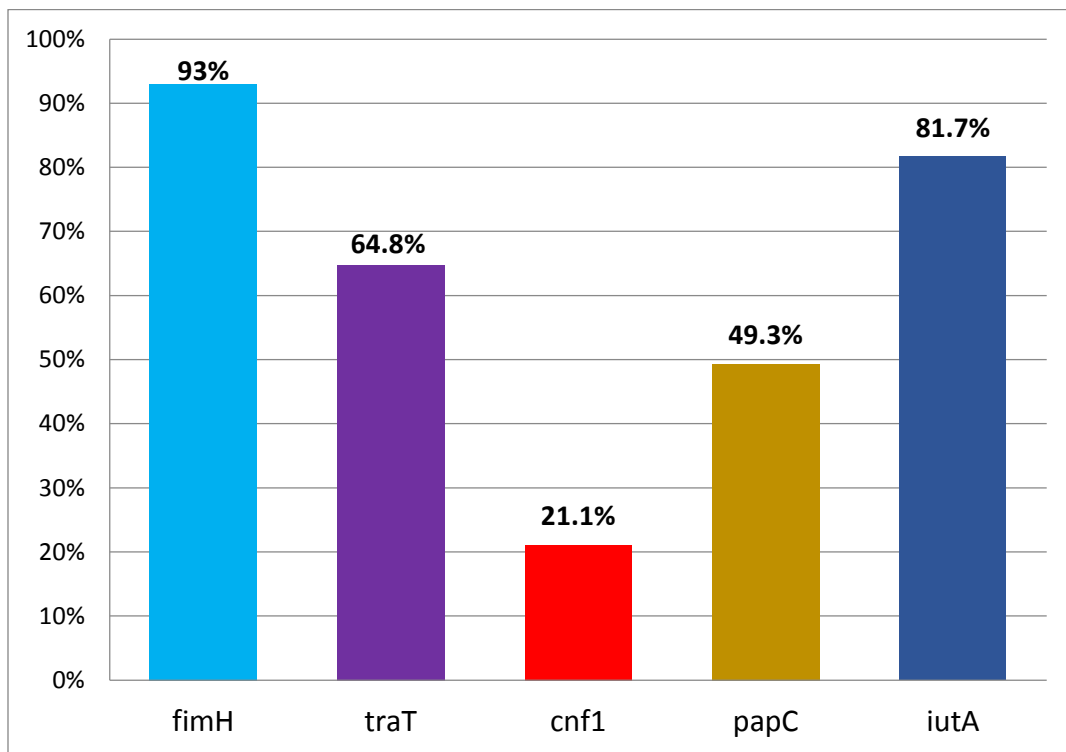


Figura 15. Porcentaje de genes de virulencia encontrados en las muestras pertenecientes a los grupos filogenéticos B2 y D.

9.6. Comparación de genes de virulencia entre pacientes internos y externos

Al realizar la prueba de X^2 para comparar la presencia de los 5 genes de virulencia en ambas poblaciones se encontró una diferencia estadística en la presencia del gen traT ($p < 0.01$), con una proporción mayor en los pacientes internos (80.6%). De igual forma, la presencia del gen iutA mostró diferencias estadísticas ($p < 0.05$), encontrándose una proporción mayor en los pacientes internos (91.7%). No se observaron diferencias estadísticas en la presencia de los genes fimH, papC y cnf1 en pacientes internos y externos (Fig. 16).

