



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZALEZ"

Identificación de cepas de E. coli resistentes a quinolonas, en hombres con infección de vías urinarias; caracterización molecular mediante la técnica de PCR múltiple de los grupos taxonómicos, identificación de genes qnr A y B. Y correlación de la respuesta clínica a las terapias antimicrobianas

TESIS

QUE PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD EN
UROLOGÍA

PRESENTA:

DR. JOSÉ GUSTAVO SÁNCHEZ TURATI



DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLOS PACHECO GAHLER

MÉXICO D. F.

2010



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 Hospital General Dr. Manuel Gea González en el Servicio de Urología, y en la Sección de Estudios de posgrado e investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la Dirección del Dr. Francisco Calderón Ferro y el Asesoramiento del Dr. Carlos Pacheco Gahbler.

Este trabajo de Tesis con No. PROT-28-62-2010, presentado por el alumno Dr. José Gustavo Sánchez Turati se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr. Carlos Pacheco Gahbler, y por con fecha del 02 de Agosto de 2010 para su impresión final.

Tutor principal de la Tesis
Dr. Carlos Pacheco Gahbler

Autorizaciones

Dr. Octavio Sierra Martínez
Dirección de Enseñanza e Investigación
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dra. María Elisa Vega Memije
SubDirectora de investigación
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Francisco Calderón Ferro
Jefe de la División de Urología
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Carlos Pacheco Gahbler
Asesor de Tesis
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Identificación de cepas de E. coli resistentes a quinolonas, en hombres con infección de vías urinarias; caracterización molecular mediante la técnica de PCR múltiple de los grupos taxonómicos, identificación de genes qnr A y B. Y correlación de la respuesta clínica a las terapias antimicrobianas.

Colaboradores:

Nombre: Dr. Carlos Pacheco Gahbler

Firma: _____

Nombre: Dr. Rigoberto Hernández Castro

Firma: _____

Nombre: Dr. Jorge Gustavo Morales Montor

Firma: _____

Nombre: Dra. Margarita Torres Tamayo

Firma: _____

Nombre: Dr. Claudio Merayo Chalico

Firma: _____

Nombre: Q.C. Sara Arroyo Escalante

Firma: _____

Nombre: Q.C. David Moncada Barrón

Firma: _____

INDICE

| | |
|------------------------------------|----|
| Glosario | 7 |
| Relación de figuras y tablas | 8 |
| Resumen | 13 |
| Abstract | 14 |
| 1. Introducción..... | 15 |
| 2. Antecedentes | 16 |
| 3. Justificación..... | 24 |
| 4. Objetivos | 25 |
| 4.1. Objetivo General..... | 25 |
| 4.2. Objetivos Particulares..... | 25 |
| 5. Material y Métodos..... | 26 |
| 6. Análisis estadístico..... | 32 |
| 7. Resultados | 34 |
| 8. Discusión y Conclusiones | 36 |
| 9. Bibliografía..... | 52 |

GLOSARIO

IVU: Infección de vías urinarias.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

E. coli: Escherichia coli.

ADN: Ácido desoxiribonucleíco.

LPS: Lipopolisacárido

CFA: Antígenos del factor de colonización.

LT: Enterotoxina termolábil.

STa: Enterotoxina a termoestable.

STb: Enterotoxina b termoestable.

UPEC: Escherichia coli uropatógena.

ExPEC: Formas Extraintestinales.

ETEC: Enteropatógenas

EPEC: Enteroinvasivas.

EIEC: Enterotoxigénicas.

EHEC: Enterohemorrágicas.

EAEC: Enteroagregativas.

DAEC: Adherentes y difusivas.

Pap: Pyelonephritis associated pili.

ESBL: Betalactamasas de espectro extendido.

MIC: Concentración mínima inhibitoria.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

qnrA: Gen de Resistencia Plasmídica a Quinolonas A

qnrB: Gen de Resistencia Plasmídica a Quinolonas B

Palabras Clave:

Escherichia coli; ESBL; qnrA; qnrB

RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

Fig 1: Frecuencia (%) de genes de resistencia a quinolonas qnr A y B, de acuerdo al grupo filogenético (A, B2 y D), en cepas de E. coli.

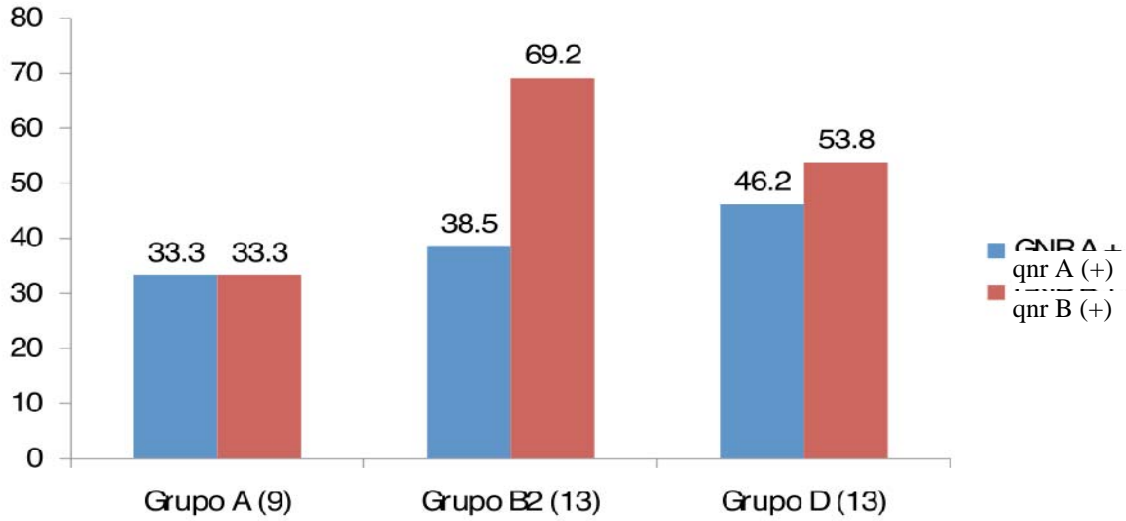


Fig 2:

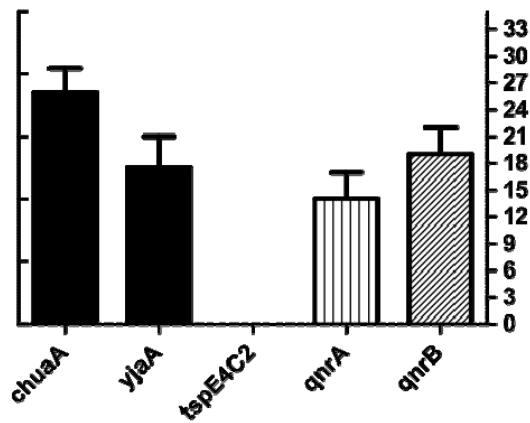
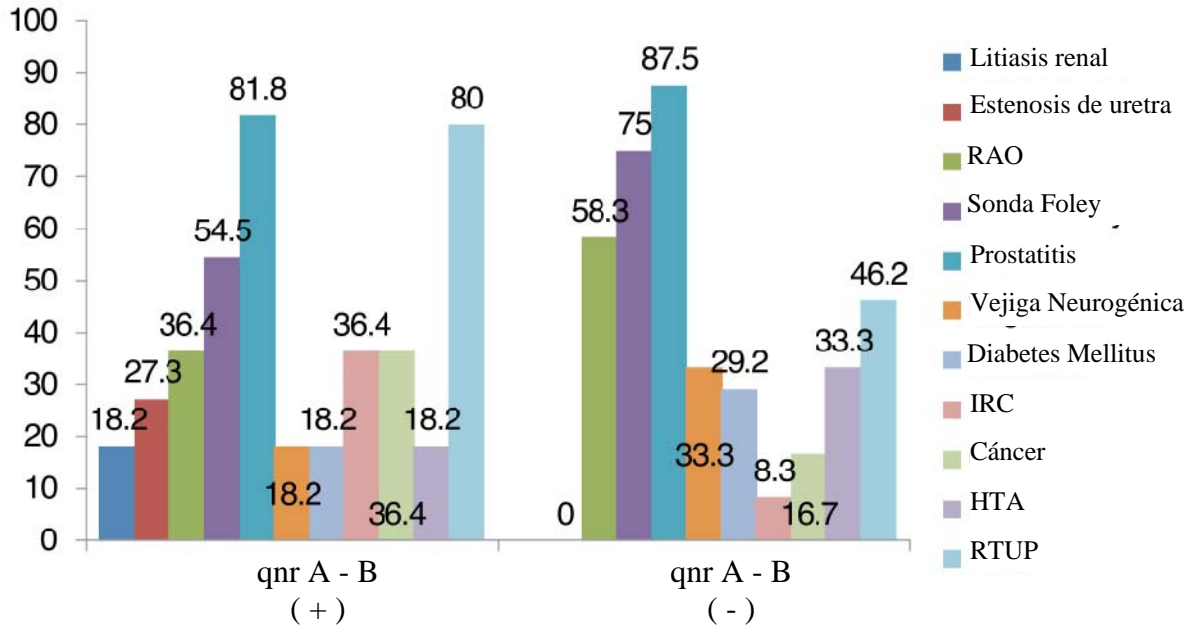


Fig. Determinación de los genes *chuA*, *yjaA* y *tspE4C2* (grupos filogenéticos) y genes *qnrA* y *qnrB*

Fig 3: Frecuencia de comorbilidades de acuerdo a la presencia de los genes de resistencia a quinolonas qnr A y B.



Est = estenosis, RAO = retención aguda de orina, IRC = insuficiencia renal crónica, HTA = hipertensión arterial
RTUP= Resección Transuretral de próstata.

