



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DETECCIÓN DE GENES QUE CODIFICAN RESISTENCIA A  
ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Escherichia coli* UROPÁTOGENAS.

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LIC. EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

MIGUEL ANGEL RAMOS PUEBLA.

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Eric Monroy Pérez

Proyecto financiado por la UNAM DGAPA,  
PAPIME PE203714



Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2016



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.

*“Sería posible describir todo científicamente, pero no tendría ningún sentido; carecería de significado el que usted describiera a la sinfonía de Beethoven como una variación de la presión de la onda auditiva.”*

*Albert Einstein  
(1879 - 1955)*

# Dedicatoria

- A mis padres **José y Carmen**: Por su grandioso éxito reproductivo, su ilimitado e inalcanzable apoyo en todo aspecto, pero sobre todo, por su inspiración, inteligencia y paciencia. Gracias por estar presentes en este escalón. Los amo.
- A mis hermanas **Jessica y Angélica**: gracias por sus consejos, regaños, por su tiempo para compartir experiencias, las cuales me ayudaron a lo largo de toda la carrera.
- A mis **amigos**: mis más cercanos compañeros de aula, que sufrimos por tareas interminables, que nos desvelamos juntos tratando de resolver los principios de Hardy-Weinberg, que pasamos tiempo en los lugares más difíciles de las practicas de campo como Soyaniquilpan. Los momentos compartidos, las enseñanzas, todo, muchas gracias compañeros.

## AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por darme la oportunidad de estudiar en esta gran casa de estudios. Por brindarme todos los conocimientos y formarme ética y profesionalmente.
- Al Dr. Eric Monroy Pérez por aceptar y dirigir este trabajo de tesis, brindarme su asesoría, paciencia y su compañía en el laboratorio, pero sobre todo, su gran conocimiento, los cuales permitieron culminar esta fase de mis estudios.
- A la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras por abrirme las puertas de su laboratorio, por su asesoría y su enorme contribución durante todo este proyecto. Su gran conocimiento ayudo que este trabajo fuera culminado.
- Al comité revisor de esta tesis, que se tomo el tiempo para leer mi trabajo:

Dr. Sergio vaca pacheco.

M.C. Alina uribe garcia.

Biol. Susana Esther Gonzales almazan.

## INDICE

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	8
2.1 Características de la familia <i>Enterobacteriace</i> .....	8
2.2 Enterobacterias patógenas oportunistas .....	9
2.3 Enterobacterias patógenas obligadas .....	10
2.4 Género <i>Escherichia</i> .....	10
2.5 <i>Escherichia coli</i> Patógenas .....	10
2.6 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	12
2.7 Infecciones del sistema nervioso central.....	13
2.8 Infecciones extraintestinales por <i>Escherichia coli</i> .....	13
2.9 Pruebas y exámenes .....	15
2.10 Vías de infección por <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.11 <i>Escherichia coli</i> uropatógenas (UPEC) .....	17
2.12 Factores determinantes de virulencia .....	17
2.13 Adherencia e invasividad de cepas UPEC.....	18
2.14 Tratamiento .....	20
2.15 Tipos de resistencia bacteriana a los antibióticos. ....	21
2.16 Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos.....	22
2.17 Principales mecanismos de resistencia a antibióticos por bacterias .....	23
Alteraciones de la permeabilidad .....	23
2.18 Resistencia bacteriana a antibióticos .....	26
3. JUSTIFICACION .....	32
4. ANTECEDENTES .....	33

5. OBJETIVOS .....	35
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	35
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	35
6. MATERIALES Y METODOS .....	36
6.1 Origen de las cepas .....	36
6.2 Extracción de DNA bacteriano .....	36
6.3 Identificación de las cepas de <i>E. coli</i> por PCR.....	36
6.4 Electroforesis en geles de agarosa .....	39
7. RESULTADOS .....	40
7.1 Pacientes estudiados .....	40
7.2 Edad de los pacientes.....	40
7.3 Diagnóstico de los pacientes estudiados .....	41
7.4 Identificación de <i>E. coli</i> por PCR convencional.....	43
7.5 Detección de genes que codifican resistencia a antibióticos en cepas de <i>E. coli</i> uropatógenas .....	43
7.8 Patrones de genes que codifican para resistencia a antibióticos en las cepas UPEC.....	48
8. DISCUSIÓN .....	51
8.1 Pacientes estudiados .....	51
8.2 Detección de genes que codifican resistencia a antibióticos en cepas de <i>E. coli</i> uropatógenas .....	52
8.3 Patrones de genes que codifican para resistencia a antibióticos en las cepas UPEC.....	54
9. CONCLUSIONES.....	55
10. BIBLIOGRAFÍA .....	56

## 1. RESUMEN

En los últimos años en nuestro país el tratamiento de las infecciones de las vías urinarias por cepas de *Escherichia coli* uropatógenas se ha complicado debido a la selección de cepas resistentes a los antibióticos, por lo que el propósito de este trabajo fue caracterizar molecularmente los diferentes genes que codifican para resistencia a los antibióticos en un grupo de cepas de *Escherichia coli* uropatógenas. Para el desarrollo de este estudio se analizaron 194 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones de las vías urinarias (UTIs) de pacientes atendidos en un hospital y una clínica del IMSS en Tlalnepantla, Edo. de México. La identificación de las cepas de *E. coli* se realizó por pruebas bioquímicas y por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) mediante el gen *rRNA*. Los genes que codifican para la resistencia a antibióticos y betalactamasas se realizó por PCR sencillo y por PCR multiplex. El 30.9% (n=60) de las cepas de *E. coli* fue portadora del gen *sul1* que codifica resistencia a sulfonamida, 33.5% (n=65) de *tetA* (tetraciclina), 17% (n=33) de *tetB*, 12.3% (n=24) de *dfrA1*(trimetoprim), 11.8% (n=23) de *cat1* (cloranfenicol), 4.1% (n=8) de *cmIA* (cloranfenicol), 2% (n=4) de *aadA1* (estreptomina) y 0% de *aac(3)-IV* (gentamicina) y *qnr* (quinolonas), en cada caso. Los resultados demostraron que las cepas de *E. coli* aisladas de las UTIs de los pacientes fueron portadoras de múltiples genes que confieren resistencia a los antibióticos, por lo que se deben de mejorar los tratamientos médicos para evitar la cronicidad de los episodios y evitar el desarrollo de cistitis y/o pielonefritis.



## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Características de la familia *Enterobacteriace*

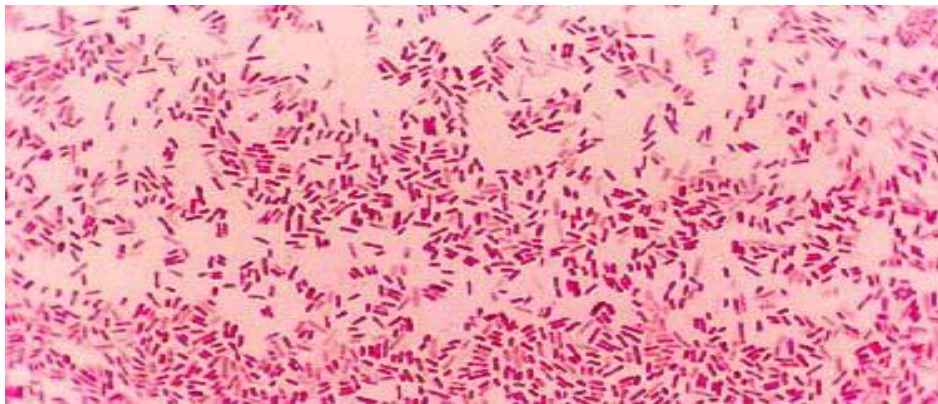
La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas. El nombre de la familia se debe a la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, agua, vegetación y formando parte de la flora intestinal normal del hombre y de muchos otros animales (Puerta, 2010).

Estos microorganismos cosmopolitas, con forma de bastón, tienen un tamaño de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de largo y 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Kollef, 2005). Como es común en las bacterias Gram negativas, su envoltura celular es característica por poseer una estructura multilaminar: la membrana interna o citoplasma consiste de una doble capa de fosfolípidos que regulan las cascadas de nutrientes por medio de canales específicos; La siguiente capa, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un pequeño espacio periplasmático que se distingue del resto de la capa por presentar una elevada cantidad de proteínas. La membrana externa consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS) (en la parte más externa, son un importante factor de virulencia), lipoproteínas (que están fijadas al peptidoglucano), proteínas porinas multiméricas que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos (Mandell, 2006) (cuadro1).

<b>Principales características microbiológicas de la familia <i>Enterobacteriaceae</i></b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Son aerobios no formadores de esporas que pueden crecer en anaerobiosis (anaerobios facultativos).</li><li>• Reducen los nitratos a nitritos (con algunas excepciones).</li><li>• No licuan el alginato</li><li>• Fermentan la glucosa a ácido con producción de gas.</li><li>• Son oxidasa-negativos, a excepción de <i>Plesiomonas</i></li><li>• Producen catalasa</li><li>• No crecen en presencia de NaCl</li><li>• La mayoría son móviles (con flagelos peritricos)</li></ul>

**Cuadro 1.** Características de la familia *Enterobacteriaceae*.

Estas bacterias presentan organelos complejos, como los flagelos, que se proyectan hacia el exterior y que son utilizados principalmente para la locomoción. Los flagelos se originan desde una estructura basal localizada en la membrana interna (Puerta, 2010). Otras estructuras que se consideran factores de colonización e invasión, son las fimbrias y/o adhesinas, así como también los pilis sexuales; estructuras presentes en las bacterias que contienen plásmidos conjugativos y que son utilizados para mediar la transferencia de material genético (García, 1997). (Fotografía 1).



**Fotografía 1.** Vista microscópica de las Enterobacterias utilizando la tinción de Gram.

Dentro de la Familia *Enterobacteriaceae* se reconocen más de 30 géneros diferentes. Actualmente, varios de ellos están siendo sometidos a revisión mediante técnicas de Biología molecular, estudiando la homología de su ADN.

## **2.2 Enterobacterias patógenas oportunistas**

Dentro del grupo de las Enterobacterias se incluyen aquellas especies que forman parte de la flora normal del hombre y de otros animales, pero también suelen producir alteraciones en las defensas locales del hospedero. Los Géneros oportunistas que con mayor frecuencia se aíslan de muestras clínicas son *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*. Estas bacterias pueden ocasionar afecciones extra intestinales como infecciones urinarias, meningitis, abscesos, neumonía, otitis, sinusitis, y meningitis (Merino, 2008).

### **2.3 Enterobacterias patógenas obligadas**

Este grupo no forman parte de la flora normal de hombres y animales, su presencia en las muestras se relaciona con una infección aguda. En esta categoría se incluyen los géneros *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* y *Escherichia*. Se transmiten de hombre a hombre por la vía ano-mano-boca o se adquieren a partir de aguas y alimentos contaminados. Pueden originar infecciones intestinales a excepción de *Salmonella*, que puede producir sepsis y neumonías- estas bacterias son la primera causa de muerte de etiología infecciosa en niños de países subdesarrollados (Almirante, 1980).

### **2.4 Género Escherichia**

Dentro de este género, *Escherichia coli* es la especie con mayor importancia. *E. coli* tiene la capacidad de suprimir el crecimiento de microorganismos proteolíticos en el contenido intestinal del humano, debido a la liberación de bacteriocinas (sustancias con acción bactericida). Estas bacterias pueden ser móviles (la mayoría) o inmóviles, la mayor parte de ellas fermentan la lactosa y son capaces de producir indol a partir de triptófano (Rupp, 2003).

*Escherichia coli* tienen la capacidad de colonizar y aferrarse a numerosos nichos, tanto en vida libre como dentro de algunos animales, incluyendo al hombre (Foxman, 2003). Esta bacteria coloniza el intestino de los humanos pocas horas después del nacimiento y se considera un microorganismo de flora normal, con una relación simbiótica beneficiosa que proporciona nutrientes (aspectos básicos para la regulación del sistema inmune ante patógenos extraños). Pero existen cepas que pueden ser patógenas y causar enfermedades graves en el tracto intestinal y en otros lugares dentro del hospedero (Johnson, 2002).

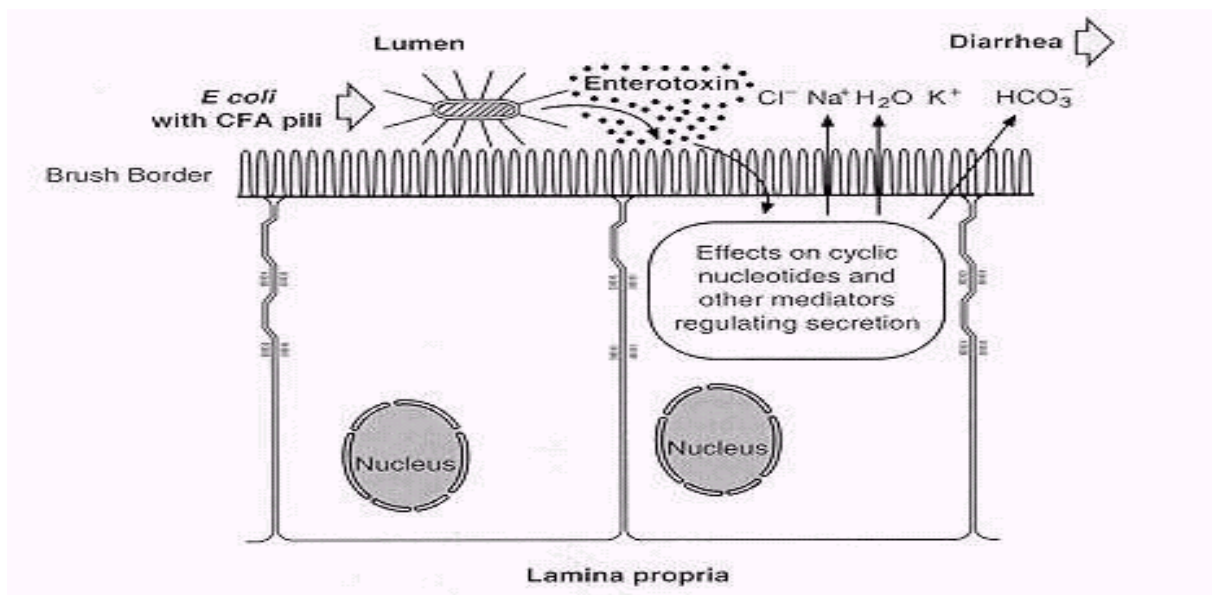
Las cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea se han agrupado en seis tipos patógenos, cada uno definido por sus propiedades de virulencia: *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), con adherencia difusa (DAEC) y enteroagregativa (EAEC). Cada uno de los grupos patógenos de *E. coli* presenta características distintivas relacionadas con su epidemiología, patogénesis, manifestaciones clínicas y tratamiento (Matthew, 2013).

### **2.5 Escherichia coli Patógenas**

*Escherichia coli* enterotoxigénicas (ETEC): Es una de las causas más frecuentes de deshidratación por diarrea en niños menores a dos años y en personas que visitan regiones

tropicales y/o subtropicales caracterizadas por condiciones de higiene deficientes; los síntomas son leves, con diarrea acuosa aunque pueden agravarse con fiebre, escalofríos y vómitos (Rothbaum, 1994). La causa se debe gracias a las enterotoxinas de la cepa que estimula la secreción masiva de líquido en las células mucosas. Una vez que se adhiere al enterocito produce una toxina termolabil (TL) y una termoestable (TS) que activan la adenilato y guanilato ciclasa, respectivamente. Este mecanismo aumenta la secreción de cloruro y bicarbonato, al mismo tiempo que disminuyen la absorción de agua y electrolitos; el resultado: una diarrea acuosa de tipo coleriforme (Dytoc, 2002).

