



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DETECCIÓN DE GENES QUE CODIFICAN β -
LACTAMASAS EN CEPAS VAGINALES DE
Escherichia coli.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

EMILIA COLIO ROBLEDO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Eric Monroy Pérez

Proyecto financiado por la UNAM-DGAPA-PAPIIT IN216517.



Los Reyes Iztacala, Tlanepantla, Estado de México, 2017.



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.

Dedicatoria

A mis padres:

Por el apoyo incondicional durante toda mi trayectoria escolar, por la paciencia, enojos, consejos, preocupaciones y regaños; pero sobre todo por su amor y confianza que me brindan siempre. Gracias. Todo lo que eh lo grado es gracias a ustedes. Los amo infinitamente.

A Emily Michell Lira Ortega:

Por estar siempre en las buenas y en las malas, por apoyarme en todo y jamás abandonarme. Por confiar en mí, por los momentos que compartimos y por ayudarme a jamás rendirme. Te amo beif.

A mis amigos de la carrera:

Porque sin ustedes la universidad no hubiera sido la misma, gracias por estar ahí siempre, por compartir horas de estudio, exámenes difíciles y prácticas de campo incomparables. Gracias por ser mis compañeros de viaje durante estos cuatro años y sé que a pesar de que seguiremos caminos diferentes en la vida, da igual hacia dónde vayamos, ya que siempre llevaremos una pequeña parte del otro dentro de nosotros. Los quiero mucho.

Agradecimientos

Al Dr. Eric Monroy Pérez por la dirección, interés, apoyo, consejos y motivación para que pudiera realizar este trabajo.

A la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras por su apoyo y sugerencias durante todo el trayecto de elaboración de este trabajo.

También agradezco al comité revisor de este trabajo:

Dr. Sergio Vaca Pacheco

Mtra. Alina Uribe García

Biol. Susana González Almazán

Su ayuda, conocimientos y asesoría brindada fueron de gran importancia para este proyecto.

Para la elaboración del presente trabajo de tesis de investigación se contó con el apoyo económico de la **DGAPA**:

Universidad Nacional Autónoma de México, Dirección General de Asuntos del Personal Académico en su Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN216517

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1.RESUMEN | 5 |
| 2.INTRODUCCIÓN | 6 |
| Características de <i>Escherichia coli</i> | 6 |
| Patología que causa <i>Escherichia coli</i> | 7 |
| Factores de virulencia en <i>Escherichia coli</i> | 8 |
| Infecciones cérvico-vaginales; signos y síntomas | 10 |
| Resistencia de <i>E. coli</i> a los antibióticos..... | 11 |
| Clasificación de las betalactamasas..... | 15 |
| Genes de resistencia a los betalactámicos..... | 17 |
| Inhibidores de betalactamasas | 18 |
| 3.ANTECEDENTES..... | 21 |
| 4.JUSTIFICACIÓN | 23 |
| 5.OBJETIVOS | 23 |
| General:..... | 23 |
| Particulares:..... | 23 |
| 6.MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| Toma de muestras | 24 |
| Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos | 24 |
| Extracción del DNA bacteriano | 25 |
| Identificación de los genes de betalactamasas por PCR multiplex | 25 |
| Electroforesis..... | 28 |
| 7.RESULTADOS | 29 |
| Infecciones cérvico vaginales | 29 |
| Edad de las pacientes | 31 |
| Resistencia a los antibióticos | 32 |
| Detección de genes que codifican betalactamasas | 33 |
| Patrones de asociación de genes de betalactamasas con fenotipos de resistencia a antibióticos .. | 35 |
| 8.DISCUSIÓN | 39 |
| Pacientes estudiadas | 39 |
| Resistencia a los antibióticos | 40 |
| Detección de genes que codifican betalactamasas en cepas de <i>E. coli</i> | 41 |
| Patrones de asociación de genes de betalactamasas en las cepas de <i>E. coli</i> | 42 |
| 9.CONCLUSIONES | 44 |
| 10.LITERATURA CITADA | 45 |

