



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

Hospital Central Sur de Alta Especialidad

**Identificación de los Clonotipos prevalentes de *Escherichia coli*  
extraintestinal en muestras de orina mediante Genotipificación de  
polimorfismos de nucleótido único en pacientes con infecciones de vías  
urinarias del Hospital Central Sur de Alta Especialidad**

Tesis

Para optar por el grado de:

**Maestría en Ciencias Médicas**

**PRESENTA**

Martín Coronado Malagón

**TUTORA DE TESIS**

Dra. Gloria Eugenia Queipo García

Hospital General de México Eduardo Liceaga - Facultad de Medicina UNAM -

Ciudad de México, Marzo de 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD DE PETRÓLEOS MEXICANOS

Maestría en Ciencias Médicas

**Identificación de los Clonotipos prevalentes de *Escherichia coli* extraintestinal en muestras de orina mediante Genotipificación de polimorfismos de nucleótido único en pacientes con infecciones de vías urinarias del Hospital Central Sur de Alta Especialidad**

01-03-20201

PRESENTA

Dr. Martín Coronado Malagón

Alumno de la Maestría en Ciencias Médicas UNAM

TUTOR

Dr. Gloria Eugenia Quinto García

Hospital General de México Eduardo Liceaga- Facultad de Medicina UNAM

RESPONSABLE DE LA UNIDAD ACADÉMICA

Dr. Jesús Reyes Figueroa

Hospital Central Sur de Alta Especialidad Pemex

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a la Dra. Gloria Eugenia Queipo García por su guía, apoyo y motivación durante esta odisea conocida como Maestría.*

*Agradezco al laboratorio de Biología Molecular, al Departamento de Genética del Hospital General de México Eduardo Liceaga y a la Química Sandra Araceli Gómez Martínez por su indispensable apoyo para el desarrollo de este proyecto.*

*Agradezco al Cuerpo de Gobierno y al Departamento de Enseñanza del Hospital Central Sur de Alta Especialidad por todo el apoyo que me brindaron para cursar la Maestría en Ciencias.*

## Índice

Contenidos	Páginas
<b>RESUMEN</b>	<b>5-6</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>7-14</b>
<i>E. coli</i>	8
<i>E. coli</i> extraintestinal	8-9
<i>ExPEC</i> y la Infección Urinaria	9-10
Resistencia antibiótica y <i>ExPEC</i>	10
Clasificación de <i>E. coli</i>	11
Clonotipificación y Susceptibilidad Antibiótica	11-13
Técnica de Septatipos	13-14
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>14</b>
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>15</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>15</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>15-16</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>16</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>16</b>
Metodología general	16
Población de estudio	16
Criterios de inclusión	17
Población y tamaño de muestra.	17
<b>Desarrollo</b>	<b>18-25</b>
<b>Análisis estadístico</b>	<b>26</b>
<b>Consideraciones Éticas</b>	<b>26</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>26-34</b>

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>34-37</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>37</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>38-40</b>

## **RESUMEN**

### **Introducción**

Las infecciones urinarias son un problema de salud frecuente, la gran mayoría son causadas por *Escherichia coli* (*E. coli*) extraintestinal. Esta bacteria tiene la característica de agruparse en clonas, y estos grupos clonales tienden a compartir ciertos patrones de susceptibilidad antibiótica. La técnica molecular basada en septatipos podría identificar las clonas prevalentes locales, incrementando nuestro conocimiento epidemiológico de las bacterias que afectan a nuestra población, y con la identificación de los patrones de resistencia específicos se podría en un futuro mejorar la prescripción antibiótica de nuestros pacientes.

### **Objetivos**

El objetivo del estudio fue la identificación de las clonas prevalente de *E. coli* en la población de nuestro hospital (HCSAE) utilizando la técnica de identificación clonal de septatipos, además de relacionar nuestros clonotipos locales con patrones de susceptibilidad antibiótica específicos en nuestro medio.

### **Métodos**

Se reclutaron pacientes con diagnóstico clínico de infección urinaria de los servicios de urgencias y hospitalización de un Hospital de Tercer Nivel, se corroboró por un médico el diagnóstico clínico de infección urinaria, se procedió a invitar a los pacientes a participar en el protocolo de investigación, posterior a aceptar y firmar el consentimiento informado se procedió a tomar una muestra de orina que se almacenó a 4°C para posteriormente enviarse para análisis molecular. Se tomó adicionalmente examen general de orina, urocultivo y estudios generales, se registraron los datos demográficos. Las muestras fueron procesadas para determinar PCR en punto final para detectar el gen PNPasa específico de *E. coli*, las muestras positivas para PNPasa fueron procesadas para determinar la presencia o ausencia de 7 genes mediante PCR en tiempo real, con los resultados se identificaron los clonotipos prevalentes usando un código binario, del clonotipo más frecuente identificado en la muestra se comparó la proporción de susceptibilidad a los 8 antibióticos más usados en la práctica clínica en

comparación con el resto de la muestra mediante prueba exacta de Fisher, se consideró como significativo un valor de p menor a  $p = 0.5$ .

## **Resultados**

Se reclutaron un total de 50 pacientes con una media (SD $\pm$ ) de edad de 61.1 años  $\pm$  16.5, predominaron las mujeres con un 80% y el resto fueron hombres con un 20%, dentro de la categoría de infecciones urinarias predominaron las complicadas con un 66% y las no complicadas con un 44%. Las comorbilidades más frecuentes en nuestra población fueron la Diabetes Mellitus y la Hipertensión arterial con una prevalencia del 50% aproximadamente. De las 50 muestras resultaron positivas a PNPasa 35 y en 25 se logró identificar un clonotipo (50%). La técnica de PCR en tiempo real para PNPasa seguida de RT-PCR de 7 SPN's y la clonotipificación basada en el sistema binario que implementamos tuvo una sensibilidad del 81%, especificidad del 72%, un VPP del 68%, un VPN del 84%, una concordancia del 76% y un índice de Kappa de .52 (concordancia moderada). Los septatipos 511, 500, 001, 501, 571 y 771, representaron el 68% del total. De las 50 muestras se logró determinar la susceptibilidad antibiótica en 21 y de 16 se obtuvieron los datos completos de susceptibilidad y clonotipo. Al comparar las proporciones de susceptibilidad del septatipo 500 a amikacina, ampicilina, ceftriaxona, cefotaxima, ciprofloxacino, nitrofurantoína y levofloxacina, fueron todas diferentes en comparación al resto de los clonotipos no-500. Los dos aislamientos del clonotipo 501 fueron constituidos por E. coli BLEE y la proporción de susceptibilidad a los antibióticos antes mencionados fue diferente, siendo para cefotaxima estadísticamente significativo.

## **Conclusiones**

Se demostró que la técnica de identificación de septatipos basada en PCR-RT es capaz de identificar y agrupar a E. coli en clonotipos directamente de la muestra de orina. Los septatipos 511, 500, 001, 501, 571 y 771, representaron el 68% del total de las clonas identificadas. El clonotipo más frecuente mostró una proporción de susceptibilidad diferente al resto de la muestra. Es posible que esta técnica pueda ser usada para identificar y guiar el tratamiento antibiótico en un futuro.

## MARCO TEÓRICO

### Antecedentes:

#### *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*) fue originalmente llamada “*Bacterium coli comune*”, y fue aislada por primera vez de las heces de un paciente pediátrico por el médico austriaco Theodor Escherich (1), posteriormente se renombró a la bacteria *Escherichia coli* en su honor.

*E. coli* coloniza el tracto digestivo de los seres humanos a las pocas horas posteriores del nacimiento, el hábitat de *E. coli* comensal es la capa mucosa del colon de una gran variedad de animales, desde pequeñas aves hasta ballenas del atlántico, pasando por los seres humanos. Usualmente se comporta como un comensal inofensivo en la capa mucosa del ciego y colon.

Esta bacteria móvil gram-negativa ha adaptado su metabolismo con mucho éxito a este nicho ecológico, manteniendo su terreno contra más de 500 especies bacterianas (2), por lo que constituye el anaerobio facultativo más abundante de la microflora intestinal durante la vida de los seres humanos. Esta bacteria tiene las habilidades para crecer en el entorno cambiante del intestino, además de que puede sobrevivir en muchos diferentes hábitats ecológicos, incluidos los ambientes abióticos, por lo que se le considera una especie muy versátil. La bacteria ha sufrido una expansión poblacional y adaptación a nichos diversos en los últimos 5 millones de años, estas condiciones han producido estilos de vida dispares de las diferentes cepas de *E. coli*, esto debido al proceso adaptativo a una multitud de entornos con presiones selectivas diversas(3).

La relación que se establece entre *E. coli* y su huésped es de comensalismo, en ella uno de los dos organismos se beneficia de la interacción entre ellos, mientras que el otro no es ni notablemente perjudicado ni ayudado. Las cepas de *E. coli* obtienen de su entorno intestinal un suministro constante de nutrientes, un ambiente estable, protección contra algunas amenazas, transporte y difusión. La microbiota de *E. coli* proporciona algunos beneficios a su huésped mediante la inducción de la resistencia a la colonización en el



huésped por bacterias patógenas, esto lo logra mediante la producción de bacteriocinas y a través de otros mecanismos (4).