El diagnóstico de la infección por ETEC no suele confirmarse, pues se basa en la detección de los genes que codifican a la enterotoxina TL y TS mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Figura 1.



**Figura 1.** Mecanismo de acción de ETEC *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

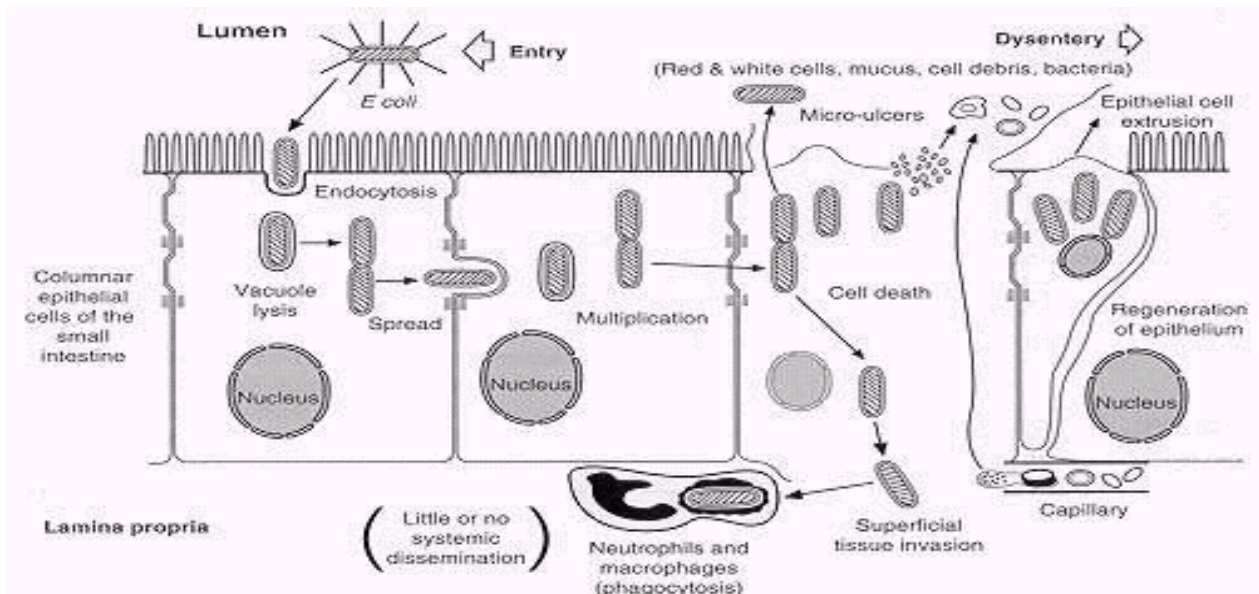
Este tipo de bacterias producen una toxina denominada Shiga-like (o también conocida como verotoxina) que consisten en citotoxinas que orientan la muerte de la célula huésped. Estas bacterias productoras de Shiga pueden causar enfermedades de diferente grado: diarrea acuosa, diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica, síndrome hemolítico urémico (SHU) y muerte (Puerta, 2010). Esto se origina cuando la bacteria se adhiere a la célula intestinal y secreta la verotoxina la cual produce daño en los capilares, provocando una diarrea

sanguinolenta. Esta bacteria también produce una hemolisina que destruye los glóbulos rojos; Aproximadamente 6% de los niños infectados puede complicarse con Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT). El serotipo que con mayor frecuencia se asocia a este mecanismo es *E. coli* O157:H7 (Merino, 2008).

Las pruebas de identificación consisten en detectar los genes que codifican las toxinas Shiga. Existen inmunoensayos enzimáticos para detectar toxina Shiga sobre muestras de heces. Es importante señalar que no se deben emplear los antibióticos porque se ha demostrado que aumentan la producción de la toxina Shiga y, en algunos estudios se ha visto que aumenta la incidencia de SHU (Luzzaro, 2002).

### **2.6 *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC).**

Son capaces de invadir las células y clínicamente se manifiestan como un cuadro similar a la disentería bacteriana, con una incidencia elevada de fiebre y diarrea. Una vez adherida la bacteria al enterocito, induce la captación por la célula intestinal (endocitosis inducida). Internalizado el organismo, se produce la lisis de las vacuolas y las bacterias liberadas se reproducen en el citoplasma, invaden células vecinas y producen lesión en el epitelio. Las bacterias que llegan a la lámina propia son fagocitadas y esto trae como resultado la llegada de más cantidad de macrófagos al lugar. Todo este proceso da por consiguiente una materia fecal con sangre, moco y pus (Pollack, 1992). En la figura 2 se aprecia el mecanismo de patogenicidad.



**Figura 2.** Mecanismo de patogenicidad de *E. coli* enteroinvasiva.

ECEI se detecta en el cultivo como colonias lactosa-negativas, y se confirman por sondas de ADN o por PCR para genes asociados a la virulencia. Estos pacientes se benefician del tratamiento con antibióticos, aunque es muy importante antes de iniciarlo haber descartado la infección por *E. coli* enterohemorrágica (Puerta, 2010).

## 2.7 Infecciones del sistema nervioso central

En su primer mes de vida, los neonatos, están predispuestos a la meningitis bacteriana, *E. coli* y los estreptococos del grupo B son responsables de la mayoría de los casos. Las cepas aisladas de pacientes con meningitis neonatal tienen más probabilidades que las cepas fecales de producir la cápsula K1 que dota a la bacteria de mayor resistencia frente al suero y frente a la fagocitosis. El embarazo se asocia con una tasa aumentada de colonización por cepas K1 (Aguado, 1998).

## 2.8 Infecciones extraintestinales por *Escherichia coli*

**Infecciones del tracto urinario:** Dentro de las cepas de *Escherichia coli* que infectan a los seres humanos, se han descrito dos grupos principales: Las que causan infecciones intestinales (cepas diarreogénicas: EPEC, ETEC, EHEC, EIEC, DAEC y EAEC) y las que

producen infecciones extraintestinales. Este último grupo incluye a los agentes causantes de meningitis, sepsis y las infecciones del tracto urinario (UTIs), (Arshad, 2015).

Los diferentes patotipos de *E. coli* se caracterizan por compartir los antígenos somáticos "O", que definen los serogrupos, antígeno "H" o flagelar, cuya combinación define los serotipos. Se han reconocido más de 1000 serotipos de *E. coli* basados en antígenos O y H. La serotipificación es importante porque contribuye a distinguir el número pequeño de serogrupos que causan enfermedad. Los serogrupos de *E. coli* comúnmente asociados con IsTU son: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O22, O25 y O75, los cuales son responsables de más del 75% de estas infecciones (Ulett, 2013).

Las IsTU son una de las enfermedades más frecuentes alrededor del mundo (Momtaz, 2013). En algunos casos, la transmisión de este tipo de cepas puede ocurrir dentro de una comunidad a través de alimentos contaminados (Manges, 2001). Además, las cepas aisladas de pacientes sexualmente activos a menudo coinciden con aislamientos fecales de sus parejas, lo que indica que las infecciones urinarias se puede transmitir sexualmente (Johnson y Delavari, 1982).

En el año 2007 la secretaria de salud reportó un total de 3, 076,468 casos de infecciones del tracto urinario, de los cuales 74.5 % fueron mujeres y 23% se presentaron en hombres. (Hotoon y Gupta, 2011).

Estas infecciones afectan principalmente a las mujeres, debido a que su distancia desde el colon a la abertura uretral es mucho más corta que en los hombres, por ende, en los hombres, las IsTU tienen una incidencia mucho menor (Grigoryan, 2014). La incidencia de estas enfermedades varía fundamentalmente con la edad y sexo del paciente. Las mujeres menores de 10 años y las de 18 a 40 años (con vida sexual activa) son las que frecuentemente adquieren estas infecciones. Aproximadamente, la mitad de todas las mujeres han tenido una ITU antes de alcanzar sus 30 años de edad. Casi el 26% de las mujeres con ITU aguda tendrán al menos una recurrencia dentro de los primeros seis meses de la ITU inicial y entre 5 y 10% tendrán múltiples recurrencias (López, 2014).

A pesar de esto, las IsTU se mantienen como una de las primeras causas de morbilidad, en donde *E. coli* es el principal agente ocasionando más del 90% de este tipo de infecciones,

seguida por otros géneros bacterianos, como *Klebsiella*, *Proteus* y *Staphylococcus*. Es muy probable que el número de casos de ITU en nuestro país sea mucho mayor que lo reportado, por lo que se considera un problema frecuente de salud pública (Almirante, 2002).

Algunos signos y síntomas que presentan los pacientes con ITU son: Orina turbia o con sangre que puede tener un olor fuerte o desagradable, fiebre baja en algunas personas, dolor o ardor al orinar, presión o calambres en la parte inferior del abdomen o en la espalda, fuerte necesidad de orinar con frecuencia, incluso poco después de haber vaciado la vejiga; Si la infección se propaga a los riñones, los síntomas pueden incluir: Escalofríos y temblores o sudoración nocturna, fatiga y sensación de indisposición general, fiebre por encima de 101° F (38° C), Dolor en la espalda o la ingle, Piel ruborizada, enrojecida o caliente, cambios mentales o confusión (en las personas ancianas, estos síntomas a menudo son los únicos signos de una infección de las vías urinarias), náuseas y vómitos además de dolor abdominal fuerte (Jepson, 2012).

## **2.9 Pruebas y exámenes**

**Análisis de orina:** Este examen se hace para buscar glóbulos blancos, glóbulos rojos, bacterias y buscar ciertas sustancias químicas como nitritos en la orina. La mayoría de las veces, el examen puede diagnosticar una infección.

**Urocultivo en muestra limpia:** Este examen se puede hacer para identificar las bacterias y determinar el mejor antibiótico para el tratamiento. También se pueden hacer exámenes de sangre como un conteo sanguíneo completo y un hemocultivo. La Tomografía computarizada del abdomen, Pielografía intravenosa (PIV), Gammagrafía del riñón, Ecografía del riñón y Cistouretrograma miccional también son exámenes que se pueden necesitar para ayudar a descartar otros problemas en el aparato urinario (Truls, 2011).

## **2.10 Vías de infección por *Escherichia coli***

La vía de infección más frecuente por *E. coli* es la ascendente, donde la colonización del área vaginal y periuretral puede ser la primera etapa para la colonización por *E. coli* y otros organismos uropatógenos (Krieger, 2002). La existencia de sondas, traumatismos o estasis urinario produce una migración de las bacterias por la uretra hacia la vejiga, seguida de una



multiplicación y colonización de esta, donde posteriormente, si se complica la infección, el patógeno ascenderá a través de los uréteres hasta los riñones. Esto es particularmente frecuente en el caso de existir un reflujo vesicoureteral (Calderon, 2013). El hecho de que la uretra en la mujer sea más corta que en varones y exista menor distancia entre meato uretral y ano, explica que las infecciones urinarias sean más frecuentes en el sexo femenino, apoyando la importancia de esta vía.

La vía Hematógena generalmente se da como consecuencia de una sepsis, siendo poco común en las infecciones urinarias en ancianos y la vía por continuidad es a través de las manos del personal y de equipos instrumentales contaminados (Judith, 2002).

La bacteria puede diseminarse en el tracto urinario y establecerse, formando una bacteriuria, que se considera significativa cuando la concentración de unidades formadoras de colonias de bacterias por mililitro de orina supera los 100,000 (Ulett, 2013). La presencia de bacterias no necesariamente conduce a enfermedad; altas concentraciones de bacterias pueden ser detectadas en el tracto urinario de individuos durante exámenes rutinarios de orina y muchos de estos individuos no tienen síntomas. Esta condición es llamada bacteriuria asintomática y ocurre en 6% de los individuos sanos y en 20% de los individuos ancianos. Los pacientes con bacteriuria asintomática generalmente no necesitan tratamiento. Por otro lado, los casos de bacteriuria sintomática son clasificados ya sea como cistitis cuando la infección es limitada a la vejiga o pielonefritis cuando el riñón está infectado. Mientras la cistitis en individuos sanos generalmente se resuelve sin dejar secuelas, la pielonefritis puede causar serias complicaciones y puede ser fatal (Hotoon y Gupta, 2011).

Clínicamente, las infecciones del tracto urinario se definen como “complicadas” y “no complicadas”: Las complicadas se refieren a las infecciones en pacientes con tractos urinarios anormales, con obstrucciones en vías urinarias o cuando el paciente es sometido a maniobras de instrumentación médica, tales como catéteres urinarios. Las infecciones del tracto urinario no complicadas se refieren a infecciones en pacientes con tractos urinarios normales y sin instrumentación (Neil, 2011). La cistitis y pielonefritis son las enfermedades que más frecuentemente se encuentran en las clínicas, sin embargo hay una amplia variedad de otros síndromes clínicos, incluyendo bacteriuria, prostatitis y uretritis. (Hotoon y Gupta, 2014).

### **2.11 *Escherichia coli* uropatogénicas (UPEC)**

UPEC es la bacteria con mayor frecuencia en estas infecciones (IsTU), siendo el agente responsable de la infección en un 70-95% de todos los casos no complicados y de 30% en infecciones nosocomiales (Fariñas, 2010).

Es importante mencionar que la característica más importante de las bacterias uropatógenas es la capacidad para adherirse a las células uroepiteliales del tracto urinario; para llevar a cabo esta tarea las cepas UPEC tienen diferentes apéndices adhesivos en su superficie, los más estudiados son el pili P y el pili tipo-1 (Reyna, 2013).

La adherencia de las bacterias induce apoptosis y exfoliación (desprendimiento celular), y en algunos casos las bacterias pueden internalizarse en las células uroepiteliales (invadir) y replicarse dentro de ellas. Esto le da una ventaja de sobrevivencia, lo que evita que las bacterias sean detectadas por los antibióticos y eliminadas por los mecanismos de defensa inmunes del hospedero (Salvatore, 2011). Las células uroepiteliales invadidas que contienen las bacterias pueden actuar como un reservorio para infecciones recurrentes. Los sistemas eficientes de adquisición de hierro, la habilidad de crecer en la orina y otros factores de virulencia también son cruciales para la sobrevivencia del microorganismo (Neil, 2011).

### **2.12 Factores determinantes de virulencia**

UPEC tiene una gran variedad de factores de virulencia que le permiten evadir las defensas del hospedero y establecer infección en este nicho único (Cuadro 2). Estos factores de virulencia están usualmente codificados en el cromosoma de UPEC y frecuentemente son parte de regiones cromosomales largas e inestables conocidas como “islas de patogenicidad”. En general, el genoma de las cepas UPEC es rico en genes que codifican para adhesinas fimbriales y múltiples sistemas de adquisición de hierro (Molina *et al.*, 2011).