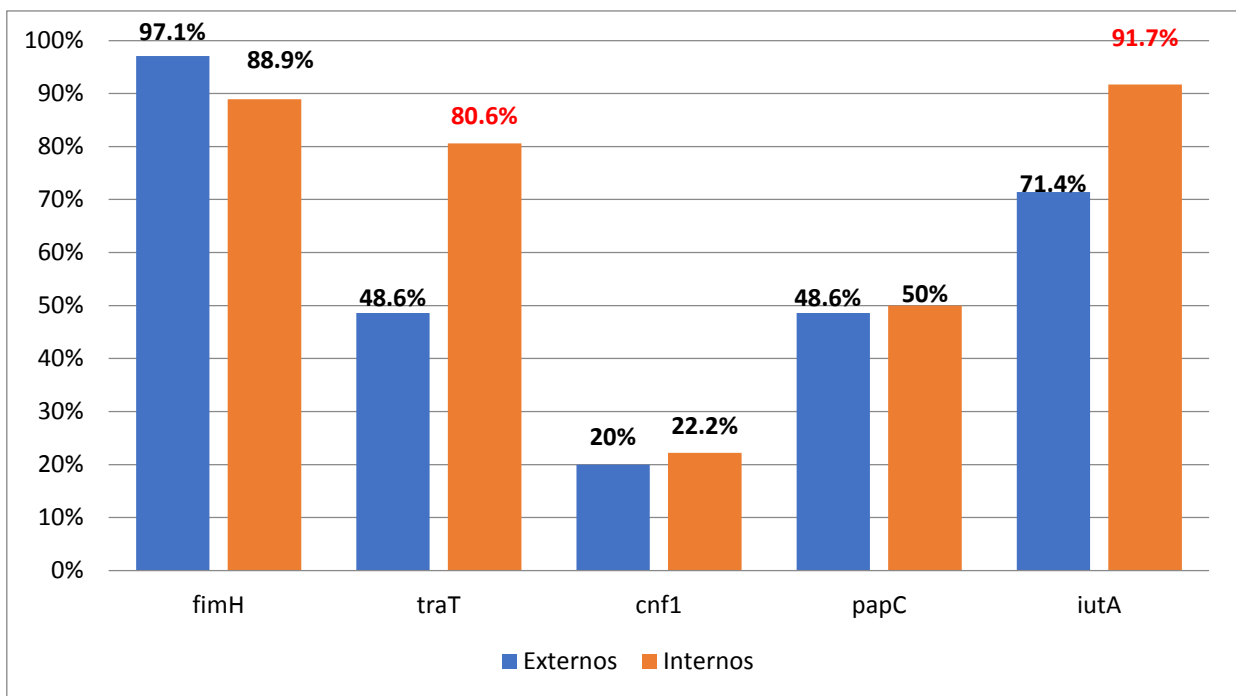


Figura 16. Distribución de genes de virulencia en pacientes internos y externos. La gráfica muestra el porcentaje de pacientes que presentaba cada uno de los 5 genes de virulencia. Los valores en rojo son significativos para una $p < 0.05$.

9.7. Detección de genes de resistencia por PCR en muestras biológicas

Una vez terminada la detección de los genes de virulencia, se procedió a realizar la detección de los 3 genes de resistencia en las 71 muestras, encontrándose que 44/71 (62%) muestras presentaron el gen CTX-M, 41/71 (57.7%) presentaron el gen OXA y solo 1/71 (1.4%) presentó el gen SHV (Fig. 17).