### ***E. coli* patógena extraintestinal**

*Escherichia coli* forma parte de la microbiota usual intestinal del ser humano, y en su convivencia establece una relación de mutuo beneficio; aunque ciertos cambios en el microsistema son capaces de alterar la relación y convertirla en problema de salud para las personas. Una de las características especiales de esta bacteria es su diversidad genética, que explica su capacidad para tener una coexistencia pacífica con su huésped, y en otros escenarios, ser responsable de enfermedades intestinales y extraintestinales potencialmente graves (5).

Las cepas de *E. coli* de importancia para los seres humanos pueden ser clasificadas de acuerdo a factores genéticos y clínicos en tres grupos: comensal, diarreogénica (o intestinal) y extraintestinal (ExPEC)(6).

La mayoría de las cepas bacterianas aisladas en heces en seres humanos sanos, mamíferos y aves pertenecen a las cepas comensales, estas son generalmente benignas, en general no causan enfermedades del tracto intestinal, y pueden ser beneficiosas para el anfitrión. En algunos casos de alteraciones de barreras fisiológicas o en caso de un huésped con un sistema inmune debilitado son capaces de causar enfermedad.

Las cepas patógenas intestinales de *E. coli* rara vez se encuentran en la flora fecal de individuos sanos y extraordinariamente son una causa de enfermedad extraintestinal, estos patógenos obligados causan colitis o gastroenteritis en el caso de ingestión de alimentos o agua contaminada.

Las cepas ExPEC son filogenética y epidemiológicamente distintas de las cepas comensal y patógenas intestinales, regularmente no causan enfermedad entérica; sin embargo, pueden colonizar de forma asintomática el tracto intestinal humano y puede ser la cepa predominante en el 20% de individuos normales. ExPEC es una causa importante de morbilidad y mortalidad en las poblaciones, siendo la causa más frecuente de bacteriemias e infecciones del tracto urinario por gram negativos. ExPEC es considerada el patógeno

causante del 80% de las infecciones urinarias (IVU's) adquiridas no complicadas y más del 50% de las IVU's complicadas (7).

ExPEC también causa infecciones abdominales, de tejidos blandos, meningitis, neumonía, bacteremia y osteomielitis (8); el cuidado de estas infecciones provoca un gasto calculado en billones de dólares en los sistemas sanitarios de todo el mundo(9).

Es frecuente que ExPEC tenga varios factores de virulencia (FV) que le permiten evadir la respuesta inmune, aumentar su probabilidad de supervivencia en el suero y causar lesión tisular en el huésped (10). Las cepas ExPEC se definen como aislados de E. coli que contienen 2 o más de los siguientes marcadores de virulencia determinados por PCR multiplex: papA (P fimbrias subunidad estructural) y / o papC (P ensamblaje de fimbrias), sfa / foc (subunidades de fimbrias S y F1C), afa / dra (adhesinas de unión a antígeno Dr), kpsMT II (unidades de polisacárido capsular del grupo 2), y iutA (receptor de aerobactina).

Las cepas ExPEC se caracterizan por haber adquirido varios genes de virulencia que les permite inducir infecciones extraintestinales tanto en individuos normales como debilitados. La mayoría de los factores de virulencia presentes en el ExPEC son distintos de los que se encuentran en las cepas patógenas intestinales y comensales.

Los factores de virulencia con los que cuenta ExPEC son variados, sin embargo incluyen en su mayoría características que mejoran su capacidad de resistir antibióticos utilizados para su erradicación.

## **ExPEC y la Infección Urinaria**

Las IVUs son de las infecciones más frecuentes en los seres humanos. En general se presentan principalmente en mujeres sin enfermedades de base y sin anomalías funcionales o estructurales del tracto urinario, por lo que la mayoría de los casos se consideran IVUs no complicadas, y tienen una evolución favorable en la mayoría de los casos. Se calcula que entre el 50 y el 60% de las mujeres adultas tendrá al menos un episodio de IVU en su vida. La bacteria responsable de la gran mayoría de las infecciones urinarias será ExPEC (7). Las infecciones urinarias con factores de riesgo para organismos multirresistentes se conocen como IVUs complicadas y son una de las causas más frecuentes de hospitalización en adultos.

Dentro de la fisiopatología de las IVUs, la teoría más prevalente es que la infección urinaria comience con la colonización del intestino con una cepa uropatógena además de la flora comensal, esta cepa, en virtud de factores codificados en islas de patogenicidad, es capaz de infectar un huésped inmunocompetente, ya que coloniza la zona periuretral y asciende por la uretra hasta la vejiga. Entre 4 y 24 horas después de la infección, el nuevo entorno en la vejiga induce la expresión de las fimbrias de tipo 1, que tienen un importante papel importante en las primeras etapas del desarrollo de una infección urinaria al promover la invasión tisular(2).

### **Resistencia antibiótica y ExPEC**

La prescripción antibiótica empírica correcta en las IVUs es un factor determinante en el éxito del tratamiento, también es importante para disminuir la probabilidad de complicaciones médicas y para aminorar el riesgo de resistencia antibiótica. Este éxito es cada vez más complicado debido al surgimiento de cepas resistentes a los antibióticos recomendados como de primera línea, por ejemplo, se ha reportado en algunas poblaciones de ExPEC causante de IVU no complicadas una tasa de resistencia a amoxicilina del 40%, trimetoprim/sulfametoxazol y quinolonas del 30% (11).

Este problema es más difícil en el ambiente hospitalario, donde las IVU por organismos multirresistentes pueden causar infecciones severas, con serias consecuencias cuando no se elige el tratamiento antibiótico adecuado. Se ha documentado por ejemplo, que los pacientes hospitalizados con IVU complicadas causadas por *E. coli* productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) tienen estancias hospitalarias más prolongadas cuando el tratamiento antibiótico empírico inicial fue el incorrecto (12).

La identificación del organismo causante de la IVU y el conocimiento de su susceptibilidad a antibióticos, son factores fundamentales para el tratamiento exitoso de esta, no obstante, uno de los grandes problemas de tratar prácticamente cualquier infección bacteriana y en particular las infecciones urinarias es que la susceptibilidad antibiótica se conoce dos a tres días después de tomada la muestra para cultivo(13), por lo que existe un retraso en la instauración del antibiótico específico correcto necesario para el tratamiento de la infección. Nuevas estrategias para la prescripción antibiótica son necesarias.

## **Clasificación de *E. coli***

Además de la clasificación por patotipos de la que se ha hablado previamente, es posible clasificar a *E. coli* mediante varias técnicas específicas, por ejemplo el esquema de serotipificación usa 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K), para su clasificación. El antígeno "O" es responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O: H) indica el serotipo, que frecuentemente se asocia con un cuadro clínico particular. Desde la descripción de esta técnica de clasificación se descubrió que las poblaciones de *E.coli* se organizan en una serie de linajes estables (llamados clonas)(5), como especie clonal, *E.coli* contiene un número limitado de linajes genéticamente relacionados. Por ejemplo, se piensa que los serotipos O: H representan clones que han sido seleccionados para las condiciones especiales del intestino delgado y seleccionados para transportar los plásmidos necesarios para provocar diarrea.

Los análisis filogenéticos han clasificado a las cepas de *E. coli* en cuatro grupos filogenéticos principales (A, B1, B2 y D), las cepas extraintestinales virulentas pertenecen principalmente al grupo B2 y, en menor medida, al grupo D, mientras que la mayoría de las cepas comensales pertenecen al grupo A. Actualmente la agrupación filogenética se puede realizar mediante electroforesis enzimática multilocus, pero esta técnica de referencia es compleja y requiere mucho tiempo.

## **Clonotipificación y Susceptibilidad Antibiótica**

Otra técnica de clasificación es mediante la clonotipificación basada en la secuenciación de los genes *fumC* y *fimH* para identificar las variaciones en el genoma de la bacteria. En la muestra de *E. coli* donde se describió la técnica se logró dividir a los aislamientos de *E. coli* en más de 200 clonotipos, además se evaluó la asociación de las

clonas con susceptibilidad a antibióticos y a variables clínicas, encontrando que los grupos clonales se asocian a patrones de susceptibilidad antibiótica específicos (14).

Es por lo anterior que es posible utilizar la tendencia de *E. coli* a agruparse en clonotipos y que estos cuentan con patrones de susceptibilidad a antibióticos específicos, con la finalidad de identificar e instaurar tempranamente el tratamiento idóneo en las infecciones que provoca(15).

En la actualidad las dos técnicas moleculares de referencia para identificar las clonas de ExPEC son la Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) y la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE), sin embargo, estas dos técnicas no son adecuadas para la toma de decisiones clínicas dado que tienen altos costos y tiempos de proceso largos(16), por lo que no son prácticas para su implementación en la atención médica diaria.