Los principales factores de virulencia asociados con UPEC incluyen:

- Las fimbrias o pilis (ejemplos pili tipo-1, P, S y F1C).
- Los sistemas de adquisición de hierro (sideróforos, aerobactina y enterobactina)

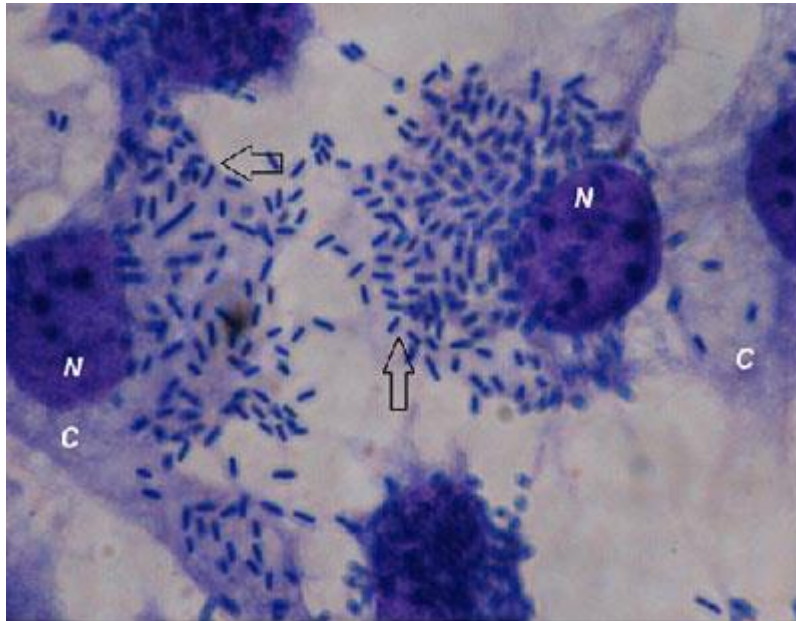
- La producción de toxinas ( $\alpha$ -hemolisina, factor necrotizante citotóxico tipo 1 [CNF-1] y una proteína autotransportadora conocida como Sat).
- Mecanismos de evasión de las defensas del hospedero (cápsulas, antígenos específicos o proteínas de membrana). Estos factores de virulencia tienen su efecto cuando la bacteria se adhiere a las células del hospedero, participan en la inflamación y daño tisular además inducen la producción de citocinas
- Algunas especies producen exoenzimas como ureasa, gelatinasa, lipasa, desoxirribonucleasa, las cuales permiten la sobrevivencia de la bacteria dentro del órgano afectado.

Propiedad	Factor	Función
Adhesinas	Pili tipo P Pili tipo I Pili S	Adherencia e invasividad
Toxinas	HlyA CNF-1 Sat	Hemolisina Citotoxina Vacuolización
Sideróforos	Aerobactina IroN IreA	Captación de hierro
Proteasas	Pic Tsh	Serina proteasa
<b>Cuadro 2.</b> Factores de virulencia que portan las cepas UPEC.		

### 2.13 Adherencia e invasividad de cepas UPEC.

El primer paso de la interacción entre las cepas UPEC y las células hospederas es la adherencia, la cual se lleva a cabo por diversos apéndices (como fimbrias o pilis) que portan

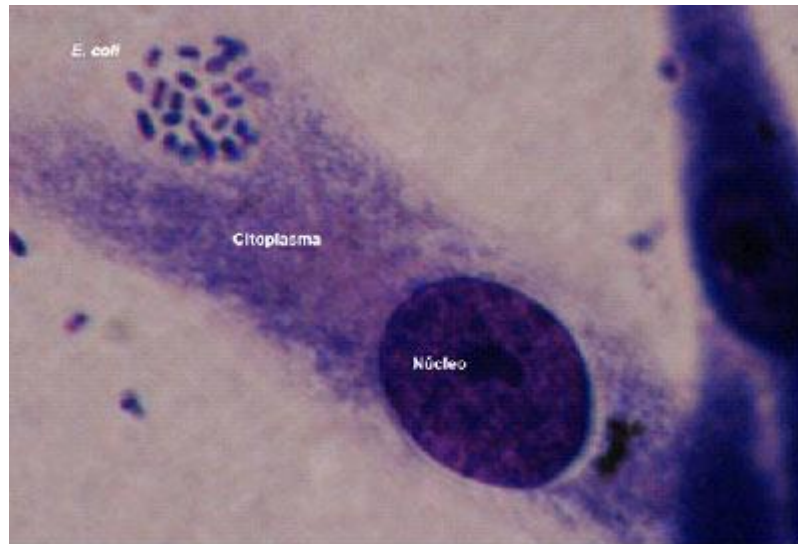
moléculas llamadas adhesinas, encargadas de reconocer a sus receptores sobre la superficie de las células uroepiteliales (Ulett, 2013). Fotografía 2.



**Fotografía 2.** Microscopía óptica de luz (100X), de un ensayo de adherencia bacteriana de 3 horas de incubación y teñido con Giemsa. Se aprecian los agregados bacterianos (flechas). N = núcleo; C = citoplasma. Imagen: Dr. José Molina, Fac, de Medicina, UNAM.

La cepa UPEC expresa ciertas proteínas después de la adherencia, esto les permiten internalizarse y multiplicarse dentro de las células uroepiteliales (invasión) y formar biopelículas (biocapas), por lo cual les brinda una gran ventaja para sobrevivir, les permite evadir la detección y eliminación por parte de los mecanismos de defensa inmunológicos. Las células uroepiteliales invadidas, en consecuencia, tienen bacterias que pueden actuar como un reservorio y causar infecciones recurrentes. La internalización de las bacterias a las células les permite además evitar el flujo de la orina a través de la vejiga y puede darles acceso a un ambiente más rico en nutrientes (Truls, 2011).

En la fotografía 3 se muestra una microscopía óptica de un ensayo de invasividad de protección con gentamicina de cepas UPEC en células uroepiteliales (de vejiga) y se observan las bacterias dentro del citoplasma de las células.



**Fotografía 3.** Microscopía óptica de luz de la línea celular T-24 (vejiga humana), después del ensayo de invasividad de protección con gentamicina. Se observan las bacterias internalizadas en el citoplasma. Imagen: Dr. José Molina, Fac. de Medicina, UNAM.

## 2.14 Tratamiento

Debido a que la administración de antibióticos en pacientes que padecen infección del tracto urinario es empírica, es imprescindible considerar la elevada resistencia de las cepas de *E. coli* uropatógenas a los antibióticos. Aunque los antibióticos son casi siempre efectivos para eliminar la infección de la vejiga, el tratamiento con antibióticos no necesariamente previene infecciones recurrentes en la misma persona a menos de que se eliminen las bacterias contaminantes del colon y del tracto vaginal (Consejo de salubridad general, 2009).

Para administrar eficazmente un antibiótico, es recomendable realizar una prueba de sensibilidad o antibiograma, que ayude al médico a elegir el antimicrobiano más efectivo contra el tipo de microorganismo que está causando la infección. La capacidad de *E. coli*

para adquirir genes de resistencia hace impredecible su sensibilidad a diferentes antibióticos, por ende, es recomendable realizar previas pruebas (Calderon, 2013).

Los mecanismos de acción de los antibióticos son diversos y a veces múltiples, pero todos operan en alguno de los siguientes puntos: Impidiendo la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas o de la pared celular o bien alterando la membrana celular de la bacteria sobre la que actúan (García, 1997).

### **2.15 Tipos de resistencia bacteriana a los antibióticos.**

La resistencia intrínseca (o natural) es una propiedad específica de las bacterias y su aparición es anterior al uso de los antibióticos, como lo demuestra el aislamiento de bacterias resistentes a los antimicrobianos, de una edad estimada de 2000 años encontradas en las profundidades de los glaciares de las regiones árticas de Canadá (Hart, 1988).

En el caso de la resistencia natural todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas ya pueden sobrevivir en caso de que se emplee ese antibiótico (Couvalin, 1994).

Otro tipo de resistencia es la resistencia adquirida; en una bacteria se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) y/o por la transmisión de material genético extra cromosómico procedente de otras bacterias (Hart, 1988). En el primer caso, la resistencia se transmite de forma vertical de generación en generación. En el segundo, la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético móvil como integrones y transposones; esto último no solo permite la transmisión de genes a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas (Guerra, 2000). De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con ellos.

La transferencia horizontal de material genético bacteriano es un fenómeno importante en el entorno sanitario, la transmisión de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia son un ejemplo clásico de transferencia horizontal. La transferencia horizontal en bacterias puede realizarse mediante tres procesos diferentes: transformación, transducción y conjugación.

El proceso de transformación refiere a la introducción de DNA exógeno (generalmente a manera de plásmidos) en las bacterias, y este DNA, pasa a ser parte del material genético, pudiendo ser heredado cuando ocurra la recombinación genética bacteriana (Wolska, 2003).

Por otro lado la transducción es la transferencia de genes de una bacteria a otra por medio de un virus. La incorporación de genes bacterianos al interior de la cápside de un fago se produce como consecuencia de errores cometidos durante el ciclo duplicativo del virus. Cuando el virus que contiene estos genes infecta a una nueva bacteria, y los transfiere al cromosoma bacteriano. La transducción es el mecanismo más frecuente de intercambio y recombinación genética en las bacterias (Wolska, 2003).

La conjugación consiste en la unión de dos bacterias de la misma o diferentes especies para la transferencia del material genético. Las bacterias se unen por medio de un puente citoplasmático llamado *Pili*, por el cual pasan los plásmidos a la célula receptora y así el plásmido de conjugación puede integrarse al cromosoma bacteriano (Llosa, 2005).

Es importante mencionar que el transporte de genes de resistencia se da a través de varios mecanismos como Transducción: transducción generalizada, transducción especializada, Conjugación, Transformación y Transposición (Madel *et al.*, 1994).

### **2.16 Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos**

Las bacterias como todos los seres vivos exhiben mecanismos biológicos para adaptarse a diversas presiones ambientales. Aunque la resistencia a los antibióticos es un proceso natural de la evolución y genética bacteriana, ciertos factores también contribuyen al aumento de la expresión y propagación de esta característica inherente. El incremento en el uso de antibióticos y la respectiva presión selectiva que ejercen, es el factor más importante que contribuye a la aparición de múltiples tipos de mecanismos de resistencia bacteriana (Ang *et al.*, 2004).

Durante los últimos años el uso indiscriminado de estos productos ha ocasionado que las bacterias dotadas de múltiples mecanismos (bioquímicos, genéticos-moleculares y celulares) desarrollen estrategias inherentes y adquiridas, que les permiten evadir con efectividad la

acción de estos compuestos. Se calcula que más de 50% de las prescripciones médicas de antibióticos en los hospitales, se ordenan sin pruebas claras de infección o sin una indicación médica adecuada (Linares y Martínez, 2004).

### **2.17 Principales mecanismos de resistencia a antibióticos por bacterias**

Los mecanismos de resistencia a antibióticos por bacterias se agrupan en tres categorías (Vignoli y Seija, 2006):

**1) Inactivación del antibiótico por enzimas:** La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico; el principal mecanismo de inactivación es la hidrólisis, tal como sucede con las betalactamasas y los betalactámicos. También existen enzimas no hidrolíticas que realizan acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes de aminoglucósidos y aunque no es su principal mecanismo de resistencia, también el cloranfenicol, las tetraciclinas y los macrólidos pueden ser inactivados por enzimas.

**2) Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana:** Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos en los anaerobios). En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente.

**3) Alteración por parte de la bacteria de su punto diana, impidiendo o dificultando la acción del antibiótico:** Este tipo de alteraciones se aprecia en la enzima DNA girasa (resistencia a quinalonas), en el ARNr 23S (macrólidos), en las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular que le confiere resistencia a los antibióticos betalactámicos. Por ende, un solo antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies de bacterias (Martínez, 1997).

#### **Alteraciones de la permeabilidad**

Las alteraciones de las membranas bacterianas se ven fundamentalmente en Gram negativos, donde la membrana externa de la envoltura celular rica en lípidos es impermeable a las sustancias hidrofílicas. De este modo dichas sustancias quedan confinadas a la



penetración a través de proteínas transmembranales con función de porinas. La disminución de la expresión de dichas porinas pueden disminuir el flujo de llegada del antibiótico al espacio periplásmico (Ayala, 1994).

De esta manera, los mecanismos de resistencia a antibióticos por las bacterias se basan en evitar que el antibiótico acceda a su diana y en la evolución han aparecido diversos mecanismos para que eso ocurra. En la figura 3 se esquematizan los 8 mecanismos de resistencia conocidos hasta la fecha y se realiza una breve descripción de estos mismos (Peleg, 2010):

### **1. Pérdida de porinas**

Las porinas son proteínas localizadas en la membrana de la bacteria encargadas de transportar sustancias al interior de la célula. Un mecanismo de resistencia a los carbapenemes por las bacterias consiste en la pérdida de las porinas que permitan su entrada.

### **2. Beta-lactamasas**

Las beta-lactamasas son proteínas con actividad enzimáticas que hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico, entre los que se incluyen antibióticos similares a la penicilina o la ampicilinas. Las bacterias que poseen estas enzimas son resistentes a este tipo de antibióticos.

### **3. Bombas de extrusión de antibióticos**

Algunas bacterias se seleccionan como resistentes a las quinolonas o el cloranfenicol produciendo elevados niveles de bombas de extrusión, que son proteínas transmembranales que permiten la exportación del antibiótico fuera de la célula mediante un gasto energético.

### **4. Enzimas que modifican químicamente antibióticos y los inactivan**

Algunas cepas bacterianas son capaces de producir enzimas que modifican químicamente el antibiótico evitando que éstos reconozcan su diana. Ese es el caso del ciprofloxacino, un antibiótico muy empleado en las infecciones de las vías urinarias.

## **5. Mutaciones en la diana específica del antibiótico**

Los antibióticos son moléculas capaces de interactuar con su diana molecular de forma análoga a como lo hace una llave en una cerradura. Mutaciones en la diana (cambios en la cerradura) hacen que el antibiótico (en este caso la llave) ya no sea capaz de reconocerla. Muchas de estas mutaciones implican la inactivación de la diana lo que hace que la célula no sea viable, sin embargo, otras células permiten que la diana del antibiótico funcione y no sea reconocida por el antibiótico. Por ejemplo la diana de las quinolonas son las enzimas encargadas de mantener el correcto plegamiento del ADN; la girasa y la topoisomerasa. Mutaciones en esas enzimas seleccionan a algunas bacterias resistentes a las quinolonas.