Perfiles de Resistencia (MIC's), ESBL-ab y qnrAB

Fig 4:

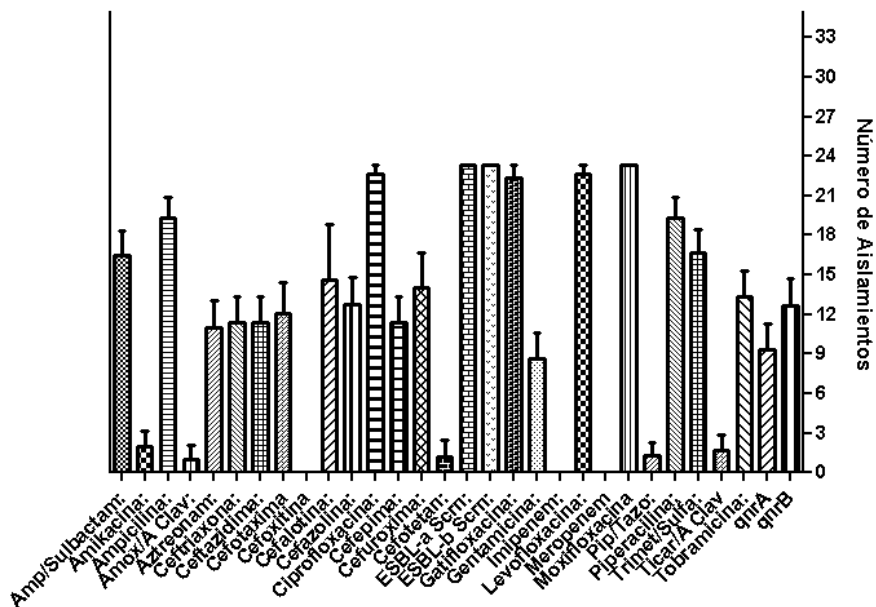


Tabla 1: Resistencia antimicrobiana de cepas de E. coli, de acuerdo a la presencia de los genes de resistencia a quinolonas qnr A - B

| | qnr A-B Positivo (n=11) | qnr A-B Negativo (n=24) | |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| Antimicrobiano | Resistencia n (%) | Resistencia n (%) | p |
| Amikacina | 2 (18.2) | 4 (16.7) | 0.629* |
| Amoxicilina/Clavulanato | 3 (27.3) | 7 (29.2) | 0.282 |
| Ampicilina | 8 (72.7) | 21 (87.5) | 0.269* |
| Ampicilina / Sulbactam | 8 (72.7) | 20 (87) | 0.288* |
| Aztreonam | 3 (27.3) | 14 (58.3) | 0.089* |
| Cefalotina | 1 (9.1) | 5 (20.8) | 0.615 |
| Cefazolina | 6 (54.5) | 14 (58.3) | 0.540 |
| Cefepima | 4 (36.4) | 14 (58.3) | 0.200* |
| Cefotaxima | 2 (18.2) | 12 (50) | 0.078 |
| Cefotetan | 0 | 1 (4.2) | 0.318 |
| Cefoxitina | 1 (9.1) | 3 (12.5) | 0.221 |
| Ceftazidima | 3 (27.3) | 14 (58.3) | 0.089* |
| Ceftriaxona | 3 (27.3) | 14 (58.3) | 0.089* |
| Cefuroxima | 2 (18.2) | 10 (41.75) | 0.225 |
| Ciprofloxacino | 10 (90.9) | 24 (100) | 0.314* |
| Gatifloxacino | 8 (72.7) | 14 (58.3) | 0.162 |
| Gentamicina | 4 (36.4) | 9 (37.1) | 0.626* |
| Imipenem | 0 | 0 | - |
| Levofloxacino | 10 (90.9) | 24 (100) | 0.314* |
| Meropenem | 9 (81.3) | 14 (58.3) | 0.165* |
| Moxifloxacino | 9 (81.3) | 14 (58.3) | 0.165* |
| Piperacilina | 8 (72.7) | 21 (87.5) | 0.269* |
| Piperacilina/Tazobactam | 2 (18.2) | 0 | 0.045 |
| Ticarcilina/Clavulanato | 5 (35.5) | 8 (33.4) | 0.885 |
| Tobramicina | 6 (44.6) | 15 (62.5) | 0.261 |
| Trimetoprim/Sulfametoxazol | 9 (81.8) | 16 (66.6) | 0.309* |

N = número de casos. El valor de p fue calculado con la prueba de Chi² o prueba exacta de Fisher (*)

| Tabla 2: de | n (%) | <i>qnr A - B positivo</i> | | | Frecuencia |
|----------------|--------------------------|---------------------------|----------|----------|------------|
| | | A n=9 | B2 n=13 | D n=13 | |
| | edad <60 | 3 (33.3) | 3 (23.1) | 4 (30.8) | |
| | Litiasis Renal | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 2 (15.4) | |
| | Litiasis Ureteral | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.00) | |
| | Litiasis Vesical | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1 (7.7) | |

características clínicas y la positividad a qnr A - B.

| Tabla 3: de algunas | | | | | Frecuencia |
|------------------------|---------------------------|----------|-----------|-----------|------------|
| | Estenosis Ureteral | 0 (0.0) | 2 (15.4) | 1 (7.7) | |
| | Estenosis Uretral | 0 (0.0) | 1 (7.7) | 0 (0.00) | |
| | RAO | 4 (44.4) | 8 (61.5) | 6 (46.2) | |
| | Sonda Foley | 7 (77.8) | 10 (76.9) | 7 (53.8) | |
| | Prostatitis | 8 (88.9) | 10 (76.9) | 12 (92.3) | |
| | Pielonefritis | 1 (11.1) | 1 (7.7) | 0 (0.00) | |
| | Vejiga Neurogénica | 2 (22.2) | 6 (46.2) | 2 (15.4) | |
| | DM | 3 (33.3) | 2 (15.4) | 4 (30.8) | |
| | IRC | 1 (11.1) | 3 (23.1) | 2 (15.4) | |
| | Cáncer | 2 (22.2) | 4 (30.8) | 2 (15.4) | |
| | HAS | 2 (22.2) | 6 (46.2) | 2 (15.4) | |

características clínicas y comorbilidades, en varones con infección de vías urinarias, de acuerdo a la presencia de genes de resistencia a quinolonas.

| n (%) | qnr AB positivo n = 11 | qnr AB negativo n = 24 | p |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------|
| Edad >60 años | 8 (72.7) | 16 (66.7) | 0.521* |
| Litiasis Renal | 2 (18.2) | 0 | 0.092* |
| Litiasis Vesical | 0 | 1 (4.2) | 0.686* |
| Estenosis Ureteral | 3 (27.3) | 0 | 0.025* |
| Estenosis Uretral | 0 | 1 (4.2) | 0.686* |
| RAO | 4 (36.4) | 14 (58.3) | 0.200* |
| Sonda Foley | 6(54.5) | 18 (75) | 0.205* |
| Prostatitis | 9 (81.8) | 21 (87.5) | 0.509* |
| Pielonefritis | 2 (18.2) | 0 | 0.092* |
| Vejiga Neurogénica | 2 (18.2) | 8 (33.3) | 0.309 |
| Diabetes Mellitus | 2 (18.2) | 7 (29.2) | 0.403* |
| Insuficiencia renal crónica | 4 (36.4) | 2 (8.3) | 0.063* |
| Cáncer | 4 (36.4) | 4 (16.7) | 0.194* |
| Hipertensión arterial | 2 (18.2) | 8 (33.2) | 0.309 |
| RTUP | 4 (80) | 6 (46.2) | 0.225* |

El valor de p fue calculado con la prueba de Ch 2 y prueba exacta de Fisher (*)

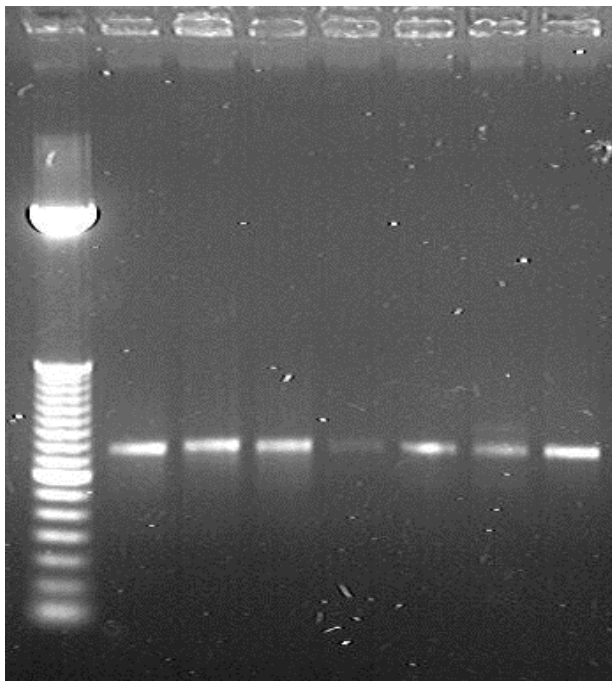


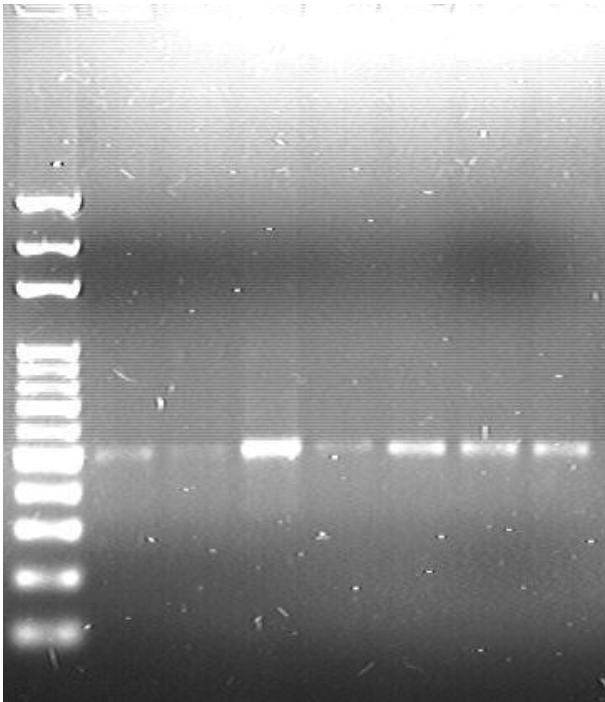
Imagen 1:

Gen qnr B:

- Gel de agarosa al 1.5%.
- Amplificación del gen qnr B.
- Carril 1: Marcador de peso molecular 50 pb.