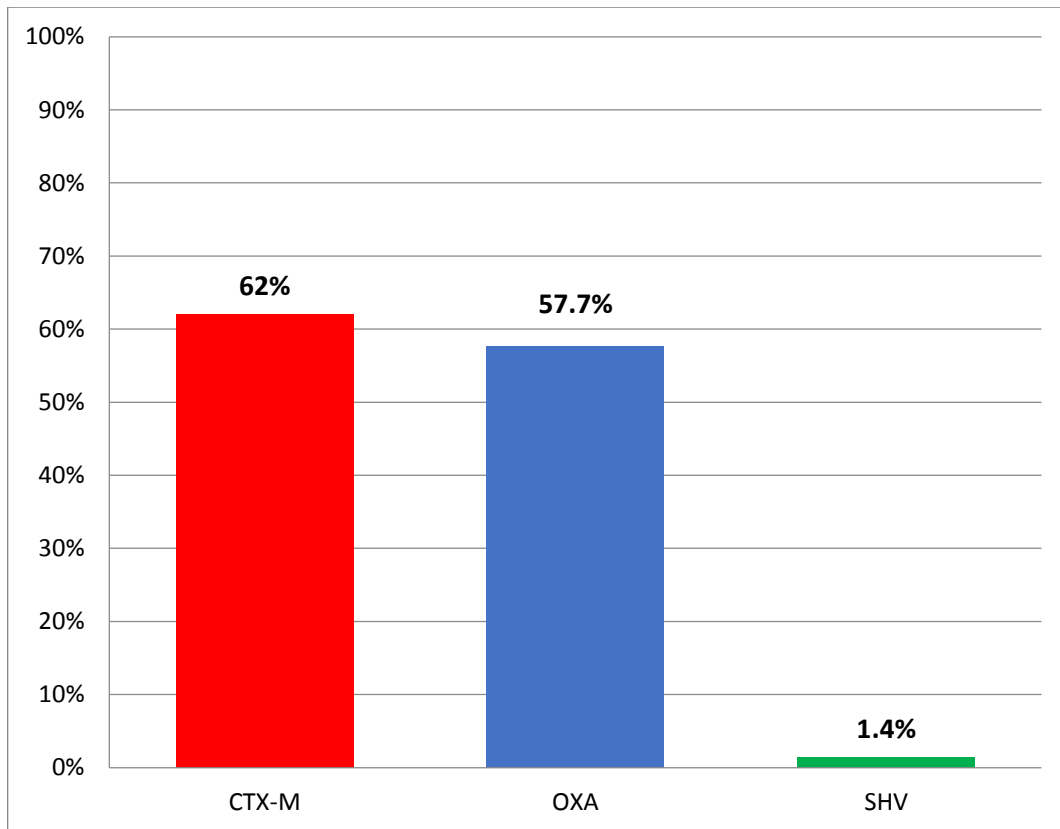


Figura 17. *Porcentaje de genes de resistencia encontrados en las muestras pertenecientes a los grupos filogenéticos B2 y D.*

9.8. Distribución de genes de resistencia entre pacientes internos y externos

Se analizó estadísticamente la distribución de los genes de resistencia en pacientes internos y externos y se observó una diferencia estadística ($p < 0.0001$) en la presencia del gen CTX-M, encontrándose en el 83.3% de los pacientes internos. De igual forma, en el caso del gen OXA hubo una diferencia estadística ($p < 0.05$), encontrándose en el 69.4% de los pacientes internos. La única muestra positiva para el gen SHV perteneció a un paciente interno (Fig. 18).