## **6. Mutaciones en los ribosomas**

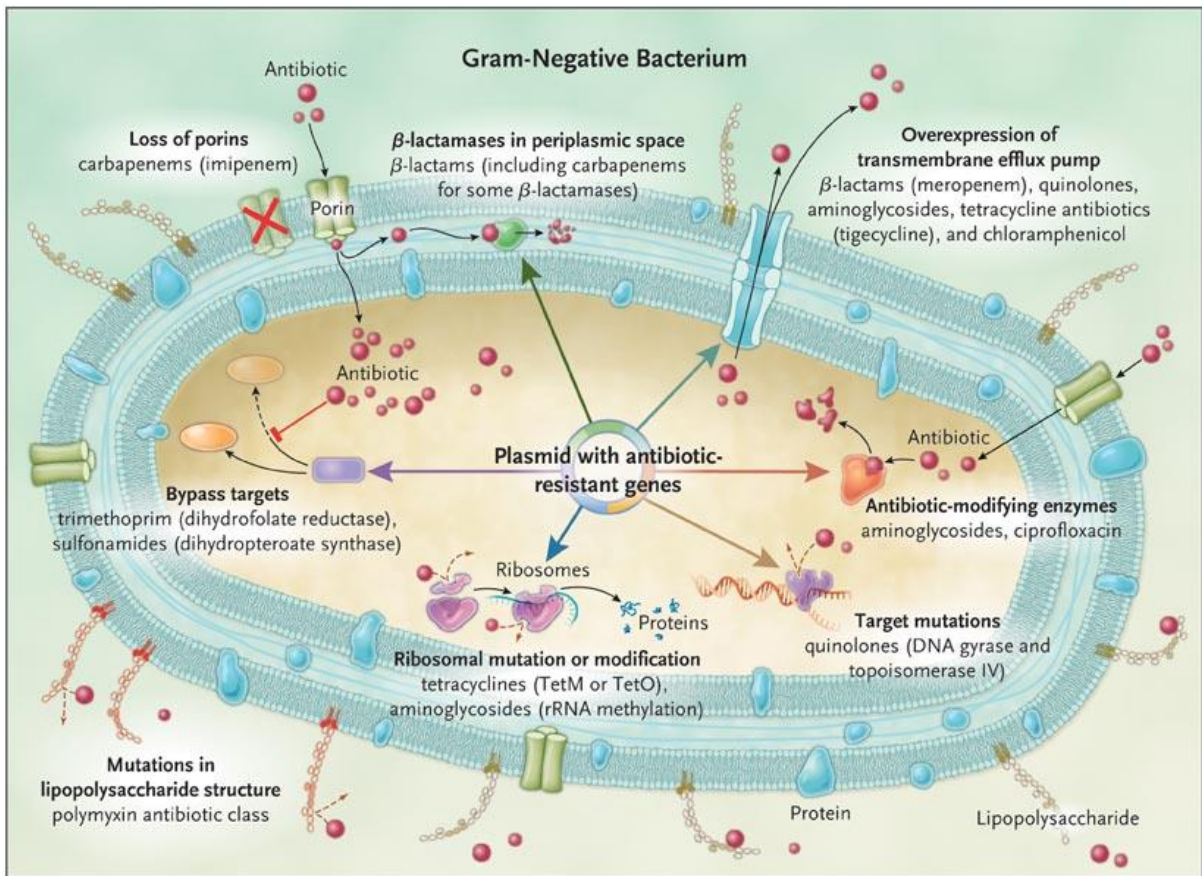
Los ribosomas son la maquinaria de síntesis de proteínas. Son estructuras complejas formadas por ARN y proteínas, y son dianas de algunos antibióticos como por ejemplo la tetraciclina que inhiben su correcto funcionamiento, y por tanto perturban o paralizan la síntesis proteica necesaria para la vida de la bacteria. Algunas cepas han desarrollado mutaciones en las regiones de interacción del antibiótico con el ribosoma, lo que los hace invisibles a estos compuestos.

## **7. Mutaciones en la estructura del lipopolisacárido (LPS)**

Los lipopolisacárido son un conjunto de polímeros complejos que forma parte de la membrana externa de las bacterias. Algunos antibióticos, como la polimixina, son capaces de interactuar con los LPS, desestabilizarlo e impedir su correcta síntesis. Mutaciones en la estructura del LPS impide la unión de la polimixina inhibiendo su acción.

## **8. Desvíos alternativos**

Algunos antibióticos son capaces de inhibir específicamente la actividad de algunas enzimas esenciales para la célula. Por ejemplo la sulfamida inhibe la dihidropteroato sintasa, un enzima esencial en la síntesis de ácido fólico que las bacterias necesitan para poderse dividir. Sin embargo algunas enzimas pueden mutar o bien otras son capaces de ganar la actividad enzimática perdida por la acción del antibiótico permitiéndole sobrevivir a la célula.



**Figura 3.** Publicada en el último número de New England Journal of Medicine en Mayo del 2010, ilustra los diferentes mecanismos que poseen las bacterias para resistir a los antibióticos.

## 2.18 Resistencia bacteriana a antibióticos

### Betalactámicos

La resistencia bacteriana frente a los betalactámicos representa un grave problema de salud para el tratamiento de las infecciones. La ampicilina es un beta-lactámico de espectro moderado, cuyo mecanismo de acción ocurre al interferir las últimas fases de la síntesis del peptidoglicano, componente necesario durante la formación de la pared bacteriana (Ivobe, 1997). Uno de los principales mecanismos de resistencia hacia los beta-lactámicos es la hidrólisis enzimática, que es debida a la presencia de “beta-lactamasas” que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo beta-lactámico, inactivando de esta manera el antibiótico antes de que genere cualquier efecto (Headberg, 1996).

Las bacterias desarrollan al menos tres mecanismos para seleccionarse como resistentes, que son independientes entre sí pero que pueden actuar sinérgicamente: alteración de las enzimas diana (PBPs), alteración de la membrana externa y producción de enzimas inactivantes (betalactamasas) (García, 1997).

Estas enzimas constituyen una amplia familia que según la clasificación de Bush 2010, se dividen en los grupos 1, 2 y 3, que a su vez están divididos en 16 subgrupos. El número de beta-lactamasas actualmente descrito es sumamente elevado, incrementándose de manera continua (Lahey, 2011). Dentro de las más de 890 beta-lactamasas que actualmente se han caracterizado, las familias de genes más comunes dentro de las enterobacterias son: *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*OXA-1 y *bla*CARB. Las dos primeras pertenecientes al grupo 2b, es decir son penicilasas, inhibidas por el ácido clavulánico y que en algunos casos también tienen acción contra cefalosporinas de tercera generación. En el caso de *bla*OXA-1, pertenece al grupo 2d donde están las penicilinasas que se caracterizan por la hidrólisis de cloxacilina (oxacilina); por su parte *bla*CARB pertenece al grupo 2c, el cual se caracteriza por tener penicilinasas con acción hidrolítica contra carbenicilina (Bush, 2010).

La producción de enzimas inactivantes es sin duda el mecanismo más importante de los betalactámicos, ya que la adquisición de betalactamasas (plasmídicas o cromosómicas), es la causa más frecuente de resistencia bacteriana. Las betalactamasas plasmídicas de Gram negativos producen alto nivel de resistencia y están muy extendidas sobre todo entre las enterobacterias, algunas son de espectro amplio y confieren resistencia total a los antibióticos betalactámicos (Gomez 1992).

### **Quinolonas**

El mecanismo de acción de las quinolonas es inhibir la actividad de las topoisomerasas tipo II (ADN girasa y topoisomerasa IV). En bacterias Gram-negativas la ADN girasa, es el blanco principal mientras que la topoisomerasa IV actuaría como diana secundaria. La ADN girasa es una enzima compuesta por cuatro subunidades dos tipo A y dos tipo B codificadas por *gyrA* y *gyrB* respectivamente, y que es la encargada de catalizar el súper enrollamiento negativo del ADN (Muñoz, 1997).

Entre los mecanismos moleculares de resistencia a estos antibióticos se encuentran las alteraciones en los blancos de quinolonas, las bombas de expulsión activa y la transferencia de genes de resistencia plasmídicas. El mecanismo mayormente descrito es el primero, donde mediante una mutación puntual, hay un cambio en el codón 83 y se codifica otro aminoácido de manera que se modifica la enzima blanco, con lo que se logra una alta resistencia a quinolonas como el ácido nalidíxico (Ruiz, 2003).

La alta resistencia hacia fluoroquinolonas, tales como la ciprofloxacina, se relaciona con más de una mutación a nivel de *gyrA* (normalmente además de la posición 83 se afecta la posición 87) o con mutaciones además en *gyrA* a nivel de otros genes como *parC* (codones 80 o 84 de manera usual). A lo largo de los años se han informado las posiciones en donde ocurren las mutaciones y los cambios de aminoácidos que conlleva cada mutación (Lautenbach, 2010), que están resumidas en la Tabla 1.

Codón <sup>1</sup> /Gen	Aminoácido silvestre	Mutaciones descritas
gyrA <sup>2</sup>		
51.2 <sup>2</sup>	Ala	Val
67.2	Ala	Ser
81 <sup>2</sup>	Gly	Cys, Asp
82	Asp	Gly
83	Ser	Leu, Trp, Ala, Val
84	Ala	Pro, Val
87	Asp	Asn, Gly, Val, Tyr, His
106 <sup>2</sup>	Gln	Arg, His
gyrB		
426	Asp	Asn
447	Lys	Glu
parC		
78	Gly	Asp
80	Ser	Ile, Arg
84	Glu	Lys, Val, Gly
parE		
445	Leu	His

**Tabla 1.** Adaptado de: Ruiz J. 1 Las mutaciones en otros codones, como en el codón 93 han sido descritas, pero su papel en el desarrollo de resistencia no está claro. 2 Solo descritas en mutantes in vitro.

Otro tipo de mecanismos de resistencia a quinolonas es el relacionado con la transferencia de genes mediante plásmidos, como es el caso de los genes *qnr* que codifican a la familia de las proteínas Qnr (QnrA, QnrB, QnrS, QnrC y QnrD) que se unen a la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) y a la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) disminuyendo la acción de las quinolonas (Jacoby, 2008).

Clásicamente, el rol de las bombas de expulsión ha sido considerado como accesorio y, en general, de baja relevancia, no obstante, obstante cada vez se da más importancia a la presencia de mecanismos de expulsión que impiden alcanzar concentraciones intracelulares de antibiótico suficientes o dificultan el paso a través de la pared bacteriana (Lahey, 2011).

Se ha comprobado que, para el caso del ácido nalidíxico las bombas de expulsión cumplen una función importante en el nivel basal de resistencia a este antimicrobiano. Un ejemplo de este tipo de mecanismo descrito en *Escherichia coli* es el gen *QepA*, que codifica una bomba de expulsión para fluoroquinolonas hidrofílicas tales como norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino (Nicolás, 2008). Este gen ha sido descrito en cepas de *E. coli* de México en una frecuencia de 1,7 % (Silva, 2011).

## **Tetraciclinas**

Las tetraciclinas son una familia de antibióticos cuyo mecanismo de acción ocurre al unirse a la parte 16S, de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, de manera que se inhibe la síntesis de proteínas al evitar la unión del aminoacil-tRNA en la posición A del ribosoma (Chopra, 2001). La tetraciclina se ha utilizado durante décadas no solo en el tratamiento a humanos sino también en el tratamiento veterinario y como factor de crecimiento en aves (Karami, 2006). El mecanismo de resistencia más común hacia este antibiótico es mediante sistemas de eflujo, en los Gram negativos son codificados por los genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetI* y *tetY*, todos ellos previamente informados en *E. coli*. Sin embargo, existen otros mecanismos de resistencia como protección ribosomal y acción enzimática sobre las tetraciclinas codificados por diferentes genes (Levy, 1999).

Un estudio llevado a cabo en cepas de *E. coli* comensales aisladas de infantes (Suecia), muestra que *tetB* y *tetA* fueron los genes de resistencia a tetraciclinas más prevalentes, 51 y 49 % respectivamente en un total de 37 cepas (Karami, 2006). Lo cual es importante debido a que las tetraciclinas no se utilizan en niños, sin embargo, estos genes fueron identificados

en bacterias de la flora intestinal que están sirviendo de reservorio para la selección de resistencia antibiótica. En el estudio de Mosquito *et al*, (2010) realizado en un total de 106 cepas de *E. coli* peruanas, se observó que *tetA* se encontró en el 26.4 % de las cepas, mientras que *tetB* estuvo presente en el 17.9 % de las cepa.

## **Cloranfenicol**

El cloranfenicol es utilizado en el tratamiento de las infecciones en humanos y animales, al ser un antimicrobiano de amplio espectro con acción sobre bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, clamidias, micoplasmas y Rickettsias. Su mecanismo de acción es un fuerte y específico inhibidor de la biosíntesis de las proteínas, al prevenir la elongación de la cadena de péptidos uniéndose de manera reversible al centro de la peptidil tranferasa del ribosoma 70S (Schwarz, 2004).

Dentro de los mecanismos de resistencia a cloranfenicol, el más frecuente es el de la inactivación enzimática por acetilación mediante los diferentes tipos cloranfenicol acetiltransferasas (CAT) descritos. Estas CAT se dividen en dos tipos: tipo A y tipo B por sus diferencias en sus secuencias de aminoácidos. Además la resistencia a cloranfenicol puede estar mediada por sistemas de exportadores específicos para cloranfenicol y florfenicol (su derivado), relacionados con genes como *cmIA* y *floR* (Mandomando, 2009).

Cuanto más factores de virulencia expresa una cepa, más grave es la infección que pueden causar. Algunos factores de virulencia favorecen específicamente el desarrollo de infecciones del tracto urinario, esto contribuye a que el tratamiento de las infecciones ocasionadas por cepas UPEC se complique debido a la selección de cepas resistentes a los antibióticos (Svanborg, 1997).

Entre los principales genes que codifican resistencia para antibióticos se encuentran: estreptomicina (*aadA1*), gentamicina (*aac(3)-IV*), sulfonamida (*sul1*), Beta-lactamasas (*blaSHV* y *CITM*), cloranfenicol (*catI* y *cmIA*), tetraciclinas (*tetA* y *tetB*), Trimethoprim (*dfpA1*) y Quinolonas (*qnr*).



### **3. JUSTIFICACION**

Debido al incremento de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos por cepas UPEC en nuestro país, el propósito de este trabajo fue identificar los diferentes genotipos que codifican para la resistencia a los antibióticos en un grupo de cepas UPEC aisladas de pacientes con infecciones urinarias.

#### 4. ANTECEDENTES

- Momtaz *et al.*, en el 2013 identificaron en 123 cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con UTIs un grupo de genes de resistencia a antibióticos, encontrando una frecuencia de 46.3%, 22.7% y 27.6% en los genes *qnr*, *aac(3)-iv* y *blaSHV* respectivamente. En el mismo trabajo se detectó que la resistencia más elevada fue para los genes de tetraciclina *tet(A)* y *tet(b)* con el 73.9%, en cada caso.
- Sáenz en el 2004 analizaron 13 cepas de *Escherichia coli* (5 aisladas de humanos y 8 de animales), describiendo que los genes que codifican para resistencia a tetraciclina (*tet(a)* y *tet(b)*) se detectaron en todas las cepas, el gen para estreptomicina (*aadA1*) se encontró en 2 cepas de origen humano, mientras que el gen de beta-lactamasa *blaSHV* no se identificó en ninguna de las cepas.
- Thi Thu *et al.*, (2008) realizaron un estudio para detectar la resistencia a los antimicrobianos en 99 cepas de *Escherichia coli* aisladas de alimentos. El 84% de las cepas fue resistentes a uno o más antibióticos. La resistencia bacteriana se observó con mayor frecuencia frente a la tetraciclina (77.8%), sulfafurazol (60.6%), ampicilina (50.5%), trimetoprim (51.5%), cloranfenicol (43.4%) y estreptomicina (39.4%).
- En el 2007 Gómez y colaboradores realizaron un estudio de susceptibilidad a antibióticos en 2,312 cepas de *E. coli* aisladas de urocultivos provenientes de comunidades intra y extrahospitalarias en Bogotá. Estos autores describieron que la resistencia de las cepas de *E. coli* a trimetoprim-sulfametoxazol, quinolonas (ciprofloxacina), ampicilina y ampicilina-sulbactam fue del 43.4%, 31.4%, 51.9%, 32.2%, respectivamente. Los Antibióticos con bajos porcentajes de resistencias fueron para nitrofurantoína (1.7%), cefalosporinas de primera (8.76%), segunda (7.5%) y tercera generación (2.1%).
- Lopez y colaboradores en el 2009 determinaron en cepas de *Escherichia coli* la resistencia a tetraciclina, estreptomicina y gentamicina, para lo cual tomaron y analizaron 51 muestras de agua y 23 muestras de suelo en cuatro regiones del Valle de Culiacán, Sinaloa, México. En las muestras de suelo analizadas hubo ausencia

de *E. coli*, mientras que en las muestras de agua analizadas, el 98 % estaban contaminadas con mínimos de 4 UFC/100 mL. De las 46 cepas de *E. coli* analizadas, 9 fueron resistentes a tetraciclina, 38 fueron resistentes a estreptomicina y sólo una cepa fue resistente a gentamicina, mientras que 23 cepas presentaron resistencia intermedia.