- Peso molecular de 468 pb.
- Marcador positivo de las muestras 229, 260, 264.

Imagen 2:



Gen qnr A:

- Gel agarosa al 1.5%.
- Amplificación del gen qnr A
- Carril 1: Marcador peso molecular 100 pb
- Peso molecular 543 pb.
- Marcador positivo de las muestras 261, 318, 332, 334, 317.

RESUMEN

Las infecciones de vías urinarias son la infección más frecuente en nuestro medio. Las alteraciones inmunológicas, las instrumentaciones recientes del tracto urinario y la asociación a

contaminación o relaciones sexuales favorecerán la frecuencia, tipo específico y cepa del microorganismo causal. En hombres, al aumentar la edad, la tasa de IVU se incrementa debido a factores como cateterismo vesical, enfermedades prostáticas y obstrucción de la salida o instrumentación en el tracto urinario; de forma menos frecuente, las estenosis de uretra, cateterizaciones, inmovilidad, incontinencia fecal, ingestión baja de líquidos, litos, e ingresos hospitalarios. El agente más común es *Escherichia coli*. Este tipo presenta cuatro grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D. Como en nuestro país los estudios que involucran cepas de UPEC son limitados, se propone caracterizar molecularmente las bases de la resistencia a quinolonas en cepas de UPEC de hombres adultos mediante la detección de los genes plasmídicos *qnrA* y *qnrB*.

Estas determinaciones permitieron identificar los grupos filogenéticos de *E. coli*: Grupo A: 9/35 (25.71%); Grupo B2: 13/25 (37.14%) y grupo D: 13/35 (37.14%).

La expresión encontrada para genes de resistencia fue de: 51.4% (18/35) *qnr A* y 62.8% *qnr B* (22/35). La asociación de ambos fue encontrada en litiasis renal (18%) y la estenosis de uretra (27.3%). Predominaron con la presencia de *qnr A - B* en: IRC (36.4% vs 8.3%) y el cáncer (36.4% vs 16.7%). Sin predominancia en: sonda Foley (54.5% vs 75%), Prostatitis (81.8% vs 87.5%) y vejiga neurogénica (18.2% vs 33.3%).

La asociación de estos genes y su expresión clínica en términos de resistencia antimicrobiana (antibiogramas) y las características clínicas (instrumentaciones, factores inmunológicos o factores patológicos) pueden establecer una descripción de la población afectada así como probables factores de riesgo directo.

Abstract

Urinary tract infections are the most frequent in our population. Immunologic alterations, recent urinary tract instrumentations, and the association to contaminants or sexual relations, will promote the frequency and the specific type and group of the causal microorganism. This differentiation has clinical implications, the selection and duration of the antimicrobial therapies, and the probable surgical procedures. In men, as they grow older, the rate of UTI's increases by factors such as vesical catheterism, prostatic diseases, outlet obstruction or urinary tract instrumentation; with less frequency urethral stenosis, catheterizations, immobility, fecal incontinence, low fluid intake, calculi, and hospital admissions. *Escherichia coli* is the most common causal microorganism. This type have four phylogenetic groups: A, B1, B2 y D. In Mexico, studies about UPEC strains are limited, hence the proposition to molecularly characterize the bases of quinolone resistance in UPEC strains from adult males via the detection of the plasmid genes, *qnrA* and *qnrB*.

This determination allow to identify between the phylogenetic groups of *E. coli*: A: 9/35 (25.71%); B2: 13/25 (37.14%) and D: 13/35 (37.14%).

The isolate found for this genes was: 51.4% (18/35) *qnr A* y 62.8% *qnr B* (22/35).

The correlation found in renal calculi (18%) and urethral estenosis (27.3%) was only in *qnr A - B (+)*. Predominance in: IRC (36.4% vs 8.3%) and cancer (36.4% vs 16.7%). With out predominance: urethral catheter (54.5% vs 75%), Prostatitis (81.8% vs 87.5%) and neurogenic bladder (18.2% vs 33.3%).

The link between these genes and their clinical expression in terms of antimicrobial resistance (antibiograms) and the clinical criterion can establish a description of the affected populations as well as the probable direct risk factors.

1. INTRODUCCION

Las infecciones de vías urinarias son la infección más frecuente en nuestro medio, se definen como la respuesta inflamatoria de cualquier línea celular como respuesta a una infección que puede ocurrir a lo largo del tracto urinario. Las alteraciones inmunológicas, las instrumentaciones recientes del tracto urinario y la asociación a contaminación o relaciones sexuales favorecerán la frecuencia y tipo específico del microorganismo causal. Esta distinción es relevante dadas las implicaciones clínicas, la selección y duración de las terapias antimicrobianas y las posibles intervenciones quirúrgicas. Las IVU son 30 veces más frecuentes en mujeres; fuera de este grupo las infecciones son más frecuentes en hombres. En hombres, al aumentar la edad, se incrementa la tasa por factores como enfermedades prostáticas y obstrucción de la salida o instrumentación en el tracto urinario; de forma menos frecuente, las estenosis de uretra, cateterizaciones, inmovilidad, incontinencia fecal, ingestión baja de líquidos, litos, e ingresos hospitalarios. Prevalenciando de forma directa sobre todos el uso de cateterismo vesical.

El microorganismo causal más común es *Escherichia coli*, un anaerobio facultativo, fermentador de lactosa, catalasa positivo y oxidasa negativo. No presenta motilidad, muestran motilidad debido a la presencia de un flagelo de tipo fimbria.

Este tipo de organismo presenta resistencias antimicrobianas a través de modificación de genes. La caracterización de los grupos filogenéticos permite la identificación puntual de estas mutaciones. Mediante técnicas de electroforesis enzimática en *E. coli* se han identificado cuatro grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D. Esta diversidad dentro de la especie es el resultado de dos procesos evolutivos: la mutación y la transferencia horizontal de genes. Basándose en criterios clínicos, las cepas de *E. coli* pueden ser clasificadas en tres grupos: cepas comensales, cepas patógenas intestinales y cepas patógenas extraintestinales. La identificación de organismos resistentes con reportes de adquisición de mecanismos transferibles de resistencia a β -lactámicos tales como las β -lactamasas de espectro extendido (ESBL), significa que algunos grupos de antimicrobianos (penicilinas o cefalosporinas, excepto cefamicinas y carbapenems) que han sido utilizados por muchos años para infecciones ya no son efectivas.

Como en nuestro país los estudios que involucran cepas de UPEC son limitados, se propone caracterizar molecularmente las bases de la resistencia a quinolonas en cepas de UPEC de

hombres adultos mediante la detección de los genes plasmídicos qnrA y qnrB. Aunque estos son de baja resistencia implican la transferencia de otros factores más importantes como lo son qnrC,D,S; AAC(6ⁱ)-Ib-cr aminoglucosido acetiltransferasa; los genes de las proteínas con repeticiones pentapéptido (mcbG y mfpA); la bombas de eflujo para OqxAB; QepA; y los genes cromosomales gyrA,B y parC.

La asociación de estos genes y su expresión clínica en términos de resistencia antimicrobiana (antibiogramas) y las características clínicas (instrumentaciones, factores inmunológicos o factores patológicos) pueden establecer una descripción de la población afectada así como probables factores de riesgo directo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades.

La vía urinaria y la orina en condiciones normales se encuentra estéril, con excepción de la uretra distal, misma que se encuentra colonizada por flora cutánea. En ausencia de alteraciones las colonizaciones bacterianas procedentes del colon pueden migrar en pequeñas cantidades hacia el tracto urinario, algunas de estas ascienden a la vejiga y al parénquima renal. Estos organismos son controlados por la impermeabilidad y polaridad del urotelio, el aclaramiento urinario, las propiedades antimicrobianas de la orina, así como por IgA secretora y los polimorfonucleares existentes en la superficie urotelial. Cuando dichas bacterias no pueden ser eliminadas, se inicia una colonización del urotelio, con la consecuente lesión al tracto urinario. Esta colonización dependerá de la virulencia de la bacteria, el tamaño del inóculo, los mecanismos de defensa locales y la presencia o no de alteraciones anatómicas o funcionales del tracto urinario. Como resultado existe una eliminación de bacterias por la orina, mismas que pueden ser registradas a través de el examen urinario. (1,2)

La infección de vías urinarias (IVU) se define como la respuesta inflamatoria de cualquier línea celular como respuesta a una infección que puede ocurrir a lo largo del tracto urinario. Por localización se ha dividido en infecciones del tracto urinario alto (riñón y uréteres) e infecciones del tracto urinario bajo (vejiga, próstata y uretra). Los síntomas se encuentran en relación directa al sitio afectado; los más comunes en la infección urinaria baja son: cistitis, disuria, poliaquiuria, pujo, tenesmo, hematuria y dolor suprapúbico (en orden de frecuencia). La pielonefritis (infección del

tracto urinario alto, específicamente parénquima y pelvis renal) se manifiesta por fiebre, náusea, vómito y dolor en flanco. Por el grado de severidad se divide en: complicadas (cuando se asocian a problemas funcionales de producción y filtración), estructurales (como algunas malformaciones y problemas obstructivos), alteraciones inmunológicas (patológicas y naturales como el embarazo), instrumentaciones recientes del tracto urinario, y asociadas a relaciones sexuales. Por grupos de riesgo, las IVU son 50 veces más frecuentes en mujeres entre 20 y 50 años de edad. Fuera de este grupo las infecciones son más frecuentes en hombres y mujeres mayores de 50 años, en este momento la proporción de hombre/mujer disminuye dado el aumento de la incidencia de hiperplasia prostática. (1,2,3,4)

Los factores de riesgo pueden ser variables y asociarse a infecciones. Algunos son variables, como edad, diabetes, embarazo, hábitos sexuales y condiciones fisiológicas y anatómicas del tracto urinario. La susceptibilidad a las IVU está determinada por factores genéticos, biológicos y anatómicos. Es importante tomar en cuenta que el uso inadecuado de antibióticos favorece la selección de cepas multirresistentes.