La MLST implica la secuenciación de 7 genes constitutivos y la agrupación de la *E. coli* en clonotipos basados en los resultados (17), este proceso es laborioso y consume mucho tiempo, razón por la cual esta técnica no tiene utilidad clínica.

Se ha introducido la técnica de clonotipificación basada en la secuenciación de dos genes *fumC* y *fimH* (clonotipificación CH) (18). Esta técnica ha demostrado ser efectiva en la tipificación de ExPEC y la determinación de perfiles de resistencia antibiótica en estos aislamientos (19). El gen *fimH* codifica a la adhesina tipo 1 que está bajo selección positiva de mutaciones funcionales, por lo que se pueden producir reemplazos de aminoácidos que alteran dramáticamente las propiedades de adhesión bacteriana la cual es fundamental para la patogénesis de la bacteria(20). Por otro lado, el gen *fumC* es considerado un gen constitutivo (ciclo de Krebs) con gran fiabilidad filogenética en las técnicas estándares de MLST.

La gran mayoría de cepas de *E. coli* expresa la Fimbria Tipo 1 (20), el cluster de genes *fim* está localizado en una región cromosómica altamente recombinante en el locus *leuX* tRNA, región en la que las islas de patogenicidad se insertan de forma frecuente.

La CH clonotipificación ha demostrado su capacidad para clasificar a ExPEC y predecir la resistencia a antibióticos, no obstante, esta técnica implica la secuenciación de ADN, por lo que su aplicación más general tampoco es posible en la actualidad (19).

## Técnica de Septatipos

Recientemente se ha descrito una técnica de clonotipificación con más potencial para uso clínico, principalmente por la rapidez con la que otorga resultados y por el buen rendimiento diagnóstico de la prueba, está basada en la detección de la presencia o ausencia de 7 Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP's) de los genes (*fumC* y *fimH*) de ExPEC, esta técnica logra la clonotipificación de ExPEC mediante el análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa (qPCR)(15).

Con los resultados de la qPCR se le asignan nombres a las clonas de exPEC mediante el uso de un algoritmo numérico clave. Los SNP's son divididos en 3 grupos. En el primer grupo se incluye 3 SNP's (*fumC*-63, *fumC*-248, *fumC*-380), para el segundo grupo se incluye otro conjunto de 3 SNP's (*fimH*-108, *fimH*-162, *fimH*-233), y en el tercer grupo los se agrupan los SNP's restantes (*fimH*-483). A la presencia del primer SNP dentro del grupo se le asigna un valor de 1, la presencia del segundo SNP obtiene un valor de 2, y la presencia del 3er SNP se asigna como 4, la ausencia de SNP se puntúa como cero. A cada aislamiento se le asigna una puntuación basada en la suma de los puntajes de cada grupo de SNP's. Se llama a esta técnica de tipificación clonal como el método de los "tipificación de los 7 SNP's", a los clonotipos correspondientes se les denomina septatipos(15).

<b>Polimorfismos de Nucleótido Único base de los Septatipos.</b>
<b>fumC-63 C</b>
<b>fumC-248 G</b>
<b>fumC-380 C</b>
<b>fimH-108 G</b>
<b>fimH-162 C</b>
<b>fimH-233 G</b>
<b>fimH-483 C</b>

Tabla 1. Se muestran los 7 SNP's para la clonitipificación en septatipos de ExPEC (11).

Se ha demostrado que la combinación alternativa binaria de los 7 SNP's divide a los aislamientos clínicos de ExPEC en varias docenas de clonotipos que demuestran susceptibilidad antibiótica distinta. Esta técnica ha demostrado que es posible aislar e identificar, directamente de especímenes urinarios en el punto de atención, a diferentes clonas

de ExPEC con sus respectivas susceptibilidades antibióticas (15), los autores han descrito que es posible tener resultados de la identificación de la clona de ExPEC directamente de una muestra de orina en aproximadamente 1 hora.

La identificación rápida (menos de una hora) de la subespecie clonal en ExPEC tiene el potencial de mejorar el diagnóstico y establecer la susceptibilidad a antibióticos en las infecciones causadas por este microorganismo(11), y de forma secundaria mejorar los desenlaces clínicos, la gestión de antibióticos y la resistencia bacteriana.

En muchos lugares, la prevalencia de la resistencia a los antibióticos de base como trimetoprim/sulfametoxazol, amoxicilina/ácido clavulánico, cefalosporinas de primera generación y ciprofloxacina supera el umbral del 20% recomendado por la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América para considerar su uso empírico en el tratamiento de las IVUS no complicadas en mujeres. En contraste, para la técnica de los septatipos la prevalencia de resistencia identificada en las clonas está muy por debajo de este límite del 20%, por lo que, para la selección del tratamiento antibiótico empírico sería más racional si se basara en el septatipo en lugar de la identidad de especie sospechada por la prevalencia establecida en base en urocultivos, que es la práctica habitual(15).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

ExPEC es una causa frecuente de infecciones urinarias, meningitis y sepsis bacteriana. Esta especie de *E. coli* es también la principal causa de IVU complicadas y no complicadas en todo el mundo. La identificación de la susceptibilidad a antibióticos es esencial para evitar errores de prescripción en el manejo de las infecciones, incluyendo las urinarias. Este organismo se caracteriza por ser altamente clonal, y estos grupos clonales están asociadas a perfiles de resistencia a antibióticos característicos. La identificación rápida de las clonas de ExPEC y la prescripción antibiótica basada en septatipos mejorará el diagnóstico y tratamiento de las IVU. En México existe poca información de los clonotipos prevalentes. En el HCSAE se desconoce los clonotipos de *E coli* extraintestinal prevalentes. La intención de este estudio es la identificación de los clonotipos prevalentes de ExPEC en muestras de orina mediante la genotipificación usando 7 SNP's en orina de pacientes con infecciones de vías urinarias en nuestro Hospital.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

**¿Cuáles son los Clonotipos prevalentes de *Escherichia coli* extraintestinal en muestras de orina establecidos mediante genotipificación de polimorfismos de nucleótido único en pacientes con infecciones de vías urinarias del Hospital Central Sur de Alta Especialidad?**

## **HIPÓTESIS**

Los clonotipos prevalentes de E Coli extraintestinal en la población de pacientes con IVUs del HCSAE serán y se agruparán de forma distinta a los descritos en otras poblaciones.

## **JUSTIFICACIÓN**

*E. coli* es la principal causa de infección urinaria en pacientes ambulatorios y hospitalizados. Es una de las principales causas de hospitalización de causa infecciosa.

La clonotipificación de ExPEC permitirá conocer los diversos clonotipos que existen en nuestro ambiente hospitalario, y mejorará el conocimiento epidemiológico de las características moleculares de las bacterias que afectan a nuestros pacientes.

Esta línea de investigación permitirá conocer los clonotipos lo que se podrá relacionar con susceptibilidad a antibióticos, y en una siguiente etapa guiar el tratamiento antibiótico basado en susceptibilidad relacionada con clonotipos.

La elección correcta del tratamiento antibiótico en una infección es fundamental para el tratamiento exitoso de la enfermedad. Frecuentemente el médico tiene que prescribir tratamiento empírico dirigido según la prevalencia de microorganismos en su ambiente. Esta prescripción a ciegas involucra la incorrecta administración de antibióticos , ya sea porque el microorganismo al que está dirigido es resistente, o el otro escenario donde se prescribe un fármaco de amplio espectro cuando la bacteria pudo ser tratada con un fármaco de un menor espectro, en el primer escenario se expone al paciente a un mayor riesgo de un desenlace desfavorable, en el segundo el riesgo es que se promueva el desarrollo de organismos con multiresistencia a antibióticos.

El conocimiento molecular de las bacterias en nuestro medio abre la oportunidad de realizar una prueba sensible, específica que en corto tiempo determine la especie y la susceptibilidad a antibióticos de ExPEC, lo que incrementará la tasa de éxito del tratamiento y



reducirá el riesgo de resistencia a antibióticos mediante la eliminación de prescripciones inadecuadas, también con un efecto en la morbimortalidad y los costos de tratamiento.

## **OBJETIVO**

### **Objetivo General**

Identificar los Clonotipos prevalentes de *E. coli* extraintestinal en orina mediante la técnica de genotipificación usando 7 SNP's de los genes *fum* y *fin* en pacientes con infecciones de vías urinarias en nuestro Hospital.

### **Objetivo Secundario**

Describir los patrones de susceptibilidad a antibióticos en los clonotipos identificados.

Comparar la susceptibilidad antibiótica entre los clonotipos identificados.

Describir el rendimiento diagnóstico de la prueba de PCR seguida de PCR en tiempo real usando como gold estándar el urocultivo.

## **PACIENTES Y MÉTODOS**

### **Metodología General**

Estudio observacional, descriptivo, transversal y analítico.

El desarrollo se resume en el gráfico número 1.