- Betran y colaboradores en el 2013 estudiaron cepas de *E. coli* uropatogenas aisladas de urocultivos de pacientes procedentes de Atención Primaria del Sector de Barbastro desde el 1 de enero de 2011 al 31 de diciembre de 2013, donde se determinó la resistencia *in vitro* a diferentes antibióticos. Estos autores describieron que *E. coli* fue identificada en el 61.08% del total de los urocultivos positivos enviados desde Atención Primaria. En cuanto a la resistencia a los antibióticos por *E. coli* como fosfomicina y nitrofurantoína, la resistencia fue menor al 4%, mientras que en cefalosporinas de segunda y tercera generación la resistencia fue del 10%. La resistencia frente a amoxicilina-clavulánico fue del 21.5%, mientras que el 30% de las cepas fue resistente a trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacino y ampicilina.
- Karami y colaboradores en el 2006 detectaron los genes de resistencia a tetraciclina en cepas de *E. coli* intestinales obtenidas de 128 bebés suecos con cultivos fecales. El 12% de las cepas fue resistente a tetraciclina, el 50% fue portadora del gen *tet(A)* y 42% de *tet(B)*.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecularmente los diferentes grupos de genes que codifican para resistencia a los antibióticos en un grupo de cepas de *Escherchia coli* uropatógenas.

### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar las cepas de *E. coli* de los urocultivos por PCR convencional.
2. Detectar por PCR sencillo y mutiplex los genes que codifican para la resistencia a estreptomicina (*aadA1*), gentamicina (*aac(3)-IV*), sulfonamida (*sul1*), Beta-lactamasas (*blaSHV* y *CITM*), cloranfenicol (*catI* y *cmIA*), tetraciclinas (*tetA* y *tetB*), Trimetoprim (*dfrAI*) y Quinolonas (*qnr*) en las cepas UPEC.
3. Establecer los diferentes patrones de asociación de los genes que codifican para resistencia a los antibióticos en las cepas de *Escherchia coli* uropatógenas.

## **6. MATERIALES Y METODOS**

### **6.1 Origen de las cepas**

Para el desarrollo de este estudio se estudiaron 194 cepas de *E. coli* previamente aisladas de urocultivos a pacientes que acudieron al Hospital No. 72 del IMSS y a la Clínica Tequesquihuac, ubicadas en el municipio de Tlalnepantla, Edo. de México, por presentar signos y síntomas de infecciones del tracto urinario (UTIs).

Las cepas fueron resembradas por medio de asas estériles en medios de cultivo de agar EMB (Eosina-azul de metileno) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Las cepas de *E. coli* fueron identificadas por las pruebas de indol, utilizando medio de cultivo SIM y rojo de metileno en medio MR-VP.

### **6.2 Extracción de DNA bacteriano**

El DNA fue extraído mediante el método de ebullición. Para lo cual con la ayuda de un asa estéril se tomaron varias colonias de las cepas de *E. coli* crecidas en agar nutritivo a 37°C durante 24 h y se depositaron en tubos de rosca de 16 x 150 que contenían 2 ml de agua desionizada estéril. Las muestras se agitaron en un vortex por 20 segundos y posteriormente se llevaron a baño maría por 20 minutos. Posteriormente los tubos se incubaron en hielo por 10 min. Finalmente 1.5 mililitros de cada muestra fueron depositados en tubos eppendorf estériles y al término centrifugados a 14,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante que contenía el DNA bacteriano fue separado en otro tubo eppendorf y se guardó a -20°C hasta su utilización.

### **6.3 Identificación de las cepas de *E. coli* por PCR**

Las cepas de *E. coli* fueron identificadas por PCR convencional mediante la amplificación del gen 16SrRNA (Momtaz, 2013). Para lo cual el volumen final de la mezcla de reacción fue de 20 µl; 10µl de Kapa Taq Ready Mix™, 1µl de cada oligonucleótido Forward y Reverse (Tabla 2, 10pmol) (Integrated DNA Technologies™), 3µl de DNA y 5 µl de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de desnaturalización de 95°C por 30 segundos, alineación de 55°C por un minuto y una extensión de 72°C por 60 segundos. Finalmente una extensión final de 5 minutos a 72°C.

La identificación de los genes *sul1*, *BlaSHV*, *catI*, *acc(3)-Iv*, *CITM*, *CmlA* y tetraciclina (*tet-A* y *tet-B*) se realizó por PCR multiplex tal y como lo describe Van *et al.*, (2008). El volumen final por mezcla de reacción fue de 25 microlitros: 10 microlitros de Kapa Taq Ready Mix™, 10 microlitros de agua libre de nucleasas, 1 microlitro de cada primer (Tabla 2, Forward y Reverse) y 3 microlitros del DNA bacteriano. Las condiciones de amplificación para estos genes fueron: desnaturalización inicial de 95°C por 7 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, alineación de 56°C por 30 segundos y extensión de 72°C por 1 minuto. Finalmente se realizó una extensión final de 72°C por 7 minutos.

Los genes *addAI* y *qnr* (Tabla 2) se identificaron por PCR multiplex siguiendo las condiciones propuestas por Mammeri *et al.*, (2005), en donde las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial de 95°C por 7 minutos, 30 ciclos de desnaturalización de 95°C por 30 segundos, alineación de 55-58°C por 30 segundos, extensión de 72°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

El gen *dfra* se identificó de acuerdo a lo descrito por Toro *et al.*, (2005), para lo cual se utilizaron 10 microlitros de la Kapa Taq Ready Mix™, 5 microlitros del agua libre de nucleasas, 1 microlitro de cada primer y 3 microlitros del DNA bacteriano. Las condiciones de la amplificación fueron; desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos de desnaturalización de 92°C por 30 segundos, una alineación de 50°C por 30 segundos, extensión de 72°C por un minutos y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

ANTIBIÓTICO	GEN	SECUENCIA	TAMAÑO DEL AMPLICÓN (pb)
	<i>16SrRNA</i>	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CCGTCAATTCATTTGAGTTT	919
<b>Estreptomina</b>	<i>aadA1</i>	TATCCAGCTAAGCGGAACT ATTTGCCGACTACCTTGGTC	447
<b>Gentamicina</b>	<i>aac(3)-IV</i>	CTTCAGGATGGCAAGTTGGT TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	286
<b>Sulfonamida</b>	<i>sul1</i>	TTCGGCATTCTGAATCTCAC ATGATCTAACCCCTCGGTCTC	822
<b>Beta-lactamasa</b>	<i>blaSHV</i>	TCGCCTGTGTATTATCTCCC CGCAGATAAATCACCACAATG	768
<b>Beta-lactamasa</b>	<i>CITM</i>	TGGCCAGAAGTACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462
<b>Cloranfenicol</b>	<i>cat1</i>	AGTTGCTCAATGTACCTATAACC TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	547
<b>Cloranfenicol</b>	<i>cmlA</i>	CCGCCACGGTGTTGTTGTTATC CACCTTGCCTGCCCATATTAG	698
<b>Tetraciclina</b>	<i>tet(A)</i>	GGTTCACCTCGAACGACGTCA CTGTCCGACAAGTTGCATGA	577
<b>Tetraciclina</b>	<i>tet(B)</i>	CCTCAGCTTCTCAACGCGTG GCACCTTGCTGATGACTCTT	634
<b>Trimetoprim</b>	<i>dfrA1</i>	GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC	367

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de resistencia a antibióticos en las cepas UPEC.

#### **6.4 Electroforesis en geles de agarosa**

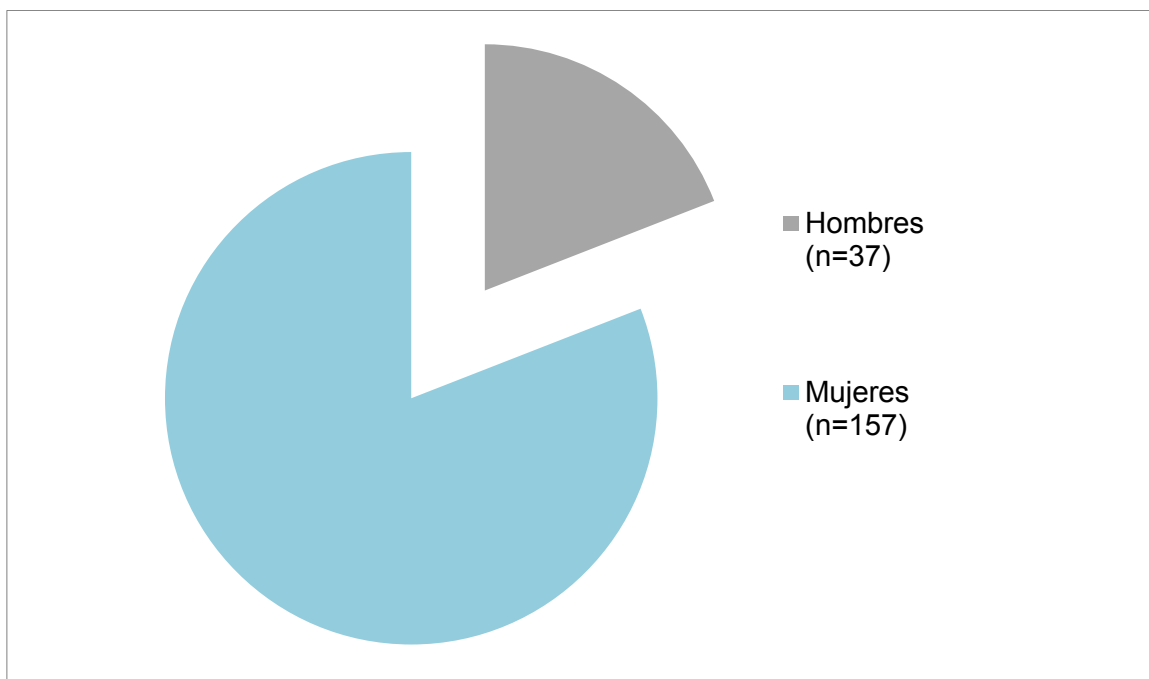
Los amplicones obtenidos de la PCR fueron analizados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%. Por cada 100 ml de agarosa se adicionó 1 microlitro de Midori Green (BIORAD). Las condiciones de corrimiento fueron: 120 volts, 94 miliampers por un tiempo de 30 minutos. El tamaño del amplicón fue comparado con marcadores de tamaño molecular de 100 pares de bases. Los geles fueron analizados bajo luz UV y fotografiados con el sistema de foto documentación GEL LOGIC 100 (KODAK).



## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Pacientes estudiados**

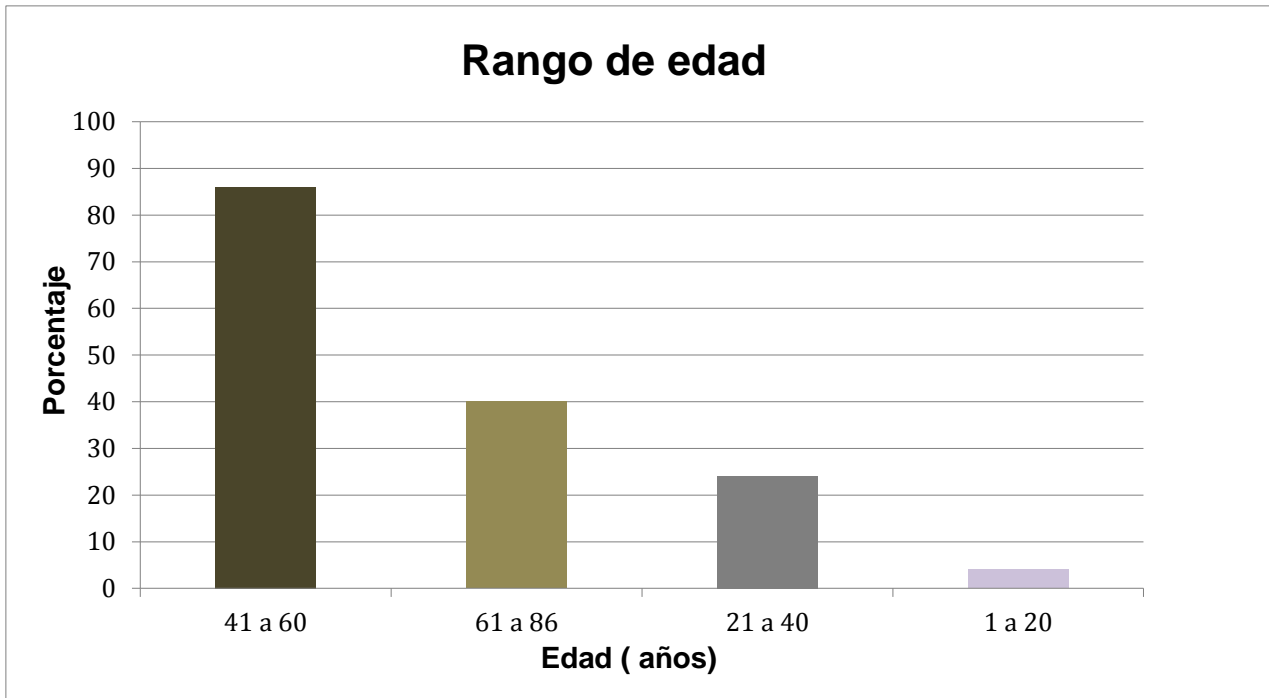
En la Gráfica 1 se observa la distribución de los pacientes por sexo (n=194). El 80.9% (n=157) de los pacientes positivos para *E. coli* correspondió a mujeres y el 19.1% (n=37) restante a hombres (Gráfica 1).



**Gráfica 1.** Distribución de los pacientes por sexo.

### **7.2 Edad de los pacientes**

El rango de edad más abundante fue el de 41 a 60 años con un 56% (n=86), seguido por el de 61 a 86 años con el 26% (n=40), de 21 a 40 años con 16% (n=24) y de 1 a 20 años con el 2% (n=4). En 40 pacientes no se determinó su edad (Gráfica 2).