Aunque las IVU son consideradas un problema principalmente en la población femenina (30 veces más frecuente en las mujeres que en los hombres), ocurre en ambos sexos de todas las edades. Durante el primer año de vida las infecciones del tracto urinario son más comunes en varones; posterior a los primeros años de vida la frecuencia es cada vez mayor en mujeres, habiendo una proporción después de la pubertad y hasta los 65 años de edad de 20:1; a los 65 años de edad se iguala la proporción y al avanzar la edad aumenta en hombres. La prevalencia e incidencia es superior en mujeres por la diferencia anatómica, efectos hormonales y patrones de comportamientos. En mujeres jóvenes el principal factor de riesgo es el coito; de acuerdo a la frecuencia en su práctica se proyecta desde valor 0 sin coitos en 7 días, 2.6 con 3 coitos en 7 días y 9 veces por 7 coitos en 7 días. El uso de espermicidas y diafragmas, así como episodios previos de IVU, incrementan el riesgo de contraer una IVU.

En hombres, al aumentar la edad, se incrementa la tasa por factores como enfermedades prostáticas, obstrucción de la salida o instrumentación en el tracto urinario; de forma menos frecuente las estenosis de uretra, cateterizaciones, inmovilidad, Incontinencia fecal, ingestión baja

de líquidos, litos, e ingresos hospitalarios. Prevalciendo de forma directa sobre todos el uso de cateterismo vesical. (3, 4, 5)

El diagnóstico se lleva a cabo principalmente por examen general de orina, el cual está caracterizado por nitratos elevados, leucocituria y hematuria. Es confirmatorio el aislamiento del microorganismo en las diferentes tomas. La presencia de 100,000 (UFC/mL) en orina puede ser considerada como una IVU en mujeres, mientras que en hombres un cultivo de orina con un crecimiento de más de 1,000 UFC/mL de orina se considera como positivo.

Los cultivos son realizados con el fin de determinar el organismo causal y la susceptibilidad a los antimicrobianos, dando una interpretación cualitativa para estos resultados. (sensible, intermedio o resistente). La selección de antibióticos está determinada por los comités infecciosos, el Comité Clínico de estándares de laboratorios de Estados Unidos y los formularios del Hospital.

Las infecciones de vías urinarias generalmente se encuentran causadas por bacterias gramnegativas. El 95% se produce cuando las bacterias ascienden desde el tracto digestivo al introito vaginal y posteriormente a la uretra, colonizando la vejiga y, en casos de pielonefritis aguda no complicada, por vía uretral hacia el riñón. Dentro de las enterobacterias, la bacteria que se aísla con más frecuencia es *Escherichia coli*, responsable de 80-90%% de las infecciones extrahospitalarias; *Staphylococcus saprophyticus* causa un 10% de ellas. En los pacientes hospitalizados *E. coli* produce 50% de los casos; las especies de gramnegativos *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* y *Serratia* 40% de los casos; y el resto las producen los cocos grampositivos, *Enterococcus faecalis*, y *S. aureus*, y *S. saprophyticus*. En contraste con otras infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad, *E. coli* es el principal agente etiológico de las IVU, 75% al 90% de los aislamientos de infecciones bacterianas.

2.2 Características Microbiológicas.

El género *Escherichia* comprende cinco especies: *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermanni*, *Escherichia vulneris* y *Escherichia coli*, siendo únicamente esta última de importancia clínica. *Escherichia coli* es una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae*, tiene forma de bastón, alrededor de 1µm de diámetro y cerca de 2µm de longitud. Es un bacilo

gram negativo ya que está rodeado por una pared celular rígida compuesta de polisacáridos y péptidos. Dentro de la pared celular se encuentra la membrana plasmática, que es una bicapa de fosfolípidos y proteínas asociadas. Mientras que la pared celular es porosa y puede ser penetrada por una variedad de moléculas, la membrana plasmática proporciona una separación funcional entre el interior de la célula y su medio externo.

Escherichia coli es un anaerobio facultativo, fermentador de lactosa, catalasa positiva y oxidasa negativa. No presenta motilidad sino que la muestra debido a la presencia de un flagelo de tipo fimbria.

El ADN de *E. coli* es una molécula circular única en el nucleoide, que en comparación con el núcleo de los eucariotas, no está rodeado por una membrana que lo separe del citoplasma y este contiene aproximadamente 30.000 ribosomas, que es el lugar donde se realiza la síntesis de proteínas y se destaca por su apariencia granular. Además del cromosoma, a menudo las células bacteriales contienen plásmidos, estas moléculas de ADN son encontradas en todo tipo de bacterias y juegan un papel importante en la adaptación de la bacteria y su evolución. También sirven como herramientas importantes en estudios de biología molecular. Los plásmidos, se encuentran ampliamente distribuidos en las bacterias, su tamaño varía desde menos de 1×10^6 daltons hasta más de 200×10^6 daltons, y son replicones que se heredan de manera estable en estado extracromosómico. Al igual que los cromosomas, los plásmidos codifican proteínas y la replicación de sus copias es usualmente distribuida dentro de cada célula hija cuando la célula se divide. Sin embargo, a diferencia del cromosoma, los plásmidos por lo general no codifican funciones esenciales para el crecimiento de la bacteria. Ellos, en lugar de genes, proporcionan productos que pueden beneficiar a la bacteria; como los genes que codifican para las proteínas que las hacen resistentes a los antibióticos y están frecuentemente en los plásmidos.

2.3 Serología de *Escherichia coli*

En 1944, Kauffmann desarrolló un esquema de clasificación serológica de *E. coli* el cual es utilizado hasta el día de hoy en su forma modificada. La serotipificación sirve para determinar el grupo patógeno al que pertenece cada cepa, *E. coli* es serotipificado en base a sus antígenos de superficie, que son el antígeno somático O, que es un polisacárido termoestable que forma parte del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de la pared celular; el antígeno flagelar

H, que se encuentra en el flagelo, de naturaleza proteica y es termolábil; y el antígeno capsular K, que es un polisacárido que envuelve la pared celular y tiene un factor de virulencia importante.

El antígeno "O" determina el serogrupo, que es la variedad antigénica basada sólo en antígenos O (LPS). La determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, que es la variedad antigénica distinta dentro de cada especie bacteriana, el serotipo en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular.

Las cepas patógenas de *E. coli* poseen estructuras de superficie específicas denominadas antígenos del factor de colonización (CFA). Son proteínas fimbricas implicadas en la fijación específica a la mucosa del intestino delgado, donde pueden colonizar y producir enterotoxinas que causan diarrea y otras enfermedades.

Las toxinas de *E. coli* son secretadas por diferentes elementos estructurales que afectan a una variedad de procesos fundamentales de las células eucariotas, tales como AMP cíclico, GMP cíclico y el ion Ca^{2+} . El ion Ca^{2+} puede ser incrementado, conduciendo a una secreción del ion por las acciones de la enterotoxina termolábil (LT), enterotoxina a termoestable (STa) y enterotoxina b termoestable (STb), esto es producido por algunas cepas de *E. coli*.

Algunas cepas de *E. coli* son patógenas por naturaleza y causan diarreas entéricas. Estas cepas se han englobado en seis diferentes grupos o categorías: *E. coli* enteropatógenas (ETEC), *E. coli* enteroinvasivas (EPEC), *E. coli* enterotoxigénicas (EIEC), *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), *E. coli* enteroagregativas (EAEC), *E. coli* adherentes y difusivas (DAEC). Cada grupo causa enfermedades usando diferentes combinaciones de factores de virulencia, con diferentes vías moleculares. Las cepas extraintestinales de *E. coli* pueden afectar a casi todos los órganos y localizaciones anatómicas, excepto al tracto gastrointestinal. Dentro de las cepas extraintestinales se encuentran las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC), que poseen factores de virulencia únicos. Existe diversidad genética dentro de cada grupo, dentro del mismo sobresale UPEC así como el grupo filogenético B2 y en menor medida el D.

2.4 Grupos filogenéticos de *Escherichia coli*.

Mediante técnicas de electroforesis enzimática en *E. coli* se han identificado cuatro grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D. Esta diversidad dentro de la especie es el resultado de dos procesos

evolutivos: la mutación y la transferencia horizontal de genes. Basándose en criterios clínicos, las cepas de *E. coli* pueden ser clasificadas en tres grupos: cepas comensales, cepas patógenas intestinales y cepas patógenas extraintestinales.

Las cepas comensales constituyen una gran parte de la flora fecal en humanos sanos; tienen diferentes funciones en el intestino sintetizando vitaminas, ya que contribuye a la anaerobiosis del ambiente del intestino grueso. Estas cepas no producen enfermedad y se encuentran en un equilibrio homeostático con el huésped (11). Cuando este microorganismo posee factores de virulencia, como adhesinas, hemolisinas, enterotoxinas y toxinas citotóxicas, se convierte en un patógeno. Se considera como un patógeno oportunista ya que produce enfermedad en pacientes inmunosuprimidos a causa de otras enfermedades como el cáncer, diabetes, cirrosis, o que han recibido tratamiento con medicamentos que afectan el sistema inmunitario, como los corticosteroides y los efectos secundarios de la quimioterapia (11). La mayoría de las cepas *E. coli* comensales humanos derivan de los grupos filogenéticos A y B1 y poseen muy pocos factores de virulencia.

Las cepas de *E. coli* patógenas se encuentran raramente en la flora fecal de las personas clínicamente sanas. Se comportan esencialmente como patógenos obligados y causan gastroenteritis cuando son ingeridos en determinadas cantidades, aunque la mayoría de ellos son incapaces de producir enfermedad fuera del tracto intestinal. Se reconocen seis categorías patogénicas: ETEC, EPEC, EIEC, EHEC, EAEC y DAEC. Existe diversidad filogenética dentro de cada uno de estos tipos patógenos, ya que derivan de los grupos A, B1 o D; en cambio, cada tipo presenta una combinación única de factores de virulencia.

A diferencia de las cepas *E. coli* comensales y patógenas intestinales, las *E. coli* extraintestinales (ExPEC), derivan principalmente del grupo filogenético B2 y en menor medida del grupo D y albergan genes que codifican factores extraintestinales de virulencia. Las ExPEC pueden afectar a casi todos los órganos y localizaciones anatómicas, excepto el tracto gastrointestinal. Dentro de las ExPEC se encuentran las cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC), que son capaces de causar infecciones en el tracto urinario (ITU). Las cepas de estos grupos presentan mecanismos de patogénesis específicos, serotipos distintos y producen síndromes e infecciones diferentes. Así las cepas de *E. coli* utiliza múltiples fases de patogénesis, las cuales

consisten en colonización de un sitio mucoso, evasión de la defensa del huésped, multiplicación y daño al huésped.