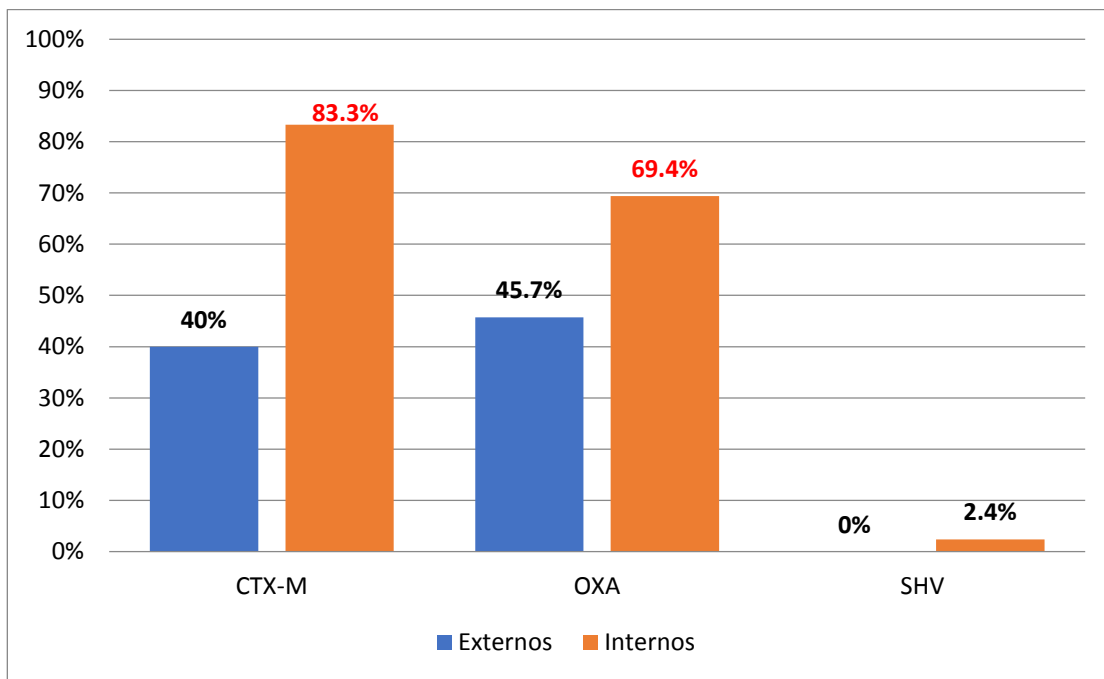


Figura 18. Distribución de genes de resistencia en pacientes internos y externos. La gráfica muestra el porcentaje de pacientes con infecciones causadas por cepas que tienen genes de resistencia a antibióticos. Los valores en rojo son significativos para una $p < 0.05$.

9.9. Relación entre genes de virulencia y resistencia

Para realizar este análisis se tomaron en cuenta aquellas muestras positivas para cada gen de virulencia y se vio qué porcentaje de éstas poseían, además, alguno de los genes de resistencia, obteniéndose lo siguiente:

- De las muestras que poseían el gen fimH, 41/66 (62.1%) también tenían el gen CTX-M, 1/66 (1.5%) el gen SHV y 40/66 (60.6%) tenía el gen OXA.
- De las muestras positivas al gen traT, 32/46 (69.6%) poseían también el gen CTX-M, 1/46 (2.2%) el gen SHV y 30/46 (65.2%) el gen OXA.
- De las muestras positivas al gen cnf1, 11/15 (73.3%) poseía también el gen CTX-M, mismo porcentaje que se compartió con el gen OXA. El gen SHV no estuvo presente en ninguna de estas muestras.
- De las muestras positivas al gen papC, 25/35 (71.4%) tenían el gen CTX-M, 1/35 (2.9%) tuvo el gen SHV y 26/35 (74.3%) tuvieron el gen OXA.
- De las muestras positivas al gen iutA, 41/58 (70.7%) poseía también el gen CTX-M, 1/58 (1.7%) tuvo el gen SHV y 39/58 (67.2%) tuvieron el gen OXA.

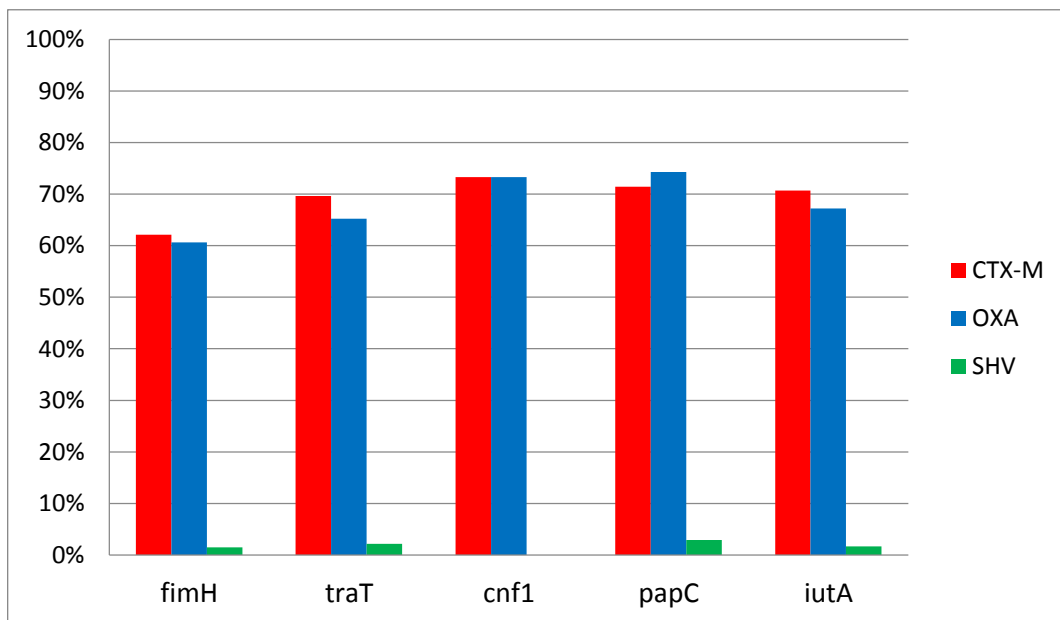


Figura 19. Relación entre genes de virulencia y resistencia. La gráfica muestra qué porcentaje de muestras presenta tanto genes de virulencia como de resistencia.