### **Universo de Estudio**

Pacientes mayores de edad que acudieron a urgencias médicas o ingresaron a hospitalización de medicina interna del Hospital Central Sur de Alta Especialidad con síntomas de infección de vías urinarias.

## **Criterios de inclusión**

Pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de infección de vías urinarias.

Criterios diagnósticos de infección de vías urinarias para este estudio: Cualquier síntoma irritativo urinario bajo clásico (disuria, polaquiuria y urgencia miccional), o signos de infección urinaria alta (Giordano o dolor en fosa renal más temperatura mayor a 38.5°C), o prueba de esterasa leucocitaria o nitritos reportados como positivos.

## **Criterios de exclusión:**

Pacientes con muestra inadecuada/insuficiente.

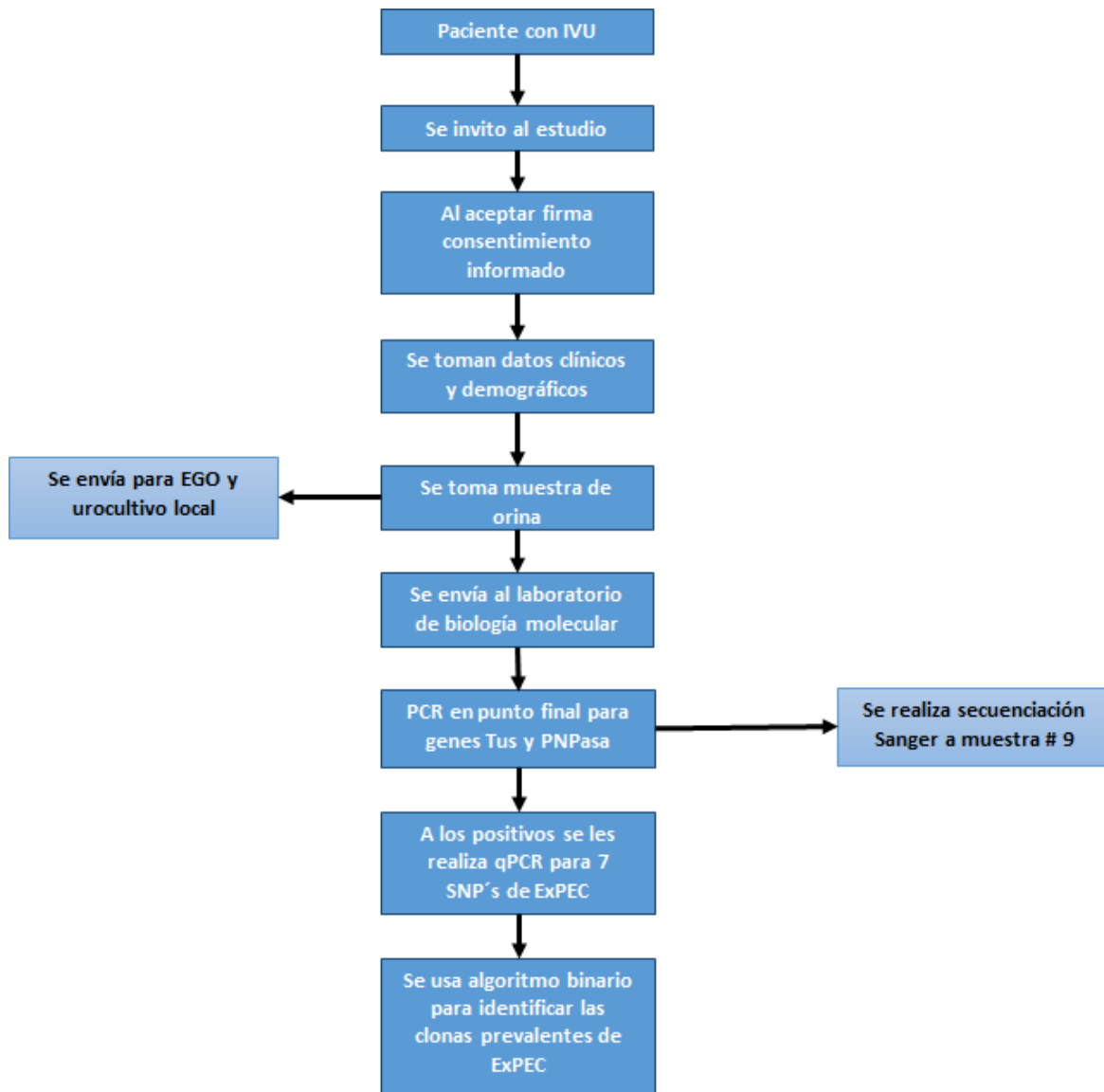
Pacientes con diagnóstico o sospecha de prostatitis.

Pacientes portadores de conducto ileal.

## **Población y tamaño de la muestra**

Se incluyeron 50 pacientes por conveniencia.

## DESARROLLO DEL PROYECTO



**Gráfico 1. Diagrama de flujo del desarrollo del proyecto.**

El médico tratante del paciente identificó síntomas compatibles con infección de vías urinarias y aviso al investigador. El investigador corroboró los criterios diagnósticos y posteriormente se entrevistó con el paciente, procedió a invitarlo al estudio y a explicarle su participación, al aceptar se procedió a la firma del consentimiento informado.

Se tomaron **5 ml** de orina del chorro medio en un contenedor tipo Falcon de 50 ml posterior a aseo local. Se le asignó número consecutivo a cada contenedor y se almacenó en refrigerador a 4°C.

Se registraron los datos generales del paciente como edad, sexo, fecha y procedencia (local o foráneo), así como comorbilidades relevantes.

Se enviaron las muestras recolectadas al laboratorio de genética del Hospital General usando una red fría.

Las muestras fueron transportadas en cadena de frío del HCSAE hasta el laboratorio de biología molecular del Servicio de Genética del HGM.

#### **Extracción de ADN de E. coli.**

La extracción de ADN de E. coli en orina se realizó mediante protocolo de la casa comercial Qiagen con el Kit QIAamp® DNA Micro.

#### **Identificación de ADN de E. coli.**

Se realizó PCR en punto final para genes de PNPasa y Tus específicos de *E. coli*. con el kit de Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder con las siguientes condiciones:

**Se realizaron 35 ciclos de una reacción de 25ul siguiendo de acuerdo al siguiente protocolo ya estandarizado**

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración por Muestra</b>
Buffer 10 X	2.5 µL
Magnesio	0.75 µL
dNTP's	0.3 µL
Forward	1 µL
Reverse	1 µL
Taq. Platinum	0.3 µL
H2O	
DNA	40 ng/µL
Volumen final	25 µL

**Las condiciones de termociclado que se utilizaron fueron las siguientes**

Precal	95°C - 3 min.
Desnaturalización	95°C - 30s.
Alineación	60°C - 30s.
Elongación	72°C - 30s.
	72°C - 30s.
Enfriamiento	4°C.

Posteriormente se realizó electroforesis en agarosa al 1.5% para identificar los amplicones correspondientes a los genes *Tus* de 200 pb y *PNPasa* de 400 pb.

### **Secuenciación Sanger**

Se procedió a realizar secuenciación Sanger en la muestra número 9.

### **PCR en tiempo real QPCR**

Se analizó mediante PCR en tiempo real a los SNP's Fum63, Fum248, Fum380, Fim108, Fim162, Fim233, Fim483, Uida y GAPDH. La secuencia de los genes se observa en tabla como normalizadores o constitutivos, mediante la técnica de incorporación de SYBERGREEN sin ROX. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 10 uL con:

- 1) Sybergreen 5 µL.
- 2) Forward 0.5 µL.
- 3) Reverse 0.5 µL.
- 4) H<sub>2</sub>O 2 µL.
- 5) DNA 2 µL a concentración de 100ng/µL.

Con las siguientes condiciones:

- I. 40 CICLOS

- II. 95°C - 3 min.
- III. 95°C - 1 min.
- IV. 60°C – 20 s.
- V. 40°C - 2min.

**A continuación se señalan el nombre del SNP y la secuencia del primer (5'-3'):**

**fumC-63**

(F) AGCATGACGACGAATTCCTGC

(R-S) GTCGTCGTTAGGGTGAAC TTT

**fumC-248**

(F) ACGGCGATGCACGTTGCGTCG

(R-S) AGTTCCGCTACGTGAGGCAGG

**fumC-380**

(F) CCGGAAATCTCCTGCCCAAGC

(R-S) CATTCCGCAGCTTAAAACCT

**fimH-108**

(F) GTGGAGCAAACCTGGTCTTG

(R-S) AGGGAAAGGATAGCTACTGCC

**fimH-162**

(F) TATCCGGAAACCATTACAGAC

(R-S) las misma que en fimH-233 (R-S)

**fimH-233**

(F) TTCCGAGACCGTAAAATATAG

(R-S) TCAAATAAAGCGCCACCGGCC

**fimH-483**

(F) GTGGTGGCTACTGGCGGCAGC

(R-S) TCTGCGGTTGTGCCGGATAGG

**uidA**

(F) TCTTGCCGTTTTTCGTCGGTA

(R-S) CACGCCGTATGTTATTGCCG

**Identificación de Septatipos y prevalencia de clonas locales**

Mediante el algoritmo numérico binario (tabla 2) se identificaron las clonas prevalentes locales.