2.5 Escherichia coli uropatógena (UPEC).

El término E. coli uropatógena ha sido utilizado para describir las cepas de Escherichia coli capaces de causar IVU. El principal factor de virulencia de las cepas UPEC que causan IVU en seres humanos es la fimbria P ó fimbria Pap (pyelonephritis associated pili). La fimbria P le permite a la bacteria fijarse a los receptores celulares y colonizar el epitelio urinario sin ser arrastrada por la orina. Otra adhesina importante es la fimbria S que se ha asociado especialmente con cepas causantes de septicemias y meningitis.

En las infecciones extraintestinales, el hierro se convierte en uno de los principales factores que limita el crecimiento bacteriano; esta limitación se debe a que todo el hierro esta en hemoproteínas, como la hemoglobina y la mioglobina, o en proteínas quelantes de hierro involucradas en su transporte, como la transferrina o la lactoferrina. Para poder incorporar el hierro la mayoría de las cepas de E. coli causantes de infecciones extraintestinales poseen el sideróforo aerobactina formado por un compuesto quelante de hierro que la bacteria excreta y puede volver a captar. La bacteria secreta el sideróforo cuando hay poco hierro disponible y cuando el complejo hierro-sideróforo alcanza la superficie celular se une a una proteína receptora del sideróforo que se encuentra en la membrana externa de la pared celular. Una vía alterna para que la bacteria adquiera hierro es la hemólisis provocada por la α -hemolisina (Hly). Muchas cepas uropatógenas producen α -hemolisina y el factor citotóxico necrosante CNF1.

2.6 Mecanismos de resistencia antimicrobiana.

La identificación de organismos resistentes desde finales de 1980 con reportes de adquisición de mecanismos transferibles de resistencia a β -lactámicos tales como las β -lactamasas de espectro extendido (ESBL por sus siglas en inglés). Estas resistencias significan que algunos grupos de antimicrobianos (penicilinas o cefalosporinas excepto cefamicinas y carbapenems) que han sido utilizados por muchos años para infecciones comunes como las infecciones de vías urinarias ya no son efectivas. Actualmente se encuentran mundialmente difundidos con prevalencia de 4% en E. coli y 19% de Klebsiella spp.

Este tipo de resistencia no era frecuente en nuestro país y ha ido incrementado su frecuencia de forma importante. De esta forma ha creado multiresistencias, las cuales se traducen en un incremento en la mortalidad, hospitalización prolongada y mayores costos de tratamiento.

Las resistencias se presentan de forma directa con el tipo de antibacteriano utilizado, la forma de prescribirlo y el control que se tiene posterior a la prescripción. En estudios prospectivos realizados en *E. coli* y el cambio de trimetoprim-sulfametoxazol a levofloxacino se observó la velocidad en que se presentaron las resistencias a este medicamento. Tomando como periodo de 1998 a 2005, el uso de levofloxacino se incrementó de 3.1 a 12.7 prescripciones por cada 1000 visitas ($p < 0.01$) observando un incremento de las resistencias en pacientes de consulta externa de 1 a 9% ($p < 0.01$). Aunque la disminución de las prescripciones de sulfonamidas disminuyeron a la mitad durante este periodo, la resistencia a este antibacteriano se incrementó de 26.1 a 29.6%. Las *E. coli* resistentes a levofloxacino resultaron en un incremento en la resistencia a otras clases de antimicrobianos más que los susceptibles a levofloxacino (90% vs 43%, $P < 0.0001$). Se concluyó que los riesgos más importantes en el desarrollo de resistencia a levofloxacino son la estancia en hospitalización (R.R. por cada semana de hospitalización de 2.0; IC 95%, 1.0-3.9) así como el uso de levofloxacino (R.R. 7.6; IC 95%, 2.1-27.5 con respecto al año anterior). Otras condiciones que se estudiaron sin llegar a ser estadísticamente significativas fueron: Diabetes mellitus (R.R: 2.6; $p < 0.03$) y el uso de sondas (R.R: 6.2; $p < 0.03$)

Como en nuestro país los estudios que involucran cepas de UPEC son limitados, se propone caracterizar molecularmente las bases de la resistencia a quinolonas en cepas de UPEC de adultos mayores (hombres y mujeres) mediante la detección de los genes plasmidicos *qnrA,B,C,D,S*; AAC(6')-Ib-cr aminoglucosido acetiltransferasa; los genes de las proteínas con repeticiones pentapéptido (*mcbG* y *mfpA*); la bombas de eflujo para *OqxAB*; *QepA*; y los genes cromosomales *gyrA,B* y *parC*. (32, 33, 34, 35, 36, 37)

3. JUSTIFICACION

La infección de vías urinarias es la patología infecciosa más común en el medio hospitalario, la afección a la calidad de vida se observa en pérdidas de días laborales y gastos en medicamentos de forma prolongada o como sobretratamiento. El tiempo que conlleva el diagnóstico por clínica a posteriormente corroborarlo o corregirlo de acuerdo a los antibiogramas representa gastos importantes para los sistemas de salud.

Las infecciones de vías urinarias son parte de las infecciones bacterianas más comunes, con una incidencia mundial de aproximadamente 150 millones de casos al año. El costo de las mismas se estima en más de \$6 billones de dólares en manejo hospitalario y tratamiento. Estados Unidos de Norte América reporta 13 millones de casos anuales. Se calcula que 60% de las mujeres en los Estados Unidos de Norte América han presentado una IVU durante su vida y el 11% ha experimentado al menos un episodio al año, asimismo más de 8 millones de visitas al médico se atribuyen a infecciones urinarias de tipo crónico generando así un problema económico importante. En México se desconoce el número real de casos, así como el costo de las IVU's y el impacto en la salud pública (10, 11, 12).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Identificar los grupos filogenéticos de E. coli resistentes a quinolonas, en pacientes masculinos con infección de vías urinarias que acuden al Hospital “Dr. Manuel Gea González”.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Identificar los grupos filogenéticos mediante la detección de los genes chu A, yja A y TSPE4.C2
2. Identificar cepas resistentes a quinolonas mediante la detección de los genes plasmídicos qnr A y B.
3. Identificar los perfiles plasmídicos de las cepas aisladas.
4. Conocer la frecuencia con que los pacientes responden al tratamiento médico establecido.
5. Caracterizar a la población portadora de cepas de E. coli resistentes a quinolonas. (Edad, Hiperplasia prostática, Uso de sondas, vejiga neurogénica, Diabetes y Litiasis)

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 Tipo de Estudio

Descriptivo. Abierto. Observacional. Retroprolectivo. Transversal.

5.2 Ubicación Temporal y Espacial

1 de Enero 2010 a 10 de Agosto 2010

Consulta Externa de Urología

Archivo

Laboratorio de Urología Clínica

5.3 Criterios de Selección de la Muestra

Criterios de Inclusión

Expedientes de pacientes masculinos mayores de 18 años de edad, tratados en consulta externa u hospitalización, con urocultivos positivos a E. coli, presencia positiva de ESBL, expedientes completos que reporten Edad, Hiperplasia prostática, Uso de sondas, Diabetes y Litiasis como factores, así como terapias antimicrobianas. En el Hospital "Dr. Manuel Gea González".

Criterios de no Inclusión

Expedientes incompletos

Criterios de Exclusión

Urocultivos positivos a otro microorganismo diferente a E. coli, presencia de ESBL (-), expedientes incompletos.

Criterios de Eliminación

Pacientes perdidos en el seguimiento, cambio de antibióticos por facultativo externo al Hospital, falta de desarrollo de la cepa.

5.4 Variables

| Independientes | | Dependientes | |
|----------------|--------|--------------|--------|
| Variable | Escala | Variable | Escala |

| | | | |
|---|--|---|--|
| <p>Organismos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Patógenas Cepas con más del 90% de factores de virulencia • Comensales Cepas con menos del 10% de factores de virulencia • Características clínicas y sociodemográficas. • ESBL | <ul style="list-style-type: none"> • Nominal • Nominal • Nominal • Nominal | <ul style="list-style-type: none"> • Patrón de resistencia • Resistencia a quinolonas • Grupo filogenético • Edad • Diabetes Mellitus • Sondas • Litos • Hiperplasia prostática | <ul style="list-style-type: none"> • Ordinal: Resistente, Intermedio, Sensible. • Nominal: qnrA, y qnrB. • Nominal: A; B₁; B₂ y D • Cuantitativa • Nominal • Nominal • Nominal • Nominal |
|---|--|---|--|

5.5 Tamaño de la Muestra

35 Pacientes.

5.6 Métodos de Laboratorio

5.6.1 MUESTRAS

Los cultivos se obtendrán de muestras de orina de hombres mayores de 18 años de edad con infección urinaria a lo largo del año 2009-2010, provenientes del servicio de laboratorio clínico del Hospital General "Dr. Manuel Gea González". Las cepas provenientes de las muestras de orina serán identificadas en el servicio de laboratorio clínico utilizando el sistema automatizado MicroScan (DADE BEHRING), asimismo se determinará la presencia de beta-lactamasas y la concentración mínima inhibitoria (MIC) mediante el mismo sistema. Posteriormente las cepas serán almacenadas a -80°C en una suspensión de caldo infusión cerebro corazón-glicerol 50% hasta ser utilizadas en el laboratorio de investigación.

5.6.2 METODOLOGIA

5.6.2.1 Cepas de Escherichia coli.

Se utilizarán 23 cepas de E. coli que serán aisladas de muestras de orina de hombres mayores con infecciones en vías urinarias del Hospital General "Dr. Manuel Gea González". Las muestras serán identificadas en el servicio de laboratorio clínico utilizando el sistema automatizado MicroScan4 (DADE BEHRING), asimismo se determinará para la selección inicial, la presencia de beta-lactamasas y la concentración mínima inhibitoria (MIC) mediante el mismo sistema. Las cepas posteriormente serán almacenadas a -80°C en una suspensión de caldo infusión cerebro corazón-glicerol 50% (crioviales) hasta ser utilizadas.