10. Discusión

Las infecciones del tracto urinario son más frecuentes en mujeres

En el presente trabajo se ha hablado de la importancia que tienen las infecciones del tracto urinario como un problema de salud pública, siendo *Escherichia coli* el agente causal más frecuente en este tipo de infecciones. El hecho de que esta bacteria posea genes de virulencia y resistencia provoca cuadros clínicos más complicados y una disminución en la efectividad del tratamiento. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las mujeres son el grupo más afectado por este tipo de infecciones, lo cual concuerda con resultados obtenidos en trabajos anteriores como los de Dielubanza y Schaeffer en el 2011. Esto puede deberse principalmente a dos factores: el primero es la corta uretra en las mujeres, lo cual provee un puente ideal para la invasión de patógenos y un rápido ingreso a la vejiga, y el segundo es la proximidad de la uretra femenina a reservorios de bacterias en el recto y vagina, lo cual también juega un papel importante, ya que la colonización de la mucosa periuretral con especies bacterianas procedentes de la microbiota intestinal es inevitable. En el caso de los hombres, la uretra es más larga, lo cual facilita el arrastre por orina de las bacterias ascendentes antes de que entren a la vejiga, siendo esto el probable principal factor protector de infección (Dielubanza y Schaeffer, 2011).

Manifestaciones clínicas

Los nitritos normalmente no se encuentran en la orina, éstos se producen cuando las bacterias reducen los nitratos urinarios a nitritos. La mayoría de los organismos Gram negativos y algunos Gram positivos son capaces de realizar esta conversión, por lo que un resultado positivo indica que estos microorganismos están presentes en una cantidad considerable. El hecho de que en un 45% de los expedientes analizados no se encontraran nitritos positivos podría indicar que en el momento del examen la cantidad de bacterias no era lo suficientemente elevada para dar un valor significativo. También debe tenerse en cuenta que esta prueba es muy específica pero poco sensible, por lo que un resultado positivo es útil, pero

un resultado negativo no descarta una infección del tracto urinario (Campuzano y Arbeláez, 2007).

El 75% de los pacientes presentaba leucocitos en orina por encima de los valores normales (0 – 10 leucocitos/ μ l), encontrándose la mayoría en un rango de 70 – 500 leucocitos/ μ l. La patología más comúnmente asociada a leucocituria es la infección urinaria (Laso, 2002), lo cual es un punto más a favor de la presencia de microorganismos en el tracto urinario. En cuanto a la presencia de eritrocitos en la orina, las causas más comunes son: hipercalciuria, traumatismos renales, infección urinaria, litiasis y tumores (Laso, 2002).

Las cepas pertenecientes a grupos filogenéticos comensales también pueden causar infecciones

Ha sido ampliamente descrito que la mayoría de las infecciones en vías urinarias son causadas por cepas pertenecientes a los grupos filogenéticos B2 y D, sin embargo, algunas cepas pertenecientes a los grupos comensales también pueden causar infecciones, tal como se vio en los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde el grupo filogenético A fue muy frecuente, ocupando el segundo lugar después del grupo B2. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Miranda y col. en el 2016 en dos localidades de México, donde los grupos filogenéticos más frecuentes fueron el B2 (42%) y el A (26.1%). La alta prevalencia encontrada del grupo B2 puede deberse a que la mayoría de las cepas que causan infecciones en vías urinarias proviene de este grupo (Russo y Johnson, 2000). La habilidad de una bacteria para colonizar un nuevo nicho y sobrevivir en él depende de la presencia de genes de virulencia; los grupos comensales suelen presentar una menor cantidad de estos genes, lo cual los haría menos aptos al momento de causar una infección. La alta prevalencia del grupo filogenético A en las muestras analizadas en este estudio podría deberse a que las cepas pertenecientes a este grupo pueden adquirir genes de virulencia en el tracto gastrointestinal por transferencia horizontal, lo cual les permite colonizar el tracto urinario (Moreno y col., 2006). Con respecto al grupo D, se observó una notable diferencia a la frecuencia de 6.5% reportada en el trabajo de Miranda y col., siendo

mucho más frecuente en nuestra población de estudio con un 24%. Estos resultados resaltan la importancia de realizar más estudios de este tipo, ya que muestran que incluso en poblaciones relativamente cercanas, las características genotípicas de *Escherichia coli* pueden variar ocasionando un comportamiento diferente. Por último, aunque el grupo filogenético B1 se encontró en una proporción muy baja (7%), resultados similares fueron obtenidos por Lee y col. en el 2010, donde se encontró en una frecuencia del 9% en pacientes con infecciones de tracto urinario.