**Grafica 2.** Distribución de los pacientes por rango de edad.

### 7.3 Diagnóstico de los pacientes estudiados

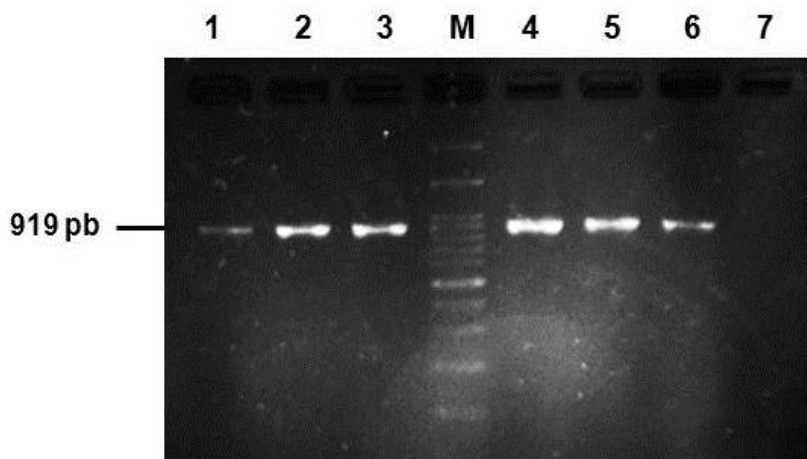
En la tabla 3 se observa el diagnóstico clínico de los 194 pacientes positivos para *E. coli*. El diagnóstico más frecuente fue el de la infección de vías urinarias con el 95.3% (n=185), seguido por pielonefritis, urosepsis e infección vaginal con el 1% (n=2), en cada caso, y de lupus eritomatoso, cervicovaginitis y litiasis renal con el 0.5% (n=1), en cada caso.

<b>Diagnóstico</b>	<b>Número (n=194)</b>	<b>%</b>
Infección de vías urinarias	185	95.3
Pielonefritis	2	1.0
Urosepsis	2	1.0
Infección vaginal	2	1.0
Lupus eritematoso	1	0.5
Cervicovaginitis	1	0.5
Litiasis renal	1	0.5

**Tabla 3.** Diagnóstico clínico de los pacientes estudiados.

#### 7.4 Identificación de *E. coli* por PCR convencional

*Escherichia coli* se identificó en el 100% (n=194) de las muestras provenientes de los pacientes con infecciones de vías urinarias por PCR mediante la amplificación del gen 16SrRNA (Fotografía 4).



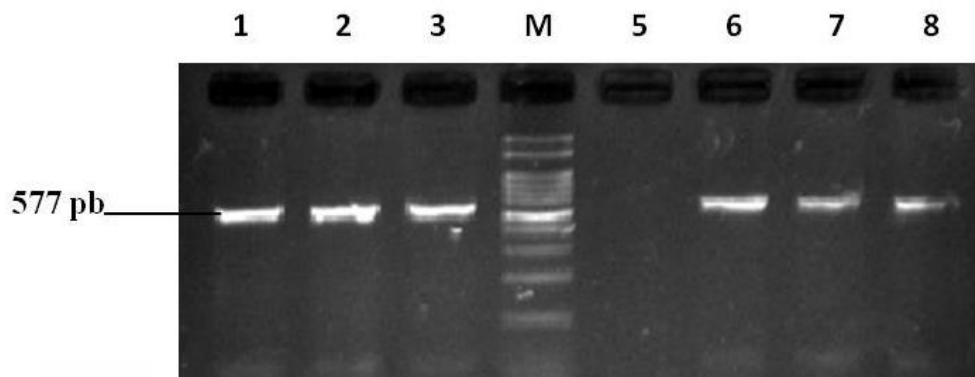
**Fotografía 4.** Identificación de las cepas de *E. coli* por PCR mediante la amplificación del gen 16SrRNA. Carriles 1-3 y 4-5 cepas *E. coli*. Carril 6, control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). Carril 7, control negativo (sin DNA molde). M Marcador de tamaño molecular de 100 pb.

#### 7.5 Detección de genes que codifican resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* uropatógenas

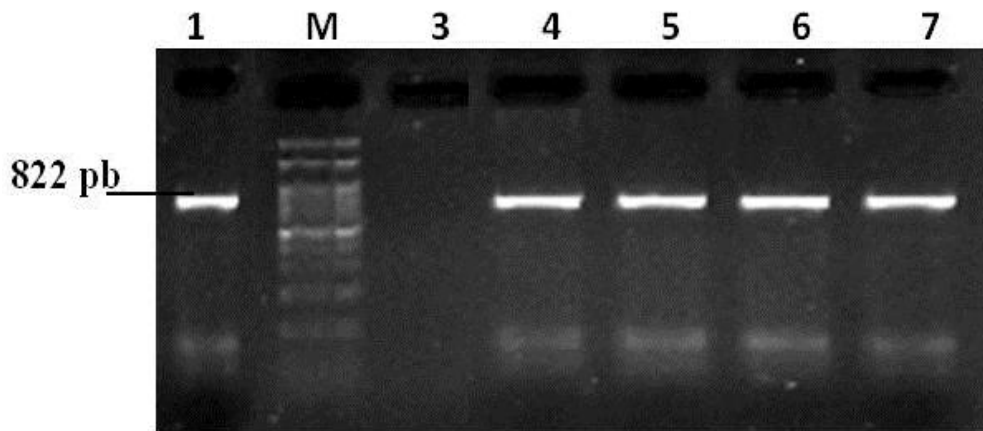
En el presente trabajo se estudiaron 11 genes que codifican resistencia a antibióticos en las cepas de *E. coli*. Únicamente 8 genes fueron identificados en las 194 cepas (Tabla 4). Los genes con mayor frecuencia fueron *tet(A)* (fotografía 5), *sul1* (fotografía 6) y *tet(B)* (fotografía 7) con 33.5%, 30.9% y 17.0% respectivamente; seguido de *dfrA1* (fotografía 8) con 12.3%, *cat1* (fotografía 9) con 11.8%, *cmlA* (fotografía 10) con 4.1%, *CITM* (fotografía 11) con 3.0% y *aadAI* (fotografía 12) con 2.0%. Mientras que los genes *aac(3)-IV*, *blaSHV* y *qnr* no fueron detectados en ninguna de las cepas.

Gen	Numero de cepas	Porcentaje
<i>aadA1</i>	4	2.0
<i>aac(3)-IV</i>	0	0
<i>sul1</i>	60	30.9
<i>blaSHV</i>	0	0
<i>CITM</i>	6	3.0
<i>cat1</i>	23	11.8
<i>cmlA</i>	8	4.1
<i>tet(A)</i>	65	33.5
<i>tet(B)</i>	33	17.0
<i>dfrA1</i>	24	12.3
<i>qnr</i>	0	0

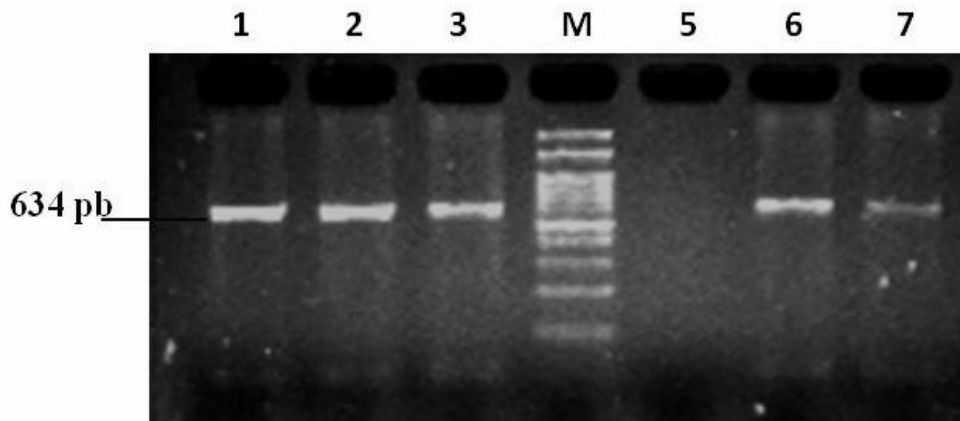
**Tabla 4.** Porcentaje de genes que codifican para resistencia a antibióticos en las cepas uropatógenas de *E. coli*.



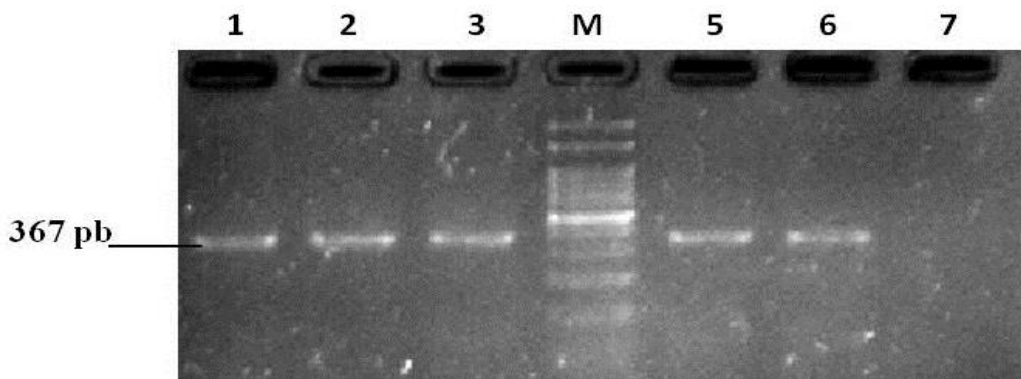
**Fotografía 5.** Detección del gen *tet(A)* (577 pb) en cepas de *E. coli*. Carriles 1-3 y 6-7, cepas positivas. Carril 5, Control negativo (sin DNA molde). Carril 8, Control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). M, Marcador de tamaño molecular de 1000 pb.



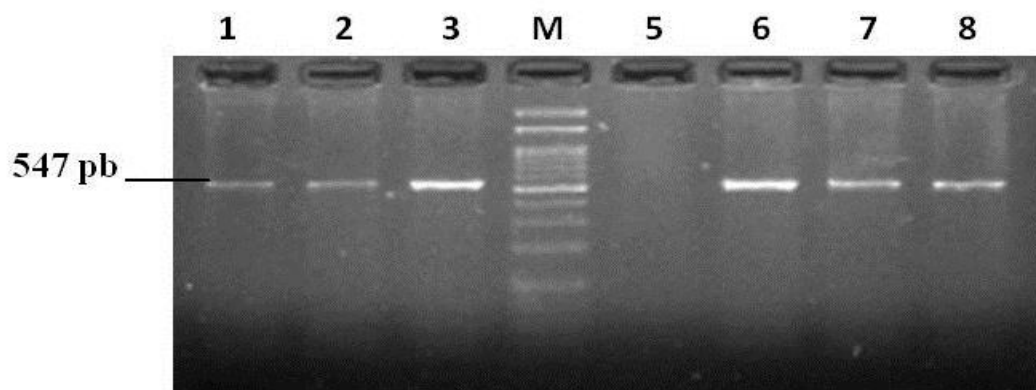
**Fotografía 6.** Detección del gen *sul1* (822pb) en cepas de *E. coli*. Carriles 4-7, cepas positivas. Carril 3, Control negativo (sin DNA molde). Carril 1, Control Positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). M, Marcador de tamaño molecular de 1000 pb.



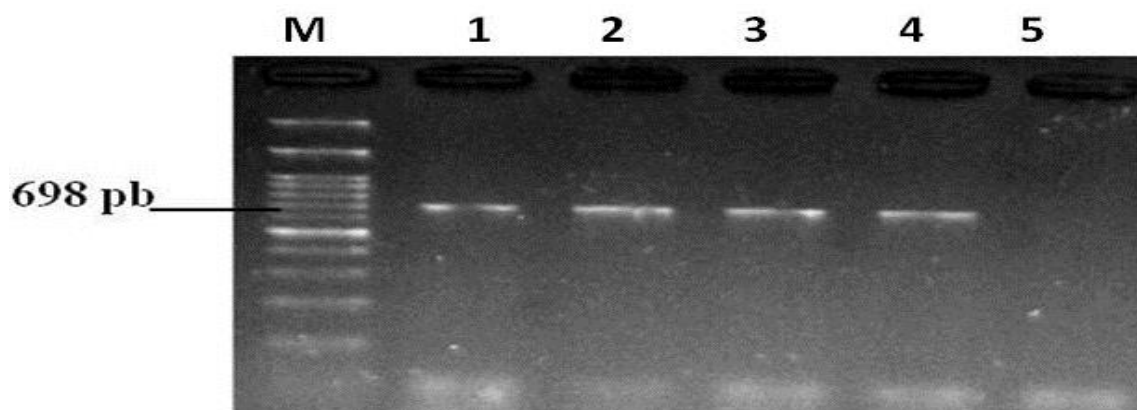
**Fotografía 7.** Detección del gen *tet(B)* (634pb) en cepas de *E. coli*. Carriltes 1-3 y 6, cepas positivas. Carril 5, Control negativo (sin DNA molde). Carril 7, Control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). M, Marcador de tamaño molecular de 1000 pb.



**Fotografía 8.** Detección del gen *dfrA1* (367 pb) en cepas de *E. coli*. Carriltes 2-6, muestras positivas. Carril 7, Control negativo (sin DNA molde). Carril 1, Control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). M, Marcador de tamaño molecular de 1000 pb.

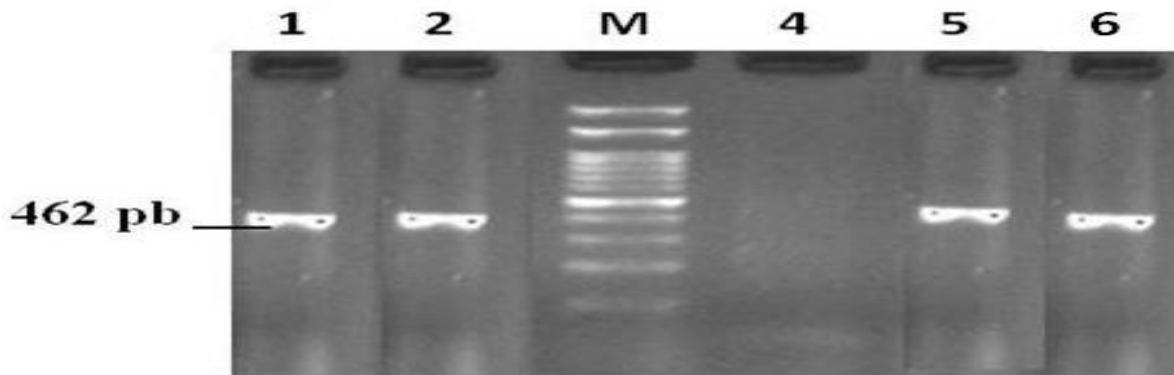


**Fotografía 9.** Detección del gen *cat1* (547pb) en cepas de *E. coli*, carriles 1-3 y 6-7 cepas positivas. Carril 5, Control negativo (sin DNA molde). Carril 8, Control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). M, Marcador de tamaño molecular de 1000 pb.

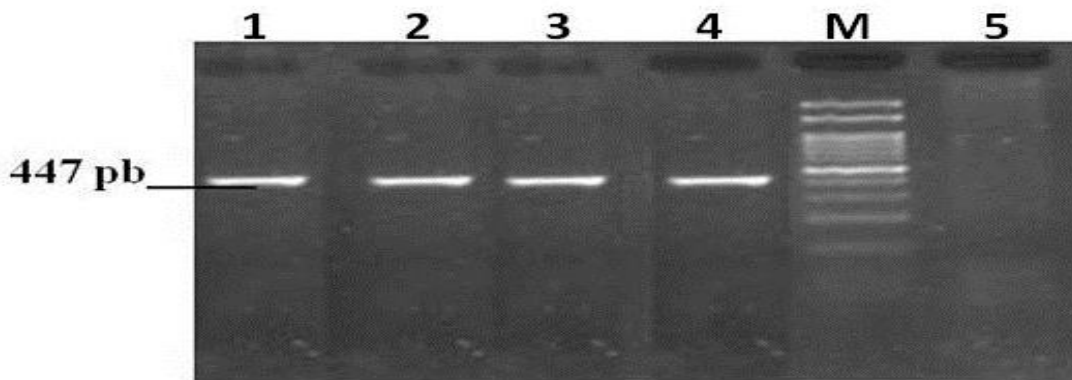


**Fotografía 10.** Detección del gen *cmIA* (698 pb) en cepas de *E. coli*. Carriles 1-3, cepas positivas. Carril 5, Control negativo (sin DNA molde). Carril 4, Control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). M, Marcador de tamaño molecular de 1000 pb.