Posteriormente los crioviales se sembrarán en placas de medios de cultivo bacteriano (agar Mac Conkey), se adicionaran 100 µl de suspensión de caldo infusión cerebro corazón-glicerol 50% (criovial), se deja que la muestra se absorba en el medio y produzca estrías. Dejando incubar a 37°C ± 2 durante 24 horas para tener cepas viables para su utilización.

5.6.2.2 Extracción y manipulación del DNA.

La extracción de DNA se realiza utilizando la técnica descrita por Pitcher et al (1989) empleando Tiocinato de guanidina. Esta técnica se basa en la lisis de las células bacterianas y precipitar el DNA.

En un tubo de 1,5ml estéril se colocan 550µl de buffer de lisis (tiocinato de guanidina 5M, EDTA 0.1M y sarkosyl 0.5% p/v), posteriormente se colocan en cada tubo de 3 a 5 colonias de cada muestra, se homogeniza con la pipeta cuidadosamente, vortexear 10 minutos o más, después adicionar 250µl de acetato de amonio, volver a vortexear 1 minuto y dejar el tubo en hielo durante 10 minutos. Pasado ese tiempo agregar 250µl de precipitador (Procipitate TM), vortexear 3 minutos, agregar cloroformo hasta el volumen máximo del tubo (750µl aprox.), volver a vortexear de 3 a 4 minutos y centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos.

Se sacan los tubos con mucho cuidado ya que se forman una pequeña nata que no se deben mezclar, retirar el sobrenadante sin tocar la masa y colocarlo en un tubo estéril de 1,5 ml, adicionar etanol al 100% hasta el volumen máximo del tubo (750 aprox.), este va a precipitar el DNA, observándose tres fases, agitar lentamente y centrifugar a 15,000 rpm durante 10min, se obtiene un pequeño pellet que es el DNA y se decanta el resto del etanol. Posteriormente se lava el pellet con etanol al 70%, se centrifuga a 15,000 rpm durante 10 minutos, se vuelve a decantar y se deja secar, invertir el tubo sobre una toalla de papel durante 24 horas, tapándolo para que la luz no degrade el DNA. Por último, después de que se secó el DNA se hidrata con 100µl de H₂O y se guarda en refrigeración a 4°C hasta su utilización.

Para confirmar que el DNA extraído está puro se corren las muestras por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, en solución amortiguadora de TAE 1X (Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM) teñido con 4µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Se cargan 5µl del DNA extraído en cada pocillo y el gel se corre a 85V durante 40min. La visualización del DNA se realizará en un transluminador de luz ultravioleta. Se guardan las extracciones para su posterior uso en la amplificación.

Identificación de grupos taxonómicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Iniciadores de PCR

Los iniciadores utilizados serán:

| SECUENCIA (5' 3') | | | |
|-------------------|------------------------|-----------------------|-------------|
| INICIADOR | | | TAMAÑO (pb) |
| chuA | GACGAACCAACGGTCAGGAT | TGCCGCCAGTACCAAAGACA | 279 |
| yjaA | TGAAGTGTCTCAGGAGACGCT | ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC | 211 |
| TSPE4.C2 | GAGTAATGTCTCGGGGCATTCA | CGCGCCAACAAAGTATTACG | 152 |

Condiciones de PCR.

La identificación de grupos taxonómicos de las cepas aisladas se realiza con las condiciones e iniciadores descritos por Clemont et al (2000), para detectar los genes chu A, yja A y TSPE4.C2. las condiciones de amplificaciones serán las siguientes:

| FASES | DESNATURALIZACIÓN | ALINEACIÓN | EXTENSIÓN |
|------------------|-------------------|--------------------|-----------|
| NUMERO DE CICLOS | 1 | 30 | 1 |
| TEMPERATURA | 94°C | 94°C 55°C 72°C | 72°C |
| TIEMPO | 5 min | 30 s | 7 min |

Amplificación del DNA mediante PCR

Para la amplificación se utiliza el DNA que se extrajo con la técnica de tiocinato de guanidina mencionada anteriormente. El DNA es amplificado con los iniciadores y condiciones ya mencionados.

Las mezclas de las reacciones son las siguientes:

| COMPONENTE | CANTIDAD |
|--------------------|----------|
| H ₂ O | 29µl |
| Buffer Mg (10X) | 5µl |
| MgCl (50mM) | 3µl |
| dNTP (10mM) | 5µl |
| Primer 1 | 1µl |
| Primer 2 | 1µl |
| DNA templete | 5µl |
| Taq DNA polimerasa | 1µl |

El volumen final de la mezcla fue de 50µl.

La amplificación se realiza en un termociclador MaxyGene Axygen® y los productos amplificados se corren por electroforesis en gel de agarosa al 3%, en solución amortiguadora de TAE 1X (Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM) teñido previamente con 4µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Se cargan 10µl del producto de la reacción en cada pocillo y el gel se corre a 85V durante 40min. La visualización de la reacción se realiza en un transluminador de luz ultravioleta. Se guardan los productos en un congelador a -20°C para su posterior uso.

5.6.2.3 Extracción de plásmidos de E. coli.

La extracción de plásmidos se realiza mediante el kit QIAprep® Miniprep (50).

Preparación de las muestras:

- En un tubo estéril de 15ml, se adicionan 10ml de caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón), posteriormente se toman de 3 a 5 colonias viables de la muestra y se resuspenden en el caldo BHI.
- Incubar las muestras a 37°C por 24 horas a 200rpm.
- Pasado el tiempo, centrifugar las muestras a 3500rpm durante 25 min.
- Se obtiene un pellet y se decanta el sobrenadante.
- El pellet se deja secar, poniendo el tubo boca abajo durante 3 horas.

Protocolo del kit QIAprep® Miniprep (50) para la extracción de plásmidos.

Una vez seco el pellet se adicionan 250µl de solución P1, previamente preparada con RNAsa y Lyse Blue, homogenizar lentamente con la pipeta sin hacer espuma, pasar el contenido del pellet ya disuelto a un tubo estéril de 1,5ml, adicionar 250µl de la solución P2, agitar muy lentamente. Posteriormente adicionar 350µl de solución N3 y homogenizar muy lentamente hasta que la mezcla obtenga un color blanquecino, centrifugar las muestras a 13,000rpm durante 10min. A continuación el sobrenadante se coloca en una columnilla, teniendo precaución de no tocar el pellet, centrifugar la columnilla 13,000rpm durante 1min, decantar los residuos de la columnilla, adicionar 750µl de PE previamente preparado con etanol al 100%, centrifugar 13,000rpm durante 1min, volver a decantar la columnilla, centrifugar la columnilla sin nada para quitarle restos de solución PE. Cambiar la columnilla a un tubo estéril de 1.5ml, dejar reposar a temperatura ambiente las columnillas por 3 a 4 minutos. Pasado el tiempo agregar 40µl de agua estéril en el centro del filtro de la columnilla; centrifugar la columnilla 13,000rpm durante 1min, lo que se obtiene de la columnilla se pasa a un tubo estéril de 0.5ml y se guarda en el congelador a -20°C para su conservación hasta su utilización.

Posterior a la obtención de los resultados por el laboratorio, se obtienen los expedientes de Archivo Clínico para documentar los datos, Edad, Hiperplasia prostática, Uso de sondas, Diabetes y Litiasis. Se documentan en hojas de Excel de forma binaria con valores de "0" y "1". La realización de tablas comparativas para el reporte de resultados y análisis de factores.

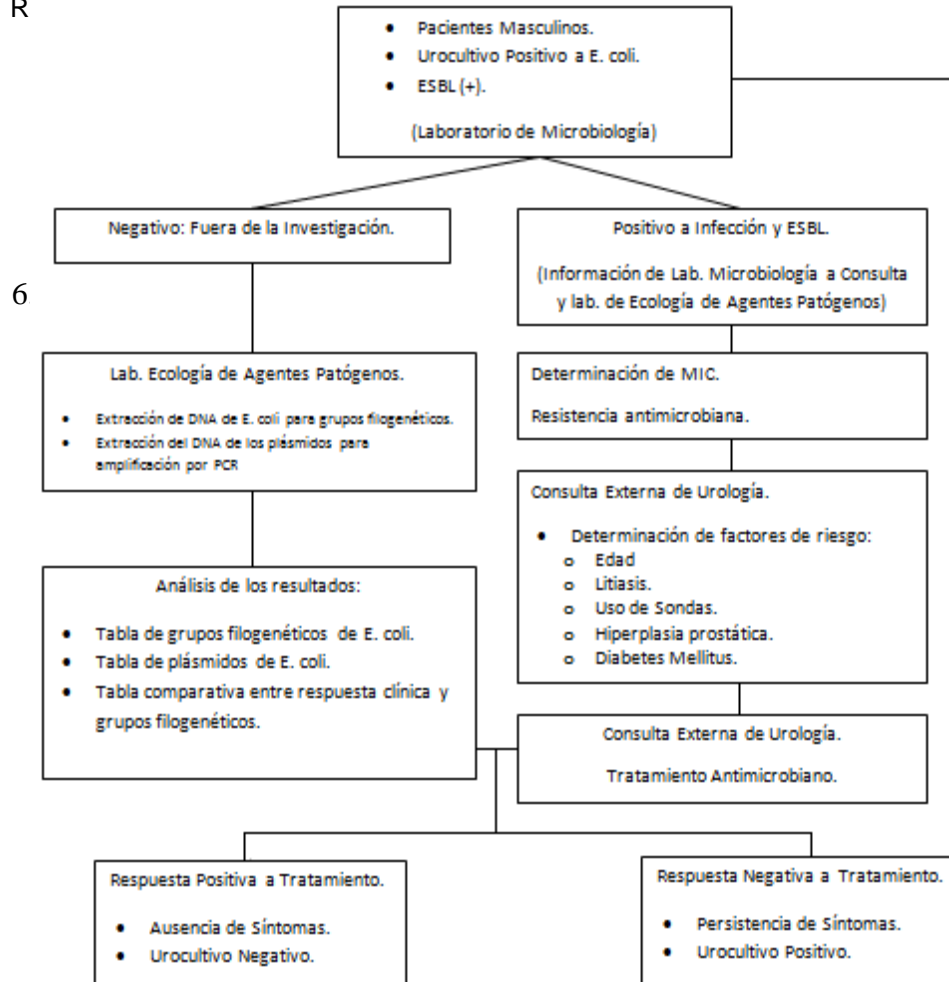
6. Análisis Estadístico

I) Se utilizará estadística descriptiva: medidas de tendencia central y dispersión: rango, media, mediana, moda, desviación estándar, proporciones o porcentajes.