En cuanto a la prevalencia de estos grupos filogenéticos entre pacientes internos y externos, no se observó ninguna diferencia estadística. Esto puede deberse a que la presencia de una ITU no depende directamente del grupo filogenético al que pertenezca la bacteria, sino más bien a la cantidad de genes (y su combinación) que posea, lo cual influye en el éxito de la infección (Chen y col., 2009).

Genes de virulencia

Cada gen de virulencia le otorga a la bacteria una característica especial para sobrevivir en el medio. En los resultados obtenidos destaca la alta frecuencia del gen de fimH, lo cual concuerda con lo reportado en estudios anteriores como los de López y col. en el 2014 y los de Miranda y col. en el 2016, donde se encontró en proporciones superiores al 80%. Según la literatura, la participación del gen fimH es crítica durante la infección del tracto urinario, permitiendo la colonización e invasión de la vejiga (Chen y col., 2009), lo cual explica por qué la mayoría de las cepas analizadas lo posee. Aunque en estudios realizados anteriormente como los de Croxall y col. en el 2011 no se habían reportado diferencias significativas en la presencia de genes de virulencia entre pacientes hospitalizados y ambulatorios, en el presente trabajo el análisis estadístico mostró que los pacientes internos poseen una mayor cantidad de genes de virulencia y son más afectados por los genes iutA y traT, en donde se observaron diferencias estadísticas. Estos resultados indican que las características genotípicas de las bacterias, en este caso de *Escherichia coli*, pueden variar incluso dentro de una misma población.

Genes de resistencia a antibióticos

Al estar contenidos en elementos móviles, los genes de resistencia representan un problema importante, ya que pueden ser transferidos de una cepa resistente a otra cepa que no presentaba resistencia, eliminando la necesidad de ser sometidos a una presión selectiva por la presencia de un antibiótico. En el presente trabajo se obtuvieron frecuencias elevadas de genes de resistencia, principalmente del gen CTX-M y OXA con un 62% y 57.7% respectivamente y se observó una diferencia estadística en la presencia de estos genes en los pacientes internos, siendo el grupo de estudio más afectado. Las instalaciones de cuidados a largo plazo como los hospitales, han sido descritos como reservorios de bacterias que presentan genes de resistencia, haciendo que los pacientes hospitalizados corran un mayor riesgo de adquirir una infección causada por una bacteria que presente alguno de estos genes. El gen CTX-M (en particular su variante CTX-M₁₅) ha atraído mucha atención en los últimos años ya que ha tenido una amplia diseminación a nivel global y otorga a la bacteria una resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación.

Relación entre genes de virulencia y resistencia

Los mecanismos de virulencia y resistencia, como la mayoría de los procesos biológicos, no son aislados. En el presente trabajo se mostró que los genes de virulencia suelen ir acompañados de uno o más genes de resistencia, incluso se observó una relación significativa del gen de virulencia iutA con los genes de resistencia CTX-M y OXA, y del gen papC con el gen OXA. El gen papC ha estado asociado a infecciones en vías urinarias complicadas como la pielonefritis y de ahí viene su nombre (Pyelonephritis Associated Pili), por lo que es importante ver que está relacionado con un gen de resistencia a antibióticos, en este caso el OXA, causando una posible complicación en el tratamiento de los pacientes que presentan una infección de este tipo. En trabajos anteriores como el de Arisoy y col. en el 2008, se ha probado que la coexistencia de genes de virulencia con genes de resistencia puede potenciar o disminuir este último mecanismo, por lo que se recomienda no tratar empíricamente a los pacientes con una infección

urinaria, ya que la combinación de estos genes puede afectar la efectividad del tratamiento y/o causar una respuesta diferente ante un mismo antibiótico.