**Algoritmo binario para identificar clonas**

Gen	<i>fumC</i>			<i>fimH</i>			
	Número de SNP	63	248	380	108	162	233
Posición del SNP	1	2	3	4	5	6	7

<b>Puntuación si está presente</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>
<b>Puntuación si está ausente</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Ejemplo</b>							
<b>SNP</b>	<b>no</b>	<b>si</b>	<b>no</b>	<b>si</b>	<b>si</b>	<b>si</b>	<b>si</b>
<b>Número asignado</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>
<b>Septatipo =</b>	<b>2</b>			<b>7</b>			<b>1</b>

**Tabla 2.** La identificación del septatipo se puntúa como se describe en la tabla. 7 SNP's se dividen en dos grupos de 3 SNP's y un grupo de 1 SNP. Cuando el SNP está presente en las posiciones 1, 4 y 7, se puntúa con un valor numérico de 1, en las posiciones 2 o 5 se puntúa con 2, y en las posiciones 3 o 6 se puntúa 4. Las puntuaciones se suman dentro de los grupos resultando en un índice de septatipo de tres dígitos, que por tanto contiene toda la información sobre la presencia o ausencia de SNP en cada tipo clonal único.

### **Resistencia a antibióticos**

La resistencia a antibióticos se describió en aquellas clonas que tuvieron más de un aislamiento utilizando el cultivo de orina que es el estándar de oro.

### **Variables**

<b>VARIABLE</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>	<b>TIPO DE VARIABLE</b>	<b>ESCALA DE MEDICIÓN</b>
<b>Edad</b>	Tiempo que ha vivido una persona u otro ser vivo desde su nacimiento representado en años cumplidos al inicio de seguimiento.	Cuantitativa discreta	De razón Número de años cumplidos. Valores de 1 a 110.



<b>Sexo</b>	Condición orgánica que distingue a un individuo como Femenino / Masculino. (Fenotipo).	Cualitativa nominal dicotómica	Nominal. Masculino o Femenino.
<b>Infección de Vía Urinaria</b>	Cualquier síntoma irritativo urinario bajo clásico (disuria, polaquiuria y urgencia miccional). O Signos de infección urinaria alta: Giordano o dolor en fosa renal más temperatura mayor a 38.5°C. O Prueba de esterasa leucocitaria o nitritos reportados como positivos. O Piuria definida por $\geq 10$ leucocitos/ml o $\geq 3$ leucocitos a la inspección de una muestra de orina no centrifugada con un objetivo de gran aumento.	Cualitativa nominal dicotómica	Nominal. Si o No.
<b>Infección de Vías Urinaria causada por ExPEC.</b>	Diagnóstico de infección de vías urinarias en la que el patógeno reportado en Urocultivo es E coli.	Cualitativa nominal dicotómica	Nominal. Si o No.
<b>E. coli BLEE</b>	Escherichia Coli productora de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. Reporte de E coli blee en resultado de urocultivo.	Cualitativa nominal dicotómica	Nominal. Si o No.
<b>Septatipo</b>	Agrupaciones de bacterias E coli resultantes de la organización en grupos, basados en el puntaje obtenido de la combinación binaria de 7 Polimorfismos de nucleótido único de 2 genes altamente variables (fimH y fumC), obtenidos mediante técnica de Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real. .	Cualitativa.	Nominal.
<b>Urocultivo</b>	Estudio de análisis microbiológico de la orina que sirve para determinar si existe una infección de orina cultivando la orina en medio para observar crecimiento bacteriano	Cualitativa dicotómica.	Positivo: Cuando existe la presencia de 100,000 UFC Negativo. No hay crecimiento.
<b>Portador de sonda vesical</b>	Presencia en uretra de sonda foley.	Cualitativa dicotómica.	Si y no.
<b>1er Antibiótico usado</b>	Primer antibiótico usado en el paciente por el diagnostico de infeccion de vias urinaria.	Cualitativa Nominal	Nominal.
<b>Microorganismo aislado</b>	Bacteria, hongo o parásito reportado en el resultado final de un estudio de urocultivo.	Cualitativo nominal.	Nominal.
<b>Incontinencia urinaria</b>	Incapacidad para retener la orina en la vejiga de forma voluntaria.	Cualitativa dicotómica.	si y no.

<b>Diabetes Mellitus</b>	Enfermedad que se produce cuando el páncreas no puede fabricar insulina suficiente o cuando ésta no logra actuar en el organismo porque las células no responden a su estímulo. Presencia de este diagnóstico en el expediente electrónico.	Cualitativa dicotómica.	si y no.
<b>Enfermedad Renal Crónica.</b>	La enfermedad renal crónica o Insuficiencia Renal Crónica es una pérdida progresiva e irreversible de las funciones renales, cuyo grado de afección se determina con un filtrado glomerular <60 ml/min/1.73 m <sup>2</sup> . Presencia de este diagnóstico en el expediente electrónico.	Cualitativa dicotómica.	si y no.
<b>Uropatía Obstructiva</b>	Presencia de obstáculo mecánico o funcional, al flujo de la orina en alguna parte del aparato urinario, desde el área cribosa papilar del riñón hasta el exterior. Presencia en el expediente de los siguientes diagnósticos: Hipertrofia prostática benigna. Cáncer de próstata. Litiasis renoureteral. Litiasis vesical. Presencia de catéter doble jota. Presencia de Nefrostomía. Vejiga neurogénica. Estenosis uretral o ureteral.	Cualitativa dicotómica.	si y no.
<b>Hospitalización.</b>	Ingreso de una persona enferma o herida en un hospital para su examen, diagnóstico, tratamiento y curación por parte del personal médico. Presencia de esta condición en el expediente electrónico.	Cualitativa dicotómica.	si y no.

Tabla 3. Definición operativa de variables.

### **Cálculo del tamaño de la muestra**

Se consideró una muestra por conveniencia de 50 pacientes

## **Análisis estadístico**

Se analizó la distribución de las variables utilizando la prueba de normalidad Shapiro-Wilk y de acuerdo a esto se describieron las variables con proporciones para variables cualitativas, y para las variables cuantitativas se usaron media,  $\pm$  desviación estándar ( $M \pm DE$ ) o mediana (RIQ) de acuerdo a la forma de distribución de los datos obtenidos.

Se compararon los perfiles de resistencia entre la clona más frecuentemente aislada con el resto de la muestra mediante la prueba exacta de Fisher. Se consideró como significativo un valor de  $p \leq 0.05$  a dos colas.

Todos los análisis y gráficas se realizaron con el paquete estadístico R. RStudio Version 1.4.1103. © 2009-2021 RStudio, PBC.

## **Consideraciones Éticas**

Este protocolo fue sometido y aprobado por el Comité de Investigación del HCSAE y del Comité Local de Ética en investigación en Salud con el número 25/19 (Folio de vigencia del comité: 1683) así como por el departamento de enseñanza. .

## **RESULTADOS**

### **Características de los pacientes**

Se incluyeron 50 pacientes en el estudio que cumplieron los criterios de inclusión.

En la tabla número 4 se resumen los datos demográficos de los pacientes participantes y las principales comorbilidades.

Mujer	<b>80%</b> (40/50)
Hombre	<b>20%</b> (10/50)
Edad (años)	<b>61</b> +- 16.5
Diabetes Mellitus	<b>52%</b> (26/50)
Hipertensión Arterial Sistémica	<b>48%</b> (24/50)
Cáncer	<b>10%</b> (5/50)
Uropatía Obstructiva	<b>10%</b> (5/50)
Infección Urinaria Complicada	<b>66%</b> (33/50)
Infección Urinaria no Complicada	<b>34%</b> (17/50)
Ambulatorios	<b>78%</b> (29/50)
Hospitalizados	<b>22%</b> (11/50)

Tabla 4. Datos demográficos de la población y principales comorbilidades

#### **Identificación de ADN de *E. coli*.**

Se realizó PCR en punto final para los genes específicos de *E. coli* PNPasa y Tus dónde amplificaron para ambos genes 35 de las 50 muestras (70%). En la gráfica 2 se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los primeros 31 productos obtenidos de la PCR para el gen PNPasa.