**Fotografía 11.** Detección del gen *CITM* (462 pb) en cepas de *E. coli*. Carriles 1-2 y 5, cepas positivas. Carril 4, Control negativo (sin DNA molde). Carril 6, Control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI) carril 7. M, Marcador de tamaño molecular de 1000 pb.



**Fotografía 12.** Detección del gen *aadA1* (447 pb) en cepas de *E. coli*. Carriles 1-3, cepas positivas. Carril 5, Control negativo (sin DNA molde). Carril 4, Control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). M, Marcador de tamaño molecular de 1000 pb.

### 7.8 Patrones de genes que codifican para resistencia a antibióticos en las cepas UPEC.

En la tabla No. 5 se muestran los patrones de asociación de los genes que codifican para resistencia a antibióticos en las cepas UPEC. Se detectaron 21 patrones de asociación de los distintos genes, dentro de los cuales el patrón con mayor número de cepas fue *sul1-tet(A)* con el 10.8% (n= 21), seguido por *sul1-dfrAl* con el 3.0% (n=6), *sul1-tet(B)* con el 2.5% (n=5), *sul1-tet(A)-catI* con el 2.0% (n=4), *tet(B)-catI* y *catI-sul1* con el 1.5% (n=3), en cada caso, *tet(B)-*

*dfrAl*, *tet(A)-dfrAl* y *catI- dfrAl* con el 1.0% (n=2), en cada caso El resto de los patrones solo se presentaron una vez, con 0.5% (n=1).

El patrón No. 1 presentó la mayor asociación, con 4 genes de resistencia (*sul1-catI-tet(A)-tet(B)*), seguido de los patrones 2-6 y 8 con los genes *sul1-tet(A)- dfrAl*, *sul1-tet(A)-catI*, *sul1-tet(A)-cmlA*, *tet(B)-catI-CITM*, *tet(A)-Sul1-CITM* y *tet(B)-cmlA-CITM* respectivamente. La menor asociación se registró entre los patrones número 7 a 21, con solo dos genes cada uno.

Numero de Patrón	Patrón	Numero de cepas	Porcentaje
1	<i>sul1-catI-tet(A)-tet(B)</i>	1	0.5
2	<i>sul1-tet(A)- dfrAI</i>	1	0.5
3	<i>sul1-tet(A)-catI</i>	4	2.0
4	<i>sul1-tet(A)-cmlA</i>	1	0.5
5	<i>tet(B)-catI-CITM</i>	1	0.5
6	<i>tet(A)-Sul1-CITM</i>	1	0.5
7	<i>tet(A)-CITM</i>	1	0.5
8	<i>tet(B)-cmlA-CITM</i>	1	0.5
9	<i>sul1-tet(A)</i>	21	10.8
10	<i>sul1- dfrAI</i>	6	3.0
11	<i>sul1-tet(B)</i>	5	2.5
12	<i>tet(B)-dfrAI</i>	2	1.0
13	<i>tet(B)-catI</i>	3	1.5
14	<i>catI-Sul1</i>	3	1.5
15	<i>tet(A)- catI</i>	1	0.5
16	<i>catI- cmlA</i>	1	0.5
17	<i>tet(A)-tet(B)</i>	1	0.5
18	<i>tet(A)- dfrAI</i>	2	1.0
19	<i>tet(A)-cmlA</i>	1	0.5
20	<i>catI- dfrAI</i>	2	1.0
21	<i>catI- CITM</i>	1	0.5

**Tabla 5.** Patrones de genes que codifican la resistencia a antibióticos en cepas uropatógenas de *E. coli*.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Pacientes estudiados

En este trabajo se encontró que las cepas UPEC fueron las responsables de 194 casos de un total de 320 pacientes con infecciones del tracto urinario (UTIs) atendidos en el Hospital General Regional No. 72 y la Clínica de Tequesquihuac, Edo. de México. Se ha descrito que las cepas de *E. coli* uropatógenas ocasionan el 95.3 % de las infecciones urinarias, en cuyo caso en el 2010 se reportaron 1,204,032 casos de UTIs por *E. coli* en adultos de 25 a 44 años de edad, con una tasa de incidencia de 3000 por cada 100,000 habitantes, mientras que en mayores de 60 años la tasa de incidencia fue de 6000 por cada 100,000 habitantes, con predominio en el sexo masculino (información epidemiológica de morbilidad, 2009).

El hecho de que en este trabajo se haya encontrado que la mayoría de los pacientes con UTIs fueron mujeres (80%, Gráfica 1), puede deberse a que las infecciones del tracto urinario en mujeres son más frecuentes debido a la vecindad de los tres orificios naturales (vagina, uretra y ano), este último colonizado principalmente por microorganismos Gram negativos, y también a la longitud de la uretra que es más corta, de esta forma es más fácil llegar a ella y ser colonizada por bacterias (Downs, 1999). Otros factores de riesgo, incluyen el incremento de orina residual secundaria a problemas de estática pélvica y la actividad sexual, ya que el coito favorece la colonización de vías urinarias por microorganismos vulvo-perineales (Hooton, 1999).

También se ha descrito que la edad, la diabetes, la lesión de médula espinal, sondas uretrales o cateterismo pueden ayudar a incrementar las UTIs. Para las infecciones recurrentes de las vías urinarias adquiridas en la comunidad los factores de riesgo son la promiscuidad sexual, anomalías urogenitales (malformaciones), menopausia y cirugía pélvica previa (Nimri, 2004).

En este estudio se encontró que la mayoría de los pacientes estudiados se situaron en el rango de edad de 41 a 60 años con un 56% (n=86) y de 61 a 86 años con el 26% (n=40) (Gráfica 2), estos resultados coinciden con lo descrito en el 2010, en donde 1,204,032 adultos (mayores de 35 años) obtuvieron una tasa de incidencia de 3000 por cada 100,000 habitantes. En mayores de 60 años, la tasa de incidencia fue de 6000 por cada 100,000 habitantes, con predominio en el sexo masculino (información epidemiológica de morbilidad, 2009).

## 8.2 Detección de genes que codifican resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* uropatógenas

En este estudio se encontró que los genes de resistencia a los antibióticos detectados con más frecuencia en las cepas UPEC fueron *tet(A)* (fotografía 5), *sul1* (fotografía 6) y *tet(B)* (fotografía 7) con 33.5%, 30.9% y 17.0%, respectivamente (Tabla 4), seguido de *dfrA1* (fotografía 8) con 12.3%, *cat1* (fotografía 9) con 11.8%, *cmIA* (fotografía 10) con 4.1%, *CITM* (fotografía 11) con 3.0% y *aadAI* (fotografía 12) con 2.0% (Tabla 4). Estos resultados coinciden con los descritos por Momtaz *et al.*, (2013), quienes en su estudio realizado en 123 cepas de *Escherichia coli* uropatógenas encontraron que la presencia de *tet(A)* en las cepas fue del 43.8%, para *sul1* y *tet(B)* del 35.5%, en cada caso, mientras que discrepan para *aadA1* con el 52.8%, *dfrA1* con el 21.9%, *qnr* con el 46.3%, *CIT* con el 39.8%, *aac(3)-iv* con el 22.7% y *blaSHV* con el 27.6%. La emergencia de cepas de *E. coli* multirresistentes a cuatro o más antibióticos pertenecientes a varias familias ha sido previamente reportada y es considerada un serio problema de salud pública (Ariza *et al.*, 1994; Kazemnia *et al.*, 2014). La elevada presencia principalmente de los genes *tet(A)*, *sul1* y *tet(B)* en las cepas UPEC estudiadas en este trabajo refleja probablemente que la tetraciclina y el sulfametoxazol son antibióticos que se han utilizado demasiado para el tratamiento de las UTIs, en cuyo caso las cepas se han seleccionado como resistentes a estos antimicrobianos.

La resistencia de las cepas UPEC a los antibióticos ha sido reportada en varias partes del mundo, por ejemplo en un estudio realizado en 202 cepas UPEC aisladas de pacientes con UTIs en la provincia de Jiangsu Province (China), se encontró que el 93% (n=188) de las cepas presentó el fenotipo de resistencia al ácido nalidíxico, 90% (n=181) a ampicilina, 86% (n= 174) a tetraciclina, 74% (n=150) a ciprofloxacino, 73% (n=148) a trimetoprim con sulfametoxazol, 71% (n=144) a levofloxacino, 68% (n=137) a kanamicina y 63% (n=127) a gentamicina.

La frecuencia de los genes *tet(A)* y *tet(B)* en las cepas UPEC reportada en este trabajo, también coincide con lo descrito por Thi Thu Hao Van *et al.*, (2008) en un estudio realizado en 99 cepas de *Escherichia coli* provenientes de alimentos que se venden comúnmente en el mercado de Vietnam (pollo, mariscos y carne cruda), donde se detectó una elevada prevalencia de los genes *tet(A)* y *tet(B)*. De hecho, se ha reportado que estos dos genes están presentes en cepas de *E. coli* provenientes de carnes de animales en varios países, ya

que es común que los veterinarios suministren constantemente este antibiótico al ganado, en cuyo caso las cepas se han seleccionado como resistentes a la tetraciclina (Bryan, 2004).

La tetraciclina es un antibiótico de amplio espectro que posee actividad contra bacterias Grampositivas y Gramnegativas, motivo por el cual es ampliamente utilizado para combatir infecciones humanas y para la prevención y control de infecciones en animales (Miko, 2005). Debido a que los genes de resistencia a tetraciclina se encuentran en plásmidos, estos pueden ser transferidos por conjugación a otros microorganismos de manera rápida y sencilla (Pezella, 2004; Chopra y Roberts, 2001).

En este trabajo la frecuencia de los genes de resistencia a estreptomicina *aadA1* (2%) y cloranfenicol *cmlA* (4.1%) fue muy baja (Tabla 4), lo cual puede deberse a que en México el cloranfenicol se utiliza exclusivamente para el tratamiento de la salmonelosis, en donde en pacientes con hipersensibilidad a este agente o en pacientes con insuficiencia renal o hepática, puede provocar depresión de la médula ósea (Regna, 1955), mientras que la estreptomicina se utiliza para combatir la tuberculosis, razón por la cual la selección de cepas de *E. coli* resistentes a estos agentes es muy baja. El mecanismo de resistencia al cloranfenicol se debe a la enzima "cloranfenicol acetiltransferasa" que desactiva el cloranfenicol al enlazar uno o dos grupos acetilo derivados del acetil-S-coenzima A, a los grupos hidroxilo del cloranfenicol. Esta acetilación impide la unión del cloranfenicol al ribosoma bacteriano (Ehrlich, 1947).

En este estudio la frecuencia del gen *aadA1* que codifica para la resistencia a la estreptomicina en las cepas UPEC fue muy baja (Tabla 4), sin embargo se ha reportado que el fenotipo de resistencia a la estreptomicina es muy frecuente en cepas de *E. coli* aisladas de animales y humanos en la ciudad de Culiacán (Lopez, 2009). Se ha descrito que el uso continuo de la estreptomicina puede provocar un riesgo de toxicidad debido a las concentraciones séricas elevadas, las cuales pueden producir bloqueo neuromuscular y debilidad del músculo esquelético, además de sufrir una disminución de la audición y de la función vestibular, afectando así el octavo par craneal del paciente, por ende, este medicamento está restringido a pacientes con miastemas graves o parkinsonismo. Sin dejar de lado, que las diferencias de éste y otros antibióticos puede ser causada por la distribución geográfica, la edad y el sexo (Seputiene, 2006).

En este trabajo los genes que codifican para la resistencia a la gentamicina (*aac(3)-IV*), betalactámicos (*blaSHV*) y quinolonas (*qnr*) no se detectaron en ninguna de las cepas (Tabla 4), lo cual puede deberse al hecho de que estos antibióticos son utilizados con poca frecuencia entre los médicos del IMSS de la zona norte del Estado de México, en donde las cepas no se han seleccionado como resistentes. Se ha descrito que durante la década de 1990, las ESBLs (extended-spectrum b-lactamases) de tipo TEM y SHV fueron dominantes, durante la década del 2000 los tipos de betalactamasas CTX-M fueron las más prevalentes en enterobacterias en Europa y otras partes del mundo (Coque *et al.*, 2008). Aunque las betalactamasas AmpC mediadas por plásmidos son menos comunes que las ESBLs, estas han sido encontradas en varias áreas del mundo, entre estas las betalactamasas CMY2 (Jacoby *et al.*, 2009). También se ha descrito que los plásmidos que codifican enzimas AmpC acarrean a menudo múltiples genes de resistencia a otros antibióticos (Philippon *et al.*, 2002).

### **8.3 Patrones de genes que codifican para resistencia a antibióticos en las cepas UPEC.**

En este estudio se identificaron 21 patrones diferentes de asociación de los genes que codifican para la resistencia a los antibióticos (Tabla 5), dentro de los cuales el patrón con mayor número de cepas fue *sul1-tet(A)* con el 10.8% (n= 21), seguido por *sul1-dfrAI* con el 3.0% (n=6), *sul1-tet(B)* con el 2.5% (n=5), *sul1-tet(A)-catI* con el 2.0% (n=4), *tet(B)-catI* y *catI-sul1* con el 1.5% (n=3), en cada caso, *tet(B)-dfrAI*, *tet(A)-dfrAI* y *catI-dfrAI* con el 1.0% (n=2), en cada caso. Estos resultados nos demostraron que 42 de las cepas UPEC responsables de las UTIs en los pacientes estudiados, acarrearon los genes que codifican para la resistencia a silfonamida y tetraciclina (genes A y B, Tabla 5), lo que nos hace suponer que estas cepas probablemente sean poseedoras de plásmidos. La transferencia de los determinantes de resistencia por elementos genéticos móviles, incluyendo plásmidos, transposones y genes de cassettes, presentes en integrons (Hall *et al.*, 1995) y la alteración del locus de regulación *mar* pueden ser factores importantes que contribuyen al incremento de la prevalencia de la multirresistencia a los antibióticos en las bacterias.

Estos resultados demuestran que es importante realizar estudios de sensibilidad a todas las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con UTIs, para que de esta manera se prescriba el antibiótico más eficaz, a fin de evitar la cronicidad y la agudeza de las infecciones urinarias.