11. Conclusiones

- Se logró identificar el grupo filogenético en las 107 muestras de *Escherichia coli* procesadas de pacientes internos y externos para su posterior análisis.
- Se lograron identificar los 5 genes de virulencia de *Escherichia coli* en nuestra población de estudio.
- Se realizó el análisis estadístico de la distribución de los genes de virulencia y resistencia, resultando que los pacientes internos son el grupo de estudio más afectado por ambos.
- La técnica de PCR de punto final demostró ser lo suficientemente sensible y específica para la detección de todos los genes descritos en este trabajo.

12. Perspectivas

Aunque en el presente trabajo se da un panorama probable de la situación epidemiológica de nuestra población, es necesario incrementar el número de muestras para dar un resultado más concluyente y así tener un mejor conocimiento de los mecanismos de virulencia y resistencia presentes en nuestra población, esto con el fin de brindar tratamientos más personalizados al paciente, y disminuir, en la mayor medida posible, las crecientes tasas de resistencia bacterianas debidas principalmente al mal manejo de los antibióticos.

13. Referencias Bibliográficas

1. Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146(3713), 837.
2. Alanis, A. J. (2005). "Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?" *Archives of medical research* 36(6): 697-705.
3. Andreu, A., Cacho, J., Coira, A., & Lepe, J. A. (2011). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(1), 52-57.
4. Arenas-Hernández M. y col. (2012). *Escherichia coli* uropatógena. En "Modelos de la Patogénesis de las Enfermedades Infecciosas II". Rocha-García, Rosa del Carmen, Lozano-Zarain, Patricia y Martínez-Laguna, Ygnacio. (Eds). *Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*. Puebla, México. ISBN. 978-607-487-476-1. Pág: 23-44.
5. Bouchillon S, Hoban DJ, Badal R, et al. Fluoroquinolone Resistance Among Gram-Negative Urinary Tract Pathogens: Global Smart Program Results, 2009-2010. *Open Microbiol J*. 2012;6:74-8.
6. Blanco, J.y col. (2002). Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*, McGraw-Hill Interamericana, Madrid: 301-325.
7. Secretaría de Salud. Boletín Epidemiológico Nacional (2015).
8. Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical microbiology reviews*, 14(4), 933-951.
9. Brooks, G. (2011). Jawetz, Melnick y Adelberg: microbiología médica (25a), McGraw Hill Mexico.
10. Campuzano Maya, G., & Arbeláez Gómez, M. (2007). El uroanálisis: un gran aliado del médico. *Revista Urología Colombiana*, 16(1).
11. Chen, S. L., Hung, C. S., Pinkner, J. S., Walker, J. N., Cusumano, C. K., Li, Z., ... & Hultgren, S. J. (2009). Positive selection identifies an in vivo role for FimH during urinary tract infection in addition to mannose binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52), 22439-22444.
12. Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4555-4558.
13. Croxall, G.y col. (2011). Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from a regional cohort of elderly patients highlights the prevalence of ST131 strains with increased antimicrobial resistance in both community and hospital care settings. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 66(11): 2501-2508.

14. Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264(5157), 375-383.
15. del Carmen Laso, M. (2002). Interpretación del análisis de orina. *Arch. argent. pediatr*, 100(2), 179.
16. Dhakal B, Kulesus R, Mulvey M. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur J Clin Invest*. 2008; 38 (S2):2–11.
17. Diagnóstico y Tratamiento de la Infección Aguda, no complicada del Tracto Urinario de la Mujer. México, Secretaría de Salud; 2009.
18. Dielubanza, E. J., & Schaeffer, A. J. (2011). Urinary tract infections in women. *Medical Clinics of North America*, 95(1), 27-41.
19. Donnenberg, M. S. (2002). *Escherichia coli*: virulence mechanisms of a versatile pathogen, *Elsevier*.
20. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventré A, Elion J, et al. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiol*. 2001;174:1671-6
21. Emő, L.y col. (2003). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22: 29-33.
22. Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews microbiology*, 13(5), 269-284.
23. Foxman, B. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Disease-a-month*, 49(2), 53-70.
24. Gholipour, A.y col. (2014). "Phenotypic and Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase Produced by *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in an Educational Hospital." *Jundishapur journal of microbiology*7(10).
25. Gorordo-Delsol, L. A. (2017). Panorama epidemiológico: ¿ en dónde quedó la sepsis. *Rev Fac Med UNAM*, 60(1), 61-2.
26. Hancock, V.y col. (2007). Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains. *FEMS microbiology letters* 267(1): 30-37.
27. Johnson JR, Kuskowski MA, O'Bryan TT, Maslow JN. Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *J Clin Infect*. 2002;185:1439-47.
28. Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical microbiology reviews* 4(1): 80-128.
29. Johnson, J. R.y col. (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E coli*". *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 139(3): 155-162.