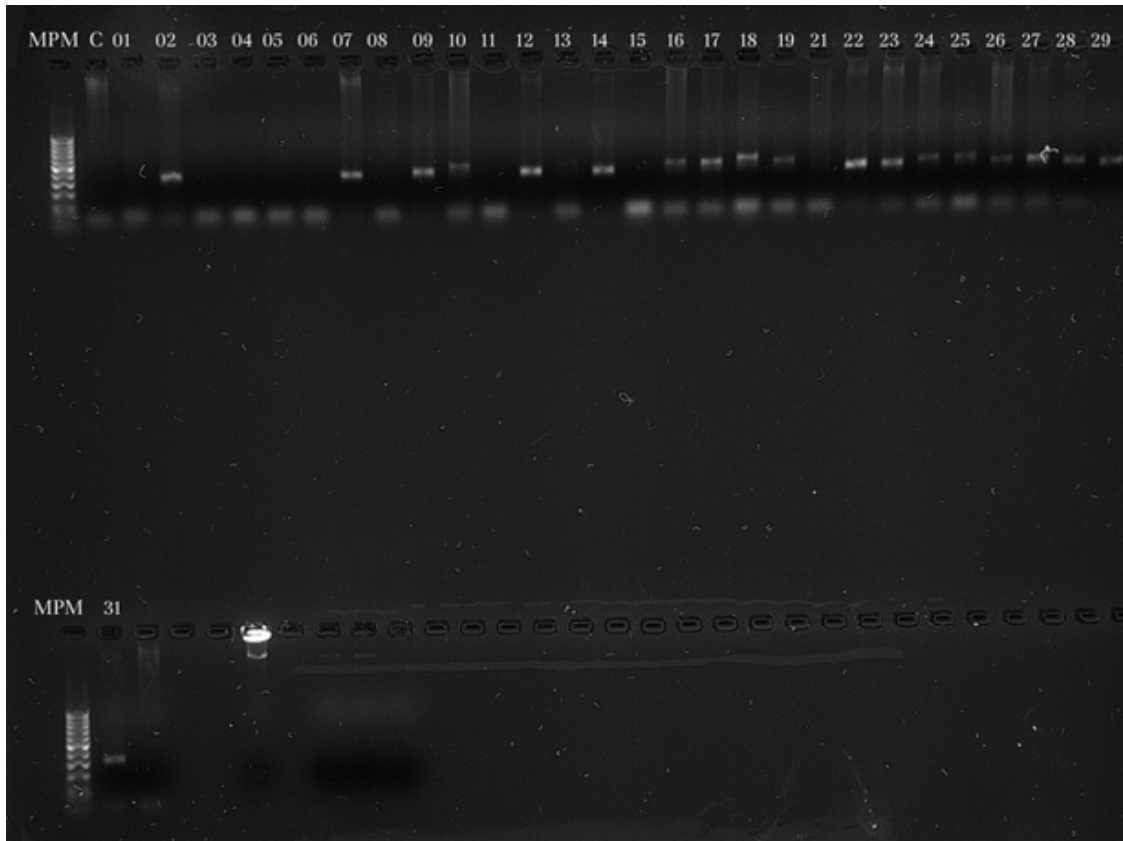
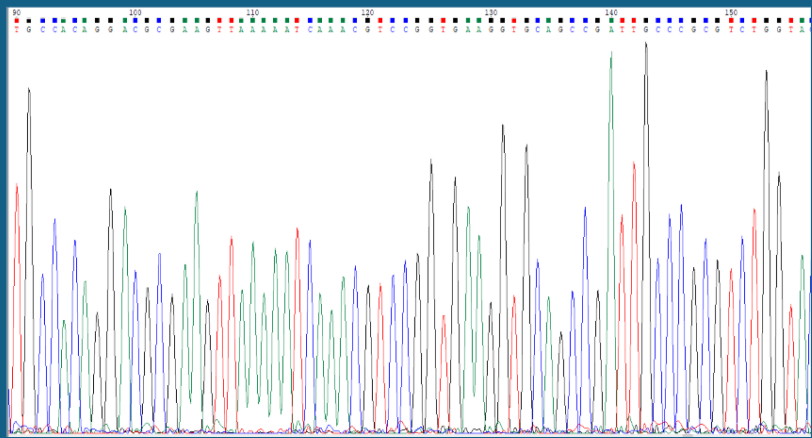


Gráfico 2. Resultados de PCR del gen PNPasa de 400 pb en los primeros 31 pacientes. Así como en la columna MPM el marcador de 100pb.

### **Secuenciación Sanger**

Con la finalidad de corroborar que la secuencia del amplicon pertenece al gen de estudio, se procedió a realizar secuenciación Sanger en la muestra número 9. El electroferograma que se muestra en la figura número 2 muestra la secuencia de nucleótidos del amplicon que al compararlos con las secuencias en el GenBank, se identificó una coincidencia del 100% para secuencias de E. coli, como se muestra en la figura número 3.

# RESULTADOS SECUENCIACIÓN



Electroferograma de la secuenciación de la muestra 009 de orina de pacientes del Hospital Central Sur de Alta Especialidad

Gráfico 3. Electroferograma de la secuenciación de la muestra 9.

## Escherichia coli strain S10 chromosome, complete genome

Sequence ID: [CP031609.1](#) Length: 4821441 Number of Matches: 1

Range 1: 3258409 to 3258551 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
265 bits(143)	4e-67	143/143(100%)	0/143(0%)	Plus/Minus
Query 4		GTTCGCACCGTGGACGCGCGAGGAGTGGCAAAGAAAAC TGGAGAGAGAGTATCAGGATATT		63
Sbjct 3258551		GTTCGCACCGTGGACGCGCGAGGAGTGGCAAAGAAAAC TGGAGAGAGAGTATCAGGATATT		3258492
Query 64		GCTACCCCTGCCACAGGACGCGAAGTTAAAAATCAAACGTCCGGTGAAGGTGCAGCCGATT		123
Sbjct 3258491		GCTACCCCTGCCACAGGACGCGAAGTTAAAAATCAAACGTCCGGTGAAGGTGCAGCCGATT		3258432
Query 124		GCCCGCGTCTGGTACAAAGGAGA	146	
Sbjct 3258431		GCCCGCGTCTGGTACAAAGGAGA	3258409	

Gráfico 4. Secuencias en el GenBank. Coincidencia del 100% para E. coli.

## Clonotipificación basado en técnica de los septatipos

Para identificar las variantes alélicas de interés, las muestras positivas para PNPasa y Tus fueron sometidas a PCR en tiempo real para los genes Fum63, Fum248, Fum380, Fim108, Fim162, Fim233, Fim483, Uida y GAPDH.

## Objetivo principal - Identificación de los Clonotipos(septatipos) prevalentes

Se logró la identificación del septatipo en 25 de las 50 muestras (50%). Usando el algoritmo numérico binario de los 7 SNP se identificaron 6 grupos mayores, los septatipos 511, 500, 001, 501, 571 y 771, estos últimos representan el 68% de los septatipos identificados, el resto estuvo constituido por 8 septatipos con un solo aislamiento. Se muestran los clonotipos y el número de aislamientos en la tabla 4.

<b>Septatipo</b>	<b># Aislados</b>	<b>En porcentaje (%)</b>
<b>511</b>	<b>5</b>	<b>20</b>
<b>500</b>	<b>4</b>	<b>16</b>
<b>001</b>	<b>2</b>	<b>8</b>
<b>501</b>	<b>2</b>	<b>8</b>
<b>571</b>	<b>2</b>	<b>8</b>
<b>771</b>	<b>2</b>	<b>8</b>
<b>171</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
<b>131</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
<b>O41</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
<b>161</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
<b>671</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
<b>760</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
<b>761</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
<b>010</b>	<b>1</b>	<b>4</b>

Tabla 4. Clonotipos identificados en nuestros pacientes. Los septatipos 511, 500, 001, 501, 571 y 771, estos representaron el 68% de los septatipos identificados.

### Septatipos y susceptibilidad a antibióticos

En la tabla 5 se muestran los septatipos identificados y su respectiva susceptibilidad antibiótica a 8 fármacos frecuentemente prescritos para tratar infecciones urinarias.

Clonotipo	Amikacina	Ampicilina	Ceftriaxona	Cefotaxima	Ciprofloxacino	Nitrofurantoina	Levofloxacino	Meropenem
131	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE
161	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE	NA	RESISTENTE	SENSIBLE	NA	SENSIBLE
500	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE
500	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE
500	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE
501	SENSIBLE	RESISTENTE	NA	RESISTENTE	RESISTENTE	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE
501	SENSIBLE	RESISTENTE	NA	RESISTENTE	RESISTENTE	RESISTENTE	RESISTENTE	SENSIBLE
571	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE
571	SENSIBLE	RESISTENTE	NA	NA	RESISTENTE	NA	RESISTENTE	SENSIBLE
671	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE	NA	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE
760	RESISTENTE	RESISTENTE	NA	NA	RESISTENTE	NA	SENSIBLE	SENSIBLE
761	SENSIBLE	RESISTENTE	RESISTENTE	RESISTENTE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE
771	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE
771	SENSIBLE	RESISTENTE	NA	NA	SENSIBLE	NA	SENSIBLE	SENSIBLE
O41	SENSIBLE	RESISTENTE	RESISTENTE	RESISTENTE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE
OO1	SENSIBLE	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE
OO1	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE



Tabla 5. Resultados de susceptibilidad a antibióticos de todos los aislados y sus respectivos septatipos.