II) Otra(s) prueba(s) estadística(s).

1. Prueba de concordancia Kappa para la frecuencia de los factores filogenéticos.

2. R



7. RESULTADOS

Se estudiaron 35 cepas de E.coli obtenidas de urocultivos provenientes de pacientes varones con infección de vías urinarias que acudieron a tratamiento al Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. La edad media de los pacientes con IVU fue de 65.3 +/- 13.5 años (Rango de 27 a 87 años). La frecuencia de presencia de los genes fue: chuA 85.7% (30/35), yjaA 62.8% (22/35) y tspE4C2 0%(0/35). (Fig. 2). Estas determinaciones permitieron identificar los grupos filogenéticos de E. coli: Grupo A: 9/35 (25.71%); Grupo B2: 13/25 (37.14%) y grupo D: 13/35 (37.14%).

La expresión encontrada para genes de resistencia fue de: 51.4% (18/35) qnr A y 62.8% qnr B (22/35). (Fig. 1)

La expresión dentro de los grupos fue: Gen qnr A similar dentro de los tres grupos filogenéticos D 42.9%, B2 35.7% y A 21.4%. Dentro de los mismos el gen qnr A, fue muy similar en el grupo D (53.8%(-)/46.2%(+)), mientras que en el grupo A (66.7%(-)/33.3%(+)) la expresión no fue similar.

Gen qnr B: Expresión predominante en el grupo B2 47.4%, seguido de el grupo D 36.8%, y A 15.8% con una expresión reducida. La presencia y ausencia del gen qnr B, fue muy similar en el grupo D (46.2%(-)/53.8%(+)), mientras que en el grupo A (66.7%(-)/33.3%(+)) y en el B2 si fue predominante la expresión (30.8%(-)/69.2%(+)).

Factores clínicos:

Se observó una presencia de factores exclusivos para la presencia de genes qnr A - B como lo fue la litiasis renal (18%) y la estenosis de uretra (27.3%). El resto se expresó en ambos grupos, con predominancia para la presencia o ausencia de los genes qnr A - B. Los que predominaron con la presencia de qnr A - B son la IRC (36.4% vs 8.3%) y el cáncer (36.4% vs 16.7%). Se encontraron también factores donde la ausencia de expresión de qnr A - B fue distintiva como son: sonda Foley (54.5% vs 75%), Prostatitis (81.8% vs 87.5%) y vejiga neurogénica (18.2% vs 33.3%).

La terapia empírica inicial fue con fluorquinolonas en todos los casos; no se consiguió respuesta en el 68.57% (24/35). Ya en el seguimiento de el total de pacientes dos fueron finados consecuencia de sepsis 5.7% (2/35), perdidos en seguimiento persistiendo la infección 11.42% (4/35), con persistencia de la infección 42.85% (15/35) y con E. coli erradicadas 40% (14/35).

La erradicación de los microorganismos fue con lavados quirúrgicos en un paciente con Síndrome de Fournier de origen anal (3.5%) y realización de RTUP al 68% de los pacientes.

Un hallazgo particular sin ser el motivo del estudio fue que al observar los manejos terapéuticos para cada uno de los casos se encontró un porcentaje importante de manejos para prostatitis con RTUP en el grupo de expresión de qnr A - B (80% vs 46%). (Fig. 3)

Las resistencias antimicrobianas encontradas en los cultivos reflejan que además de la presencia de betalactamasas de espectro extendido las resistencias en todos los casos con presencia y ausencia del gen para fluorquinolonas es cercana al 100%. De forma cruzada la expresión de resistencias en aminoglucósidos se presentó de forma importante. Por el contrario los carbapenémicos no presentaron resistencia alguna.

De forma individual la Cefoxitina fue el único antimicrobiano que en presencia de qnr A - B se tuvo significancia estadística.

8.DISCUSION y CONCLUSIONES

La expresión de los grupos filogenéticos permite inicialmente la distinción entre los principales sitios infección. Tradicionalmente B2 es la cepa UPEC por excelencia seguida de D; mientras que A y B1 se comportan principalmente como comensales, al ser patógenos gastrointestinales. De acuerdo a los trabajos de Mi Young Lee "et al" 129 E. coli se identificaron los grupos filogenéticos donde se encontró el subgrupo D como el más frecuente (35.7%), seguido de B2 (34%), A (16.3%) y B1 (14.0%). Los subgrupos filogenéticos permitieron identificar a ST131 como el subgrupo más frecuente asociado a B2, conocido por su alta virulencia, mientras que los aislados ST393 pertenecieron únicamente al subgrupo D. Tanto ST131 y ST393 se asociaron a factores papA, papG allele III, y genes traT, pero ST131 se asoció con mayor frecuencia mostrando mayor virulencia. Nuestro trabajo no identificó los subgrupos pero se encontró la misma tendencia en los grupos en general Grupo A: 25.71%; Grupo B2: 37.14% y grupo D: 37.14%.

Los resultados encontrados encontrados hablan de una mayor frecuencia de infección por parte de las cepas de A en mayores de 60 años (66% >60a. vs 33.3% <60a). este incremento se debe a la mayor asociación que se presentó con mayor frecuencia asociada a prostatitis tanto en <60a (88.9%) como en >60a. (88.9%) y asociada a sonda foley en >60a. (77.8%). Esta cepa no tuvo presentación alguna en litiasis existente a cualquier nivel del tracto urinario. Las cepas B2 tradicionalmente UPEC fueron presentes en los casos de litiasis e IRC en todos los casos. En estudios realizados en el Hospital de Val' de Hebrón en Barcelona se ha encontrado una expresión importante del grupo A, por lo que se debe caracterizar de forma más específica la transmisión y expresión de estas cepas mismas que se encuentran en relación a los factores del huésped como condición inmunológica y comorbilidades asociadas.

La expresión de estas resistencias qnr A y B, no son como se observa en la significancia estadística determinante importante de la resistencia per se del microorganismo ya que existen 13 genes asociados a resistencias antimicrobianas dentro de las E. coli agrupados en grupos de porinas, transposones, bombas de eflujo. En nuestra muestra las resistencias encontradas son superiores en todos los casos al 20% para todos los antibióticos utilizados. Comparados con los trabajos de Lixiang "et al", la resistencia antimicrobiana encontrada fue: 73% ampicilina, 25-70%

gentamicina, 41-80% a ciprofloxacino y 23% a Nitrofurantoina. comparados con 72.7% ampicilina, 36.4% gentamicina, 90.9% para ciprofloxacino y 90.9% para levofloxacino.

Diferencias importantes radican en que en el estudio inicial no se hace distinción entre hombres y mujeres o características clínicas de los pacientes que puedan explicar estas diferencias. Cuando se realizó la comparación con la resistencia por grupos y las concentraciones mínimas inhibitorias se observa en el trabajo de Yang "et al" en trabajo realizado en 579 cultivos con E.coli se analizaron 74 (12.8%) con Resistencia a quinolonas. Se identificaron alelos qnr, qepA y aac-(6')-Ib-cr por amplificación de DNA. La mayoría de los gérmenes aislados contienen alelos qepA que mostraron una alta resistencia a ciprofloxacino (MIC > o = 512 mg/L). Pertenecientes al grupo D (22/25), mientras que los aislados que contienen acc-(6')-Ib-cr pertenecientes al grupo A (17/35) o D (16/35). Al ser comparadas a pesar de la resistencia con MIC > o = a 4 mg/l.

No se encontró trabajo que muestre una relación entre los factores de resistencia por grupo en población masculina asociada a factores clínicos y resultados de las terapias antimicrobianas sin embargo de acuerdo al trabajo de Kurt G. Naber los tiempos de tratamiento y erradicación para prostatitis son al menos por 1 mes en el uso de fluorquinolonas encontrando una respuesta de 92% entre 5 -12 días y disminuyendo al 65% de erradicación con levofloxacino en el uso a 6 meses.

La predilección mostrada por las cepas que expresaron qnr A - B, en la litiasis, estenosis de uretra fue complementada por la caracterización del grupo B2 en todos estos casos. Cuando solo existía una mayor frecuencia se obtuvieron la IRC 36.4% y el cáncer vs 16.7%. Se encontraron también factores donde la ausencia de expresión de qnr A - B fue distintiva como son: sonda Foley (54.5% vs 75%), Prostatitis (81.8% vs 87.5%) y vejiga neurogénica (18.2% vs 33.3%).

Como conclusiones se observa una presencia importante de cepas uropatógenas en la población pero con un aumento y expresión clínica de cepas que no debieran tener una repercusión importante en la patología urológica como lo es el grupo A. La terapia empírica inicial se ha manejado de forma tradicional con fluorquinolonas en periodos de 3 a 6 semanas de tratamiento, sin embargo aunque las bacteriurias disminuyeron, sí se encontró dentro de las piezas de patología en los pacientes con prostatitis la presencia de microabscesos. Cabe destacar que sin ser el objetivo de estudio, como hallazgo se encontró que estos pacientes en tratamiento por

prostatitis presentaron antígenos prostáticos elevados, con una o dos series de biopsias prostáticas no resolvió la sintomatología urinaria si no hasta después de la RTUP. Esto nos habla de la naturaleza invasiva de las colonias.

Estos hallazgos deben ser tomados en cuenta en pacientes con seguimiento por antígenos elevados aunados a la falta de respuesta antimicrobiana en el EGO.

Un hallazgo particular sin ser el motivo del estudio fue que al observar los manejos terapéuticos para cada uno de los casos se encontró un porcentaje importante de manejos para prostatitis con RTUP en el grupo de expresión de qnr A - B (80% vs 46%).