30. Kaper, J. B. y col. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2(2): 123-140.
31. Lee, S., Yu, J. K., Park, K., Oh, E. J., Kim, S. Y., & Park, Y. J. (2010). Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with blaCTX-M. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 40(4), 361-367.
32. Litwin, M. S. y col. (2007). Urologic diseases in America, National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases, National Institutes of Health.
33. López-Banda, D. A., Carrillo-Casas, E. M., Leyva-Leyva, M., Orozco-Hoyuela, G., Manjarrez-Hernández, Á. H., Arroyo-Escalante, S.,... & Hernández-Castro, R. (2014). Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *BioMed research international*, 2014.
34. Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss R, III Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect. Immun.* 2003;71: 536-540.
35. Méndez-Álvarez, S. y col. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 22(3): 183-192.
36. Millán, Y. y col. (2014). Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Revista argentina de microbiología* 46(3): 175-181.
37. Mills M, Meysick KC, Brien AD. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial cells by an apoptotic mechanism. *Infect Immun.* 2000;68:5869–80.
38. Miranda-Estrada, L. I., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J., Parra-Rojas, I., González-Villalobos, E., & Castro-Alarcón, N. (2016). Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
39. Monte, E. G. (2012). Infecciones de tracto urinario. *Nefrología*, 6(1), 0.
40. Moreno, E., Prats, G., Planells, I., Planes, A. M., Pérez, T., & Andreu, A. (2006). Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 24(8), 483-489.
41. Mosquito, S. y col. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 28(4): 648-656.
42. Nielubowicz, G. R. y col. (2010). Host–pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature reviews urology* 7(8): 430-441.

43. OMS (2015). Proyecto de plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos.
44. Paterson, D.L, and Bonomo, R.A. (2005). Extended spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, 18, 657-686.
45. Paterson, D. L., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Yeiser, B., Bonomo, M. D., Rice, L. B., & Bonomo, R. A. (2003). Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(11), 3554-3560.
46. Poey, M. E. y col. (2012). Virulence profiles in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pregnant women and children with urinary tract abnormalities. *Microbial pathogenesis* 52(5): 292-301.
47. Puerta-García, A., & Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(51), 3426-3431.
48. Quinn, P. y col. (2005). Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias.
49. Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México* 44(5): 464-475.
50. Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA, Hultgren SJ. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med*. 2007;4:1949–58.
51. Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1753-1754.
52. Sheerin, N. S. (2011). Urinary tract infection. *Medicine*, 39(7), 384-389.
53. Soto, S. M. (2006). Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(8), 479-480.
54. Stamm, W.E. y Norrby, S.R. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J. Infect. Dis.* 183 (Suppl. 1), S1-S4 (2001).
55. Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(2), 116-129.
56. Van Hoek, A. H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., & Robberts, A. P. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology*, 2, 1-27.
57. Van Houdt, R. y col. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in microbiology* 156(5): 626-633.

58. Vázquez, E. G. y col. (2008). Significación clínica de las resistencias bacterianas: una perspectiva histórica (1982-2007). *Revista Española de Quimioterapia* 21(2): 115-122.
59. Weichhart T, Haidinger M, Hörl W, Säemann M. Current concepts of molecular defense mechanisms operative during urinary tract infection. *Eur J Clin Invest.* 2008;38 (S2):29–38.
60. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol.* 2009;85: 11–9.
61. Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and molecular pathology*, 85(1), 11-19.