1. RESUMEN

En los últimos años el tratamiento de las infecciones cérvico-vaginales por cepas de *Escherichia coli* se ha complicado, debido a la selección de cepas resistentes a los antibióticos, principalmente a los betalactámicos, que son ampliamente administrados por el sector salud. El propósito de este estudio fue identificar los diferentes grupos de genes que codifican para betalactamasas en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales. Se estudiaron 200 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales de dos clínicas del IMSS, ubicadas en el Edo. de México. Las cepas de *E. coli* fueron identificadas por PCR mediante la amplificación del gen *16SrRNA* y los diferentes grupos de betalactamasas por PCR multiplex. El 61.5% (n=123) de las cepas de *E. coli* fue portadora del gen *TEM*, 35.5% (n=71) de *SHV*, 24.5% (n=49) de *OXA-1*, 4 y 30, 9.5% (n=19) de *CTX-M1*, *M3* y *M15*, 11.5% (n=23) de *CTX-M2*, 5% (n=10) de *CTX-M9* y *M14*, 2% (n=4) de *CTX-M8*, *M25*, *M26* y *M39-41*, 10.5% (n=21) de *LAT-1*, 8.5% (n=17) de *ACT-1*, 1.5% (n=3) de *MOX*, 0.5% (n=1) de *VEB-1*, 26.5% (n=53) de *IMP*, 8.5% (n=17) de *VIM* y 0.5 (n=1) de *KPC*. La presencia de los diferentes grupos de genes que codifican para un gran número de enzimas de betalactamasas en las cepas vaginales de *E. coli*, pone de manifiesto la necesidad indiscutible de mejorar o implementar nuevas alternativas para el tratamiento médico de las infecciones vaginales.

2. INTRODUCCIÓN

Características de *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, mide 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo, es una bacteria móvil debido a la presencia de flagelos peritricos, presenta múltiples fimbrias que le permiten adherirse a las células epiteliales, produce hemolisinas, crece en el medio de cultivo EMB (eosina azul de metileno) y en el agar MacConkey. En el agar EMB su morfología colonial se observa de coloración verde metálica, las colonias tienen de 2 a 4 mm de diámetro y un centro grande de color negro, en agar MacConkey las colonias son rojas con un halo turbio. *E. coli* puede fermentar la glucosa y la lactosa con producción de gas, además de que es un organismo anaerobio facultativo. *E. coli* tiene una estructura antigénica constituida por un antígeno capsular (antígeno K) y antígeno somático (Antígeno O). Se puede determinar el grupo patógeno al que pertenece con un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K) (Rodríguez, 2002).

La estructura de *E. coli* consiste en una membrana interna (o citoplasmática) de una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa siguiente, o capa externa, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas. La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS) (endotoxina), lipoproteínas que están fijadas al peptidoglucano, proteínas (porinas) multiméricas que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos y otras proteínas de la membrana externa (García y Rodríguez, 2010).

Patología que causa *Escherichia coli*

E. coli coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de la microbiota normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea. *E. coli* se clasifica en tres grupos: (i) comensal, (ii) patógeno intestinal y (iii) patógeno extraintestinal.

E. coli como ya se mencionó está presente en las mucosidades del intestino grueso del hombre, dando lugar a una relación de mutuo beneficio, este grupo de cepas de *E. coli* son comensales. No obstante estas cepas también pueden producir infecciones en pacientes inmunodeprimidos (Duriez *et al.* 2001).

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* patógenas intestinales causantes de diarrea se clasifican en diferentes grupos: enterotoxigénica (ETEC), que es causante de deshidratación en niños por diarrea y la causante de la diarrea del viajero. Enterohemorrágica también conocida como productora de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), este grupo causa principalmente diarrea acuosa, diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica, síndrome hemolítico urémico y muerte. Enteroinvasiva (EIEC), causante de fiebre elevada y diarrea sanguinolenta. Enteropatógena (EPEC), que provoca diarrea acuosa en neonatos de países subdesarrollados. Enteroagregativa (EAEC), este grupo es causante de diarrea aguda y crónica (Chulain *et al.* 2005).

Entre las cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales se encuentra *E. coli* uropatógena (UPEC, por sus siglas en inglés) que puede causar infecciones urinarias agudas e infecciones recurrentes. La mayoría de estas cepas UPEC poseen genes que les confieren resistencia a múltiples antimicrobianos. El tratamiento administrado frecuentemente para infecciones urinarias incluye antibióticos betalactámicos, fluoroquinolonas o trimetoprim/sulfametoxazol. Otras infecciones provocadas por cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales son; infecciones respiratorias, donde el cuadro clínico que causa produce una bronconeumonía. Infecciones del sistema nervioso central, estas infecciones afectan principalmente a los neonatos en su primer mes de vida provocando meningitis bacteriana. Infecciones cérvico-vaginales afectando a una gran parte de la población de mujeres (García y Rodríguez, 2010).