Estos hallazgos aunque podrían ser explicados por las condiciones del huésped ya que la mayoría era mayor a 60 años, no pueden ser considerados como determinantes dado el tamaño de la muestra y la existencia de otros genes de resistencia que presentan una mayor expresión.

9.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Norris DL, Young JD; Urinary tract infections: Diagnosis and management in the emergency department; *Emerg Med Clin N Am*; 2008; 26; 413-430.
2. Boie E, Goyal D, Sadosty A; Urinary tract infections. In: Wolfson A. editor. *Clinical practice of emergency medicine*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
3. Andreu A, 1995. Infecciones urinarias: aspectos puntuales. *Enferm infecc Microbiol Clin*; 13: 527-531.
4. Andreu, A. 2005. Patogenia de las infecciones del tracto urinario. *Enferm infecc Microbiol Clin*; 23:15-21.
5. Pollock HM; Laboratory techniques for detection of urinary tract infection and assessment of value; *Am J Med*; 1983; 75 1B:79.
6. Hooton TM, Scholes D, Hughes JP; A prospective study of risk factors for symptomatic urinary tract infection in young women. *N Engl J Med*; 1996; 335:468-474.
7. Sanford JP, Favour CB, Mao, FH, Harrison, JH. Evaluation of the positive urine culture; an approach to the differentiation of significant bacteria from contaminants. *Am J Med* ; 1956; 20:88.
8. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD;. Urinary tract infection: Self reported incidence and associated cost. *Ann Epidemiol*, 2000; 10:509-515.
9. Foxman B; Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity and economic costs. *Am J Med*; 2002; 113:5S-13S.
10. Russo TA, Johnson JR;. Medical and economical impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect*; 2003; 5:449-456.
11. Ron EZ; Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens; *Curr Opin Microbiol*; 2006; 9:28-32.
12. Skyberg JA, Johnson TJ, Johnson JR, Clabots C, Logue CM, Nolan LK; Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities

- to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infect Immun*, 2006.74:6287-92
13. Hung CS, Bouckaert J, Hung D, Pinkner J, Widberg C, DeFusco A, Auguste CG, Strouse R, Langermann S, Waksman G, Hultgren SJ. Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol Microbiol*, 2002.44:903-915.
 14. Bower JM, Eto DS, Mulvey MA; Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic*, 2005. 6:18-31.
 15. Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun*, 2001. 69:4572-4579.
 16. Garofalo CK, Hooton TM, Martin SM, Stamm WE, Palermo JJ, Gordon JI, Hultgren S J. *Escherichia coli* from urine of female patients with urinary tract infections is competent for intracellular bacterial community formation. *Infect Immun*, 2007. 75:52-60.
 17. Karlowsky JA, Nelly LJ, Thornsberry C, Jones ME, Sahm D; Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolated of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*; 2002., 46:2540-2545.
 18. Aíslan H, Azap OK, Ergönül Ö, Timurkaynak F; Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. *J Antimicrob Chemother*, 2005; 56:914-918.
 19. Houdouin V, Bonacorsi S, Bidet P, Bingen-Bidois M, Barraud D, Bingen E; Phylogenetic background and carriage of pathogenicity island-like domains in relation to antibiotic resistance profiles among *Escherichia coli* urosepsis isolates. *J Antimicrob Chemother*, 2006. 58:748-751.
 20. Moreno E, Prats G, Sabate M, Perez T, Johnson RJ, Andreu A; Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 57:204-211.
 21. Calbo E, Romani V, Xercavins M, Gomez L, Garcia Vidal C, Quintana S, Vila J, Garau J; Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 57:780-783.

22. Arredondo-García JL, Figueroa-Damián R, Rosas A, Jáuregui A, Corral M, Costa A, Merlos RM, Ríos-Fabra A, Amábile-Cuevas CF, Hernández-Oliva GM, Olguín J, Cardeñosa-Guerra O; uUTI Latin American Study Group. Comparison of short-term treatment regimen of ciprofloxacin versus long-term treatment regimens of trimethoprim/sulfamethoxazole or norfloxacin for uncomplicated lower urinary tract infections: a randomized, multicentre, open-label, prospective study. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Oct;54(4):840-3.
23. Pérez-Trallero E, Urbieta M, Jimenez D, García-Arenzana JM, Cilla G. Ten-year survey of quinolone resistance in *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1993;12:349-351.
24. Soto SM, Jimenez de Anta MT, Vila J; Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or -independent pathways, respectively. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006; 50:649-653.
25. Ruiz J, Simon K, Horcajada JP, Velasco M, Barranco M, Roig G, Moreno-Martínez A, Martínez JA, Jiménez de Anta T, Mensa J, Vila J. Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *J Clin Microbiol*, 2002.40:4445-4449.
26. Horcajada JP, Soto S, Gajewski A, Smithson A, Jiménez de Anta MT, Mensa J, Vila J, Johnson JR. Quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* strains from phylogenetic group B2 have fewer virulence factors than their susceptible counterparts. *J Clin Microbiol*, 2005 43:2962-2964.
27. Houdouin V, Bonacorsi S, Bidet P, Bingen-Bidois M, Barraud D, Bingen E. Phylogenetic background and carriage of pathogenicity island-like domains in relation to antibiotic resistance profiles among *Escherichia coli* urosepsis isolates. *J Antimicrob Chemother*, 2006 58:748-751.
28. Sprouse D. UTI Management of Antibiotic Resistance. *Urologic Nursing*. 2005;25(6):469 <11>.
29. Forman E, Gabbur N. Urinary Tract Infections in Pregnancy: A Diagnostic Dilemma. *Obstet Gynecol*. 2006 April 1, 2006;107(4_Supplement):68S-.

30. Roos V, Schembri MA, Ulett GC, Klemm P. Asymptomatic bacteriuria Escherichia coli strain 83972 carries mutations in the foc locus and is unable to express F1C fimbriae. *Microbiology*. 2006;152(6):1799.
31. Stamm WE, Wagner KF, Amsel R, et al. Causes of the acute urethral syndrome in women. *N Engl J Med* 1980; 303:409.
32. Platt, R. Quantitative definition of bacteriuria. *Am J Med* 1983; 75:44.
33. Pollock HM. Laboratory techniques for detection of urinary tract infection and assessment of value. *Am J Med* 1983; 75 1B:79.
34. Sanford JP, Favour CB, Mao FH, Harrison JH. Evaluation of the positive urine culture; an approach to the differentiation of significant bacteria from contaminants. *Am J Med* 1956; 20:88.
35. Stamm WE, Counts GW, Running KR, et al. Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women. *N Engl J Med* 1982; 307:463.
36. Komaroff AL. Acute dysuria in women. *N Engl J Med* 1984; 310:368.
37. Kunin CM, White LV, Hua TH. A reassessment of the importance of "low-count" bacteriuria in young women with acute urinary symptoms. *Ann Intern Med* 1993; 119:454.
38. Koeijers JJ, Kessels AG, Nys S, et al. Evaluation of the nitrite and leukocyte esterase activity tests for the diagnosis of acute symptomatic urinary tract infection in men. *Clin Infect Dis* 2007; 45:894.
39. Hooton TM, Scholes D, Stapleton AE, et al. A prospective study of asymptomatic bacteriuria in sexually active young women. *N Engl J Med* 2000; 343:992.
40. Boscia JA, Abrutyn E, Levison ME, et al. Pyuria and asymptomatic bacteriuria in elderly ambulatory women. *Ann Intern Med* 1989; 110:404.
41. Stamm WE. Measurement of pyuria and its relation to bacteriuria. *Am J Med* 1983; 75:53.

42. Nicolle LE, Bradley S, Colgan R, et al. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis*; 2005; 40:643.
43. Bengtsson C, Bengtsson U, Bjorkelund C, et al. Bacteriuria in a population sample of women: 24-year follow-up study. Results from the prospective population-based study of women in Gothenburg, Sweden. *Scand J Urol Nephrol* 1998; 32:284.
44. Nicolle, LE. Asymptomatic bacteriuria: when to screen and when to treat. *Infect Dis Clin North Am* 2003; 17:367.
45. Roos V, Nielsen EM, Klemm P. Asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strains: adhesins, growth and competition. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 262:22.
46. Gross, PA, Patel, B. Reducing antibiotic overuse: a call for a national performance measure for not treating asymptomatic bacteriuria. *Clin Infect Dis* 2007; 45:1335.
47. Harding GK, Zhanel GG, Nicolle LE, Cheang M. Antimicrobial treatment in diabetic women with asymptomatic bacteriuria. *N Engl J Med* 2002; 347:1576.
48. Ouslander JG, Schapira M, Schnelle JF, et al. Does eradicating bacteriuria affect the severity of chronic urinary incontinence in nursing home residents? *Ann Intern Med* 1995; 122:749.
49. Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M, et al. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* 1995; 345:886.
50. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000; 343:1917.
51. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. [see comments]. *Crit Care Med* 1999; 27:887.
52. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the

SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis 2001; 32 Suppl 2:S114.

53. Gordon KA, Jones RN. Susceptibility patterns of orally administered antimicrobials among urinary tract infection pathogens from hospitalized patients in North America: comparison report to Europe and Latin America. Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000). Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 45:295.
54. Pierre-Edouard Fournier, Michel Drancourt, Didier Raoult; Bacterial genome sequencing and its use in infectious diseases; Lancet Infect Dis 2007; 7: 711–23.
55. Lixiang Zhao, Xiang Chen; Prevalence of Virulence Factors and Antimicrobial Resistance of Uropathogenic Escherichia coli in Jiangsu Province (China); UROLOGY 74: 702–707, 2009.
56. Mi Young Lee, Hyeon Jin Choi, Ji Young Choi; Dissemination of ST131 and ST393 community-onset, ciprofloxacin-resistant Escherichia coli clones causing urinary tract infections in Korea. The Journal of Infection - Volume 60, Issue 2 (Feb, 2010)
57. Yang J, Luo Y, Li J, Ma Y, Hu C, Jin S, Ye L, Cui S; Characterization of clinical Escherichia coli isolates from China containing transferable quinolone resistance determinants. - J Antimicrob Chemother - 01-MAR-2010; 65(3): 453-9.
58. Ari Robicsek, George A Jacoby, David C Hooper; The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone Resistance; Lancet Infect Dis 2006; 6:629–40