### Comparación de la susceptibilidad del septatipo 500 en comparación el resto de la muestra

Del septatipo 500 se obtuvo información completa de su antibiograma, se comparó las proporciones de susceptibilidad a antibióticos con el resto de la muestra, se identificó un patrón de susceptibilidad a antibiótico que sugiere dos grupos clonales diferentes, no obstante ningún análisis de la diferencia de proporción alcanzó significancia estadística, tabla 6.

Antibiótico / Clonotipo	AMIKACINA	AMPICILINA	CEFTRIAXONA	CEFOTAXIMA	CIPROFLOXACINA	NITROFURANTOÍNA	LEVOFLOXACINA	MEROPENEM
500	100	66	100	100	100	100	100	100
NO-500	97	86	45	36	63	10	63	100
p	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tabla 6. Se muestra el porcentaje de sensibilidad a antibióticos del septatipo 500 en comparación con los clonotipos no-500. Los datos sugieren que se trata de clonas con patrones de susceptibilidad diferentes. Las proporciones se analizaron con la prueba exacta de Fisher. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la comparación.

### Susceptibilidad del septatipo 501 en comparación con el resto de la muestra

Se aisló en dos ocasiones al septatipo 501 que se identificó como E. coli BLEE, este septatipo fue multirresistente, en la tabla 7 se muestra el porcentaje de sensibilidad a antibióticos del septatipo 501 en comparación al resto de la muestra. Esta diferencia en proporciones fue estadísticamente significativa al analizar el porcentaje de susceptibilidad a cefotaxima.

Antibiótico / Clonotipo	AMIKACINA	AMPICILINA	CEFTRIAXONA	CEFOTAXIMA	CIPROFLOXACINA	NITROFURANTOÍNA	LEVOFLOXACINA	MEROPENEM
501	100	0	0	0	0	50	0	100

NO-501	94	20	75	75	66	100	70	100
p	NS	NS	0.09	0.042	0.15	0.13	0.22	NS

Tabla 7. Se muestra el porcentaje de sensibilidad a antibióticos del septatipo 501 en comparación con los clonotipos no-501. Los datos sugieren que el septatipo 501 tiene una proporción de susceptibilidad a antibióticos diferente al resto de la muestra. La prueba exacta de Fisher fue significativa para la diferencia en porcentajes de sensibilidad de cefotaxima.

### Porcentaje de discrepancia en la prescripción de antibióticos

En los 21 aislamientos de ExPEC en urocultivo, se analizó la proporción de resistencia antibiótica al fármaco prescrito (discrepancia), se encontró que fue del 24 % (5 casos). En los aislamientos en que ExPEC fue sensible al fármaco recetado se pudo prescribir un fármaco alternativo de menor espectro en el 52% (11 casos), por lo que se documentó un porcentaje de discrepancia total del 76% (16 casos), gráfico 7. Un gran porcentaje de los errores en la prescripción son resultado del uso de quinolonas respiratorias.

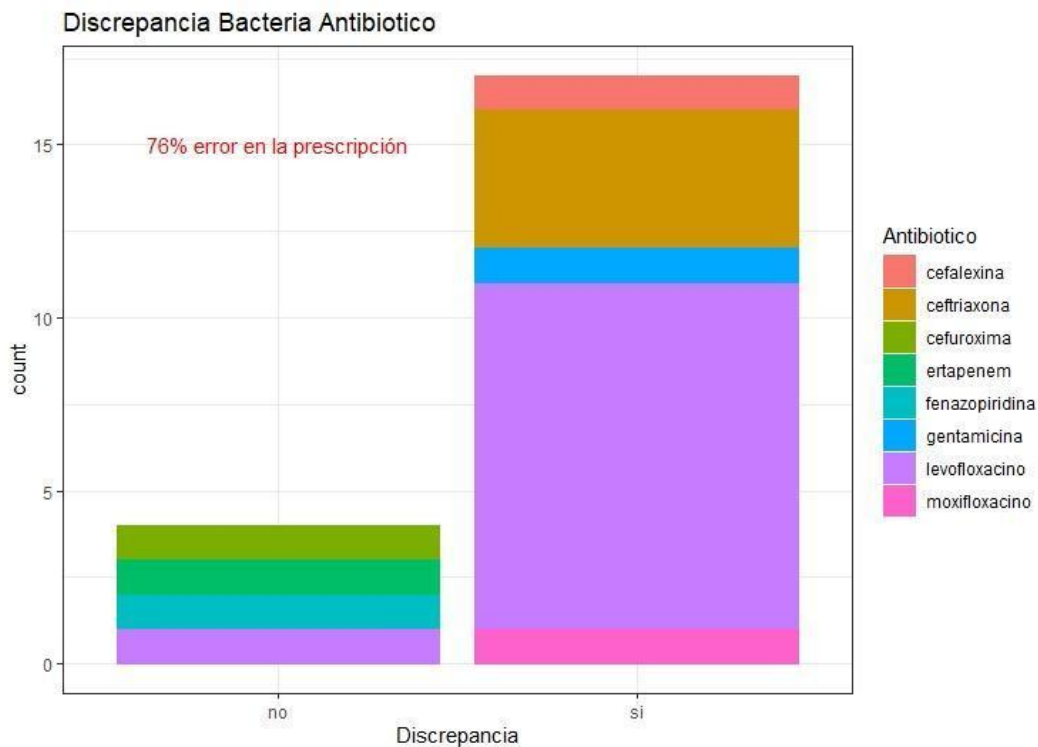


Gráfico 7. Se prescribió un fármaco para el que la E. coli aislada resultó resistente en un 24% de los casos, en los casos en los que la E. coli que era sensible al fármaco prescrito se pudo

dar tratamiento con un fármaco de un espectro menor en un 52%, con lo que el porcentaje de discrepancia en la población con urocultivo positivo fue del 76%.

### Rendimiento diagnóstico de la prueba

Se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), concordancia e índice Kappa para la detección de *E. coli*, de la prueba de PCR en punto final para la detección de PNPasa seguida de la identificación del septatipo, tomando como gold estándar al resultado de cultivo de orina. El resultado fue una sensibilidad del 81%, especificidad del 72%, VPP del 68%, VPN del 84%, concordancia del 76% y un índice de Kappa de .52 (concordancia moderada).

Estos resultados están resumidos en la tabla número 8.

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	Concordancia	Kappa
<b>PNPasa + Detección Septatipo</b>	<b>81%</b>	<b>72%</b>	<b>68%</b>	<b>84%</b>	<b>76%</b>	<b>.52 p=.000</b>

Tabla 8. Se muestra la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, concordancia e índice Kappa para la detección de *E. coli* en orina de la prueba PCR en punto final para la detección de PNPasa seguida de la detección de septatipos, tomando como gold estándar al resultado de cultivo de orina.

## DISCUSIÓN

En este estudio incluimos pacientes hombres y mujeres mayores de 18 años que acudieron al servicio de urgencias por IVU, predominaron las mujeres (80%), la media de edad fue de 61 años, y fueron más frecuentes las IVUs complicadas. Estos datos son similares a la epidemiología mundial en donde las IVUs en mujeres predominan con un 60% para este padecimiento, con un incremento en la prevalencia secundaria al envejecimiento, e incremento en la frecuencia de su presentación en mujeres de 65 años en adelante(21). Con relación a las comorbilidades se ha descrito como factor de riesgo la diabetes mellitus, en nuestro estudio aproximadamente la mitad de nuestros pacientes padecían diabetes mellitus.

En nuestro estudio se ilustró nuevamente un problema importante de la prescripción antibiótica en el tratamiento de las infecciones urinarias, el que el error es algo frecuente, ya

sea por prescribir un fármaco para el que la bacteria resulta resistente, que en nuestro medio fue de 24%, o prescribir un fármaco de amplio espectro cuando uno de menor espectro pudo haber sido usado, encontrado en el 52% de los pacientes. La proporción descrita en la literatura es del 50% aproximadamente de los casos (22), en nuestro estudio el porcentaje reportado de discrepancia es mayor porque se tomó en consideración el error de prescribir un antibiótico de un mayor espectro al necesario. Es en este contexto en el que la técnica de septatipos para la identificación directa de la clona podría ser una buena opción para disminuir el error de prescripción.

En nuestro trabajo se estandarizó la prueba de identificación de PNPasa para la identificación de ADN de *E. coli* en muestras de orina, resultando en una sensibilidad del 90.5% y una especificidad del 45%, en comparación a otras pruebas de biología molecular resultó similar, por ejemplo en un estudio que mide la rentabilidad diagnóstica de la prueba Septifast en orina(23) se encontró una sensibilidad de 82% y una especificidad del 60%. En general las pruebas moleculares en comparación al cultivo se consideran con buena sensibilidad y limitada especificidad.