## 9. CONCLUSIONES

1. *Escherichia coli* fue la responsable de la mayoría de las infecciones de las vías urinarias de los pacientes estudiados.
2. Los genes que codifican para resistencia a los antibióticos identificados con mayor frecuencia entre las cepas de *E. coli* fueron *tet(A)*, *sul1*, *tet(B)*, *dfrA1* y *cat1*, mientras que los menos frecuentes fueron *cmIA*, *CITM* y *aadA1*.
3. El patrón de asociación de genes de resistencia a los antibióticos identificado con mayor frecuencia entre las cepas UPEC fue el conformado por *sul1-tet(A)*.
4. La mayoría de las cepas de *E. coli* estudiadas fue portadora de más de dos genes de resistencia a antibióticos.
5. La elevada distribución de los genes que codifican para resistencia a antibióticos en las cepas de *E. coli* analizadas, representa un grave problema médico para la erradicación de las infecciones de vías urinarias, lo que podría incrementar la cronicidad de los episodios y el desarrollo de infecciones más agudas, como cistitis y/o pielonefritis.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguado García JM, Lumbreras Bermejo C. 1998. Infecciones por enterobacterias. *Medicine*. 7: 3622-3628.
2. Almirante B. 2002. Infecciones por enterobacterias. *Medicine*. 8:3385-3397.
3. Almirante G, Capdevila JA. 1980. Infecciones causadas por enterobacterias patógenas primarias y oportunistas. *Rev Infect Dis*. 2:746-760 .
4. Ana Betrán, Ana MC, Concepción López. 2013. Evaluación de la resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Barbastro. *Medicina Preventiva Hospital de Barbastro Rev Esp Quimioter*. 28: 263-266.
5. Ang JY, Ezike E, Asmar BI. 2004. Antibacterial resistance. *Indian J Pediat*. 71: 229-239.
6. Ariza RR, Cohen SP, Bachhawat N, Levy SB, Demple B. 1994 Repressor mutations in the *marRAB* operon that activate oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 176:143-8.
7. Arshad M, Seed PC. 2015. Urinary Tract Infections in the Infant. Review. *Neonatal-Perinatal Infections: An Update*. *Clin Perinatol*. 42:17–28.
8. Ayala J. 1994. Genética molecular de la pared microbiana. Nuevos blancos susceptibles de inhibición. En: Vicente M, editor. *Avances en Ingeniería Genética. Series Nuevas. Tendencias*. 9: 191-224.
9. Bush K, Jacoby GA. 2010. Functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 54:969-976.
10. Bryan A, Shapir N, Sadowsky MJ. 2004. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol*. 70: 2503–2507.
11. Calderón JE, Casanova RG, Galindo FA, Gutiérrez EP, Landa JS Moreno ES, Rodríguez CF, Simón PL, Valdez VR. 2013. Diagnóstico t tratamiento de las

- infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. Bol Med Hosp Infan Mex. 70: 3-10.
12. Coque TM, Baquero F, Canton R. 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. Euro Surveill. 13: pii1419044.
  13. Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev; 65:232-260.
  14. Consejo de Salubridad General, IMSS, ISSSTE, PEMEX, DIF, Academia Nacional de Medicina, Guía de Referencia Rápida. Prevención, diagnóstico y tratamiento de las infecciones de vías urinarias no complicada en menores de 18 años en el primero y segundo nivel de atención. Octubre 2009.
  15. Courvalin P. 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 38: 1447–1451.
  16. Dytoc M, Fedorko L, Sherman PM. 2002. Prevalence and drug susceptibility of pathogens causing bloodstream infections in northern Italy: a two-year study in 16 hospitals. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 21:849-855.
  17. Downs SM. 1999. Technical report: urinary tract infections in febrile infants and young children. The Urinary Tract Subcommittee of the American Academy of Pediatrics Committee on Quality Improvement. Pediatrics. 54:103.
  18. Ehrlich QR, Bartz RM, Smith DA, Burkholder. 1947. Chloromycetin, a New Antibiotic from a Soil Actinomycete. Science. 106: 417.
  19. Fariñas AC, Teira CR, Rodríguez CP. 2010. Infección asociada a cuidados sanitarios (infección nosocomial). Medicine.10:3293-3300.
  20. Foxman B. 2003 Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. Dis Mon. 49:53-70.
  21. García Rodríguez JA, García Sánchez E. 1997. Resistencias bacterianas y antibioterapia. Eficacia in vivo Eficacia in vitro. ed Doyma, S.A. 22: 39-50.
  22. García JE, Fresnadillo MJ, García MI, Muñoz JL. 1997. Resistencia a los antimicrobianos que no inhiben la síntesis de la pared celular. Tratamiento Antimicrobiano. Madrid. Emisa; 22:35-50.
  23. Gómez E, Claudia P, Plata S, Mauricio, Sejnauí, Jorge, Rico Villegas, Clara Luz, Vanegas González, Stella. 2007. Resistencia de la *E.coli* en urocultivos de pacientes

- con sospecha de infección urinaria intra y extra-hospitalaria en la Fundación Santa Fe de Bogotá. *Rev Urol Colomb.* 8:53-58.
24. Gómez LR, Gil J, Castillo J, Rubio MC. 1992. Impacto de los inhibidores de beta-lactamasas en la susceptibilidad antibiótica de los patógenos más frecuentes. *Betalactamasas: su importancia para el clínico.* 54:109-127.
  25. Grigoryan L, Trautner BW, Gupta K. 2014. Diagnosis and management of urinary tract infections in the outpatient setting. A review. *312:1677-1684.*
  26. Guerra B, Soto S, Cal S, Mendoza MC. 2000. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:2166-2169.
  27. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG,. 2011. International Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in Women: A 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Dis. *Clin Infect Dis.* 52:103-120.
  28. Hall RM, Collis CM. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol.* 15:593–600.
  29. Hart CA. 1998. La resistencia a los antibióticos. ¿un problema creciente? *Br Med J (Ed Latinoam).* 6:147-148.
  30. Hedberg M. 1996. Beta-Lactam resistance in anaerobic bacteria. A. review. *J Chemother.* 8:3-16.
  31. Hooton TM, Stapleton AE, Roberts PL, Winter C, Scholes D, Bavendam T, et al. 1999. Perineal anatomy and urine-voiding characteristics of young women with and without recurrent urinary tract infections. *Clin Infect Dis.* 29:1600-1601.
  32. Iyobe S. 1997. Appearance of extended spectrum beta Lactamases. *J Nipón Riusho.* 55:1219-1224.
  33. Jacoby GA. 2009. AmpC b-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 22:161–182
  34. Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, Martínez-Martínez L, Nordmann P, Pascual A, Poirel L, Wang M. 2008. Qnr Gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother;* 52:2297-2299.
  35. Jepson RG, Williams G, Craig JC. 2012. Cranberries for preventing urinary tract infections. *Cochrane Database of Systematic Reviews;* 10:CD001321.

36. Johnson JR, Delavari P. 2002. Concurrent fecal colonization with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a homosexual man with recurrent urinary tract infection and in his male sex partner. *Clin Infect Dis.* 35:65-68.
37. Johnson JR, Delavari P. 1982. A clinic pathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. *Gastroenterol.* 83:441-454.
38. Judith A. 2002. Urinary tract infections. How to manage nursing home patients with or without chronic catheterization. *Geriatrics.* 57: 45-58.
39. Karami N, Nowrouzian F, Adlerberth I, Wold AE. 2006. Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:156-161.
40. Kazemnia A, Ahmadi M, Dilmaghani M. 2014. Antibiotic resistance pattern of different *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Iran Biomed J.* 18:219-224.
41. Kollef MH, Shorr A, Tabak YP, Gupta V, Liu LZ, Johannes RS. 2005. Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia. *Chest.* 128: 3854-3862.
42. Krieger J. 2002. Urinary tract infections: what's new? *Urol.* 168: 2351-2358.
43. Lahey Clinic. 2011.  $\beta$ -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Burlington, MA: Lahey Clinic Foundation.
44. Lahey Clinic. *qnr* Numbering and sequencing. Burlington, MA: Lahey Clinic Foundation. 2011.
45. Lautenbach E, Metlay JP, Mao, Han X, Fishman NO, Bilker WB, Tolomeo P, Wheeler M, Nachamkin. 2010. The prevalence of fluoroquinolone resistance mechanisms in colonizing *Escherichia coli* isolates recovered from hospitalized patients. *Clin Infect Dis.* 5:280-285.
46. Levy SB, McMurry LM, Barbosa TM, Burdett V, Courvalin P, Hillen W, Roberts MC, Rood J, Taylor. 1999. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 43:1523-1534.
47. Linares JF, Martínez JL. 2004. Resistencia a los antimicrobianos y virulencia bacteriana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 23: 86-93.
48. Llosa, M, De la Cruz, F. 2005. Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *RES Microbiol.* 156: 1-6 .

49. Lopez C, Osvaldo, Leon F, Josefina, Jimenez E, Maribel, Chaidez Q, Cristóbal. 2009. Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y Salmonella en agua y suelo agrícola. Rev Fitotec Mex. 32; 119-126.
50. López DA, Carrillo EM, Leyva LM, Xicohtencatl CJ, Hernández CR. 2014. Identification of Virulence Factors Genes in *Escherichia coli* Isolates from Women with Urinary Tract Infection in Mexico. BioMed Research International, 10 pages, doi:10.1155/2014/959206.
51. Luzzaro F, Viganò EF, Fossati D, Grossi A, Sala A, Sturla C, Saudelli M, Toniolo A. 2002. AMCLI Lombardia Hospital Infectious Study Group. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 21:849-855.
52. Madel, Douglas, Bennet. 1994. Mecanismos de resistencia. Principles and Practice of Infectious Diseases. 36:428-438.
53. Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. Antimicrob Agents Chemother. 49:71-76.
54. Mandell G L, Douglas R G, Bennett J E, Dolin R. 2006. Mycobacterium tuberculosis. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6: 2857-2858.
55. Mandomando I, Jaintilal D, Pons MJ, Vallès X, Espasa M, Mensa L, Sigaúque B, Sanz S, Sacarlal J, Macete E, Abacassamo F, Alonso PL, Ruiz J. 2009. Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance in shigella and salmonella isolates from children under five year of age with diarrhea in rural Mozambique. Antimicrob Agents Chemother. 53:2450-2454.
56. Manges, M. Amee R. 2001. Widespread Distribution of Urinary Tract Infections Caused by a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Clonal Group. N Engl J Med. 345:1007-1101.
57. Martínez Freijo P. 1997. Integrones: nueva causa de resistencia a antibióticos. Rev Esp Quimioterapia. 10: 191-194.
58. Matthew A. Croxen et al. 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol. Rev. 26: 822-880.
59. Merino S, José M, Guillan Ma, Cristina; Fuster Foz, Carlos López Medrano, et al. 2008. Evolución de la resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* en muestras de orina procedentes de la comunidad. Archivos Españoles de Urología. 61:776-780.

60. Miko A, K Pries, A Schroetes, R Helmuth. 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J. Antimicrobial Chem.* 56:1025-1033.
61. Molina LJ, Aparicio OG, Ribas RM, Gavilanes PS, Chávez ME, Hernández CR, Manjarrez HA. 2011. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J Infect Dev Ctries.* 5:840-849.
62. Momtaz H, Karimian A, Madan M, Dehkordi SF, Ranjbar R, Sarshar M, Souod N. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Annals Clin Microbiol Antimicrob.* 12:1186-1476.
63. Muñoz Bellido JL. 1997. Mecanismo de resistencia a quinolonas. *Rev Esp Quimioterapia.* 10: 348-349.
64. Neil S, Sheerin. 2011. Urinary tract infection. *Review Medicine.* 39:384-389
65. Nicolás F. Cordeiro and Luciana Robino. 2008. Ciprofloxacin-Resistant Enterobacteria Harboring the *aac(6)-Ib-cr* Variant Isolated from Feces of Inpatients in an Intensive Care Unit in Uruguay. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 806–80.
66. Nimri LF, Batchoun R. 2004. Community-Acquired Urinary Tract Infections in Rural Area: Predominant Uropathogens, and their Antimicrobial Resistance. *J Med Microbiol.* 53;1045.
67. Peleg AY & Hooper RC. 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *England J Med* 362:1804-1813.
68. Pezella C, A Ricci, E DiGiannatale, I Luzzi, A Carattoli. 2004. Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:903-908.
69. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. 2002. Plasmid-determined AmpC-type betalactamases *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 1–11.
70. Pollack M, Charache P, Nieman RE, Jett MP, Reimhardt JA, Hardy PH Jr. 1972 Factors influencing colonisation and antibiotic-resistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients. *Lancet.* 2: 668-671.
71. Puerta A, Mateos, F. 2010. Enterobacterias. *Medicine* 10: 3426-3431
72. Regna P, Ann P. 1955. Chemistry of Antibiotics of Clinical Importance. *J. Med.* 84:136.

73. Reyna FF, Barrios H, Garza RU, Sánchez PA, Rojas MT, Uribe FJ, Fagundo SR, Silva SJ. 2013. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O25b-ST131 isolates causing community-acquired UTIs in Mexico. *Diag Microbiol Infect Dis*. 76:396-398.
74. Dytoc M, Fedorko L, Sherman PM. 1994 Signal transduction in human epithelial cells infected with attaching and effacing *Escherichia coli* in vitro. *Gastroenterol*. 106:1150-1161.
75. Ruiz J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Antimicrob Chemother*. 5:1109-1117.
76. Rupp ME, Fey PD. 2003. Enterobacterias Productoras de  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE). Diagnóstico, Prevención y Tratamiento Farmacológico. *Drugs*. 4:353-365.
77. Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C. 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:3996-4001
78. Salvatore S, Salvatore S, Cattoni E, Siesto G, Serati M, Sorice P, Torella M. 2011. Urinary tract infections in women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*.. 156:131-136.
79. Šeputiene V, M Ružauskas, P Žlabys, E Sužiedeliene. 2006. Characterization of streptomycin resistance determinants in Lithuanian *Escherichia coli* isolates. *Biologija*. 2:14-17.
80. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEM Microbiol Rev*. 28:519-542.
81. Silva SJ, Barrios H, Reyna FF, Bello DM, Sanchez PA, Rojas T, Garza RU. 2011. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in Mexico. *Microb Drug Resist*. 17:497-505.
82. SINAVE/DGE/SALUD. Información epidemiológica de morbilidad. Anuario 2009, Versión ejecutiva; 2009. México, D.F.: Secretaría de Salud. p. 127. Disponible en: [http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/ANUARIOS/INF\\_EPID\\_MORBI\\_2009\\_VER\\_EJEC.pdf](http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/ANUARIOS/INF_EPID_MORBI_2009_VER_EJEC.pdf).
83. Svanborg C, Godaly G. 1997 Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am*. 3:513-529.

84. Thomas M Hooton & Kalpana Gupta. 2014. Acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women. *UpToDate* 52: 561-564.
85. Toro CS, Farfán M, Contreras I, Flores O, Navarro N, Mora GC, Prado V. 2005. Genetic analysis of antibiotic-resistance determinants in multidrugresistant *Shigella* strains isolated from Chilean children. *Epidemiol Infect.* 133:81–86.
86. Truls E. Bjerklund Johansen. 2011. Patient assessment in urinary tract infections: symptoms, risk factors and antibiotic treatment options. *Surgery (Oxford)*. 29:265-271.
87. Ulett GC, Totsika M, Schaale K, Carey AJ, Sweet MJ, Schembri MA. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr Opin Microbiol.* 16:100-107.
88. Van TT, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ. 2008. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *Int J Food Microbiol.* 10; 217-223.
89. Vignoli R, Seija V. 2006. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Temas de bacteriología y Virología.* 35: 649-662.
90. Wolska, K. I. 2003. Horizontal DNA Transfer Between bacteria in the environment. *Acta Microbiol.Pol.* 52: 2333-2243.