La técnica de PCR en tiempo real para PNPasa seguida de RT-PCR de 7 SPN's y la clonotipificación basada en el sistema binario que implementamos logró identificar a *E. coli* y clasificarla por clonas específicas (septatipos) directamente en muestras de orina, demostró una sensibilidad del 81% y una especificidad del 72%, en comparación al estudio original de Tchesnokova et al (15) que describe sensibilidad 96% y especificidad del 98%, nuestra prueba mostró una menor sensibilidad y especificidad, consideramos secundario al proceso de estandarización y el menor tamaño de muestra, no obstante nuestra prueba demostró una concordancia del 76% con un índice de Kappa con concordancia moderada.

En relación a la prevalencia de clonotipos presentes en nuestra población, se identificaron 6 septatipos que constituyeron el 68% del total, nuestros resultados en comparación a los identificados en países de otras poblaciones son diferentes, posiblemente relacionado a las múltiples diferencias entre las poblaciones, en especial las diferentes prácticas con relación a la prescripción de antibióticos y las variaciones mundiales en relación a *E. coli* resistente a fluoroquinolonas (24).

Septatipos en HCSAE	%	Septatipos Tchesnokova et al (11)	%	J. Seni et al (25)	%
511	20	561	10	561	31
500	16	620	9	760	13
001	8	530	8	360	40
501	8	361	7	371	18
571	8	760	7	351	7
771	8	271	7	361	7

Tabla 9. Se muestran los septatipos principales del Hospital Central Sur de Alta Especialidad en comparación a los reportados en otras poblaciones por Tchesnokova et al (11) y J. Seni et al (25).

En relación a la asociación de clonotipos con patrones de susceptibilidad antibiótica al comparar el clonotipo 500 con el resto de la muestra se encontró un patrón de susceptibilidad diferente, siendo el septatipo 500 una cepa multisensible en comparación al resto de la muestra, no obstante, no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas, probablemente relacionado al limitado tamaño de muestra.

El septatipo 501 se identificó como una cepa de *E. coli* BLEE y de forma esperada la proporción de susceptibilidad a cefalosporinas en específico cefotaxima resultó con una diferencia estadísticamente significativa.

Las principales aportaciones de este estudio están en relación a que incrementa la validez externa de una prueba diagnóstica que ha sido descrita por un número reducido de investigadores, también describe el rendimiento diagnóstico de la misma y nuevamente demuestra la factibilidad de poder identificar y agrupar a *E. coli* en clonas con patrones de susceptibilidad antibióticas específicas, además, abre la posibilidad de utilizar esta prueba diagnóstica para dirigir el tratamiento antibiótico de mejor forma y reducir los errores, además

de mejorar la gestión de antibióticos en una de las infecciones más frecuentes en el mundo. De forma local permitió identificar las clonas prevalentes en nuestro medio y relacionarlas con patrones de susceptibilidad antibiótica específicas, mejorando nuestro conocimiento epidemiológico bacteriano. Resalta la importancia del conocimiento molecular de nuestra flora local dado que es diferente a la reportada en otras poblaciones y esto podría tener implicaciones para su aplicación local.

La principal limitación del estudio estuvo relacionado con el tamaño de la muestra, es posible que con un número mayor de participantes se puedan encontrar diferencias estadísticamente significativas con respecto a las patrones de susceptibilidad antibiótica. El siguiente paso en nuestra investigación será incrementar el número de muestra y estandarizar la técnica para que de resultados en menos de 2 horas.

## **CONCLUSIONES**

Se demostró que la técnica de identificación de septatipos basada en PCR-RT es capaz de identificar y agrupar a *E. coli* en clonotipos directamente de la muestra de orina. Los clonotipos de nuestra población son diferentes a los descritos en otras poblaciones. Nuestro clonotipo más frecuente mostró una proporción de susceptibilidad antibiótica diferente al resto de la muestra. Es posible que esta técnica pueda ser usada para identificar y guiar el tratamiento antibiótico en un futuro en los pacientes con IVU.

## Bibliografia:

- 1.- Escherich, T. 1885. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Sauglings. Fortschr. Med. 3:515–522 and 547–554.
- 2.- Kaper, J., Nataro, J. & Mobley, H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123–140 (2004). <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- 3.- Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;358:3-32. doi: 10.1007/82\_2012\_303. PMID: 23340801.
- 4.- Conway T, Krogfelt KA, Cohen PS. The Life of Commensal *Escherichia coli* in the Mammalian Intestine. *EcoSal Plus*. 2004 Dec;1(1). doi: 10.1128/ecosalplus.8.3.1.2. PMID: 26443354.
- 5.- Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Mar;8(3):207-17. doi: 10.1038/nrmicro2298.
- 6.- Johann D. D. Pitout. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance Published online 2012 Jan 19. Prepublished online 2012 Jan 3. doi: 10.3389/fmicb.2012.00009
- 7.- Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Dis Mon*. 2003 Feb;49(2):71-82.
- 8.- Johnson JR1, Gajewski A, Lesse AJ, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive non urinary infections. *J Clin Microbiol*. 2003 Dec;41(12):5798-802.
- 9.- Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect Inst Pasteur* 2003; 5:449–56.
- 10.- Dale AP, Woodford N. *J Infect*. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. 2015 Dec;71(6):615-26. doi: 10.1016/j.jinf.2015.09.009. Epub 2015 Sep 26.
- 11.- Morrill HJ, Morton JB, Caffrey AR, Jiang L, et al. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Urinary Isolates in the Veterans Affairs Health Care System. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Apr 24;61(5). pii: e02236-16. doi: 10.1128/AAC.02236-16. Print 2017 May.
- 12.- Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, Treccarichi EM, Posteraro B, Fiori R. et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by

extended-spectrum- $\beta$ lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1987–94

13.- Jenkins SG, Schuetz AN. Current concepts in laboratory testing to guide antimicrobial therapy. *Mayo Clin Proc.* 2012 Mar;87(3):290-308. doi: 10.1016/j.mayocp.2012.01.007.

14.- Veronika Tchesnokova, Mariya Billig, Sujay Chattopadhyay, Elena Linardopoulou, et al. Predictive Diagnostics for Escherichia coli Infections Based on the Clonal Association of Antimicrobial Resistance and Clinical Outcome. *J Clin Microbiol.* 2013 Sep; 51(9): 2991–2999. doi: 10.1128/JCM.00984-13

15.- Tchesnokova V, Avagyan H, Billig M, Chattopadhyay S, et al. A Novel 7-Single Nucleotide Polymorphism-Based Clonotyping Test Allows Rapid Prediction of Antimicrobial Susceptibility of Extraintestinal Escherichia coli Directly From Urine Specimens. *Open Forum Infect Dis.* 2016 Jan 18;3(1):ofw002. doi: 10.1093/ofid/ofw002. eCollection 2016 Jan.

16.- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 17;95(6):3140-5.

17.- Clermont O1, Gordon D2, Denamur E3. Guide to the various phylogenetic classification schemes for Escherichia coli and the correspondence among schemes. *Microbiology.* 2015 May;161(Pt 5):980-8. doi: 10.1099/mic.0.000063. Epub 2015 Feb 24.

18.- Weissman SJ, Johnson JR, Tchesnokova V, Billig M, et al. High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Mar;78(5):1353-60. doi: 10.1128/AEM.06663-11. Epub 2012 Jan 6.

19.- Veronika Tchesnokova, Mariya Billig, Sujay Chattopadhyay, Elena Linardopoulou, et al. Predictive Diagnostics for Escherichia coli Infections Based on the Clonal Association of Antimicrobial Resistance and Clinical Outcome. *J Clin Microbiol.* 2013 Sep; 51(9): 2991–2999. doi: 10.1128/JCM.00984-13

20.- Weissman SJ, Chattopadhyay S, Aprikian P, Obata-Yasuoka M, et al. Clonal analysis reveals high rate of structural mutations in fimbrial adhesins of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. *Mol Microbiol.* 2006 Feb;59(3):975-88.

21.- Medina M, Castillo-Pino E. An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Therapeutic Advances in Urology.* January 2019. doi:10.1177/1756287219832172



- 22.- Chardavoyne, P., & Kasmire, K. E. (2020). Appropriateness of Antibiotic Prescriptions for Urinary Tract Infections. *Western Journal of Emergency Medicine: Integrating Emergency Care with Population Health*, 21(3). <http://dx.doi.org/10.5811/westjem.2020.1.45944> Retrieved from <https://escholarship.org/uc/item/56d2103s>.
- 23- Lehmann LE, Hauser S, Malinka T, Klaschik S, Weber SU, Schewe JC, Stüber F, Book M. Rapid qualitative urinary tract infection pathogen identification by SeptiFast real-time PCR. *PLoS One*. 2011 Feb 16;6(2):e17146. doi: 10.1371/journal.pone.0017146. PMID: 21359187; PMCID: PMC3040229.
- 24.- Dalhoff A. Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis*. 2012;2012:37. doi: 10.1155/2012/976273.
- 25.-. Seni J, et al, The population structure of clinical extraintestinal *Escherichia coli* in a teaching hospital from Nigeria, *Diagn Microbiol Infect Dis* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.04.001>