Factores de virulencia en *Escherichia coli*

La capacidad de *E. coli* para causar infecciones urinarias, cérvico vaginales, entre otras, se debe a la gran cantidad de factores de virulencia que posee (Tabla 1), los cuales codifican para adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, citotoxinas, enterotoxinas y antígenos capsulares (Momtaz *et al.*, 2013). Estos factores son componentes microbianos que favorecen el crecimiento o sobrevivencia de la bacteria durante alguna infección. (Cárdenas *et al.*, 2014).

La severidad de infecciones producidas por *E. coli* se amplifica y esto puede deberse a la acción de varios factores de virulencia que actúan en combinación durante el proceso infeccioso (Rashki 2014), por lo que las cepas uropatógenas o cérvico vaginales son capaces de colonizar las partes anatómicas claves fuera del intestino del hospedero y causar enfermedad (Hilbert *et al.* 2008).

| FUNCIÓN | GEN | PRODUCTO |
|----------------------------------|-------------|--|
| Sistema de adquisición de hierro | <i>iroN</i> | Proteína de membrana externa receptora de sideróforo |
| | <i>irp2</i> | Proteína reprimible por hierro |
| | <i>iuC</i> | Aerobactina |
| | <i>feoB</i> | Proteína transportadora de hierro |
| | <i>fyuA</i> | Sideróforo Yersiniabactina |
| | <i>ireA</i> | Proteína de membrana externa de regulación de hierro |
| | <i>iutA</i> | Aerobactina |
| Adhesinas | <i>fim</i> | Fimbria tipo 1 |
| | <i>afal</i> | Adhesina afimbrial I |
| | <i>sfa</i> | Fimbriae S |
| | <i>iha</i> | Adhesina no hemaglutinante |
| | <i>tsh</i> | Hemagutinina sensible a la temperatura |

| | | |
|-------------|------------------------|---|
| | <i>papC</i> | Pilus asociados con pielonefritis |
| | <i>papG allele I</i> | |
| | <i>papG allele II</i> | |
| | <i>papG allele III</i> | |
| Protectinas | <i>kpsMT</i> | Antígeno K |
| | <i>ompT</i> | Proteína de membrana externa |
| | <i>iss</i> | Proteína que incrementa la sobrevivencia en suero |
| | <i>traT</i> | Proteína de transferencia |
| Toxinas | <i>cnf1</i> | Factor citotóxico necrotizante 1 |
| | <i>hlyA</i> | Hemolisina |
| | <i>set</i> | Enterotoxina 1 de Shigella |
| | <i>astA</i> | Toxina enteroagregativa termo estable |
| | <i>vat</i> | Toxina autotransportadora vacuolizante |
| | <i>usp</i> | Proteína uropatogenica específica |
| | <i>cva/cvi</i> | Genes del operón del plásmido colicina |

Tabla 1. Factores de virulencia en *E. coli*.

Infecciones cérvico-vaginales; signos y síntomas

Las infecciones cérvico vaginales constituyen una de las enfermedades infecciosas más comunes a nivel mundial. Las infecciones cérvico vaginales ocurren más frecuentemente porque la distancia desde el colon a la abertura uretral es mucho más corta en las mujeres que en los hombres (Figura 1). La incidencia de infecciones cérvico vaginales varía fundamentalmente con la edad. Las mujeres menores de 10 años y las de 18 a 40 años son las que más frecuentemente adquieren estas infecciones. En el caso de las menores de 10 años es debido a que no pueden asearse bien después de defecar, de modo que las heces llegan con facilidad a la zona cérvico vaginal. Las mujeres sexualmente activas corren más riesgo de infectarse durante un encuentro sexual. Aproximadamente la mitad de todas las mujeres han tenido una infección cérvico vaginal antes de alcanzar los 30 años de edad. Estas infecciones se han presentado en un 80% en la población femenina (Molina, 2015).

Los signos y síntomas más frecuentes que presentan las mujeres con infecciones cérvico-vaginales son: dolor, ardor, picazón y flujo con olor a pescado. La gravedad de las infecciones cérvico vaginales producidas por *E. coli* se incrementa por la existencia de un amplio rango de factores de virulencia que codifican para sistemas de adquisición de hierro, adhesinas, toxinas, y protectinas (Rashki, 2014). En los últimos años el tratamiento de las infecciones cérvico vaginales por *E. coli* se ha complicado debido a la selección de cepas resistentes a los antibióticos (Shaikh *et al.*, 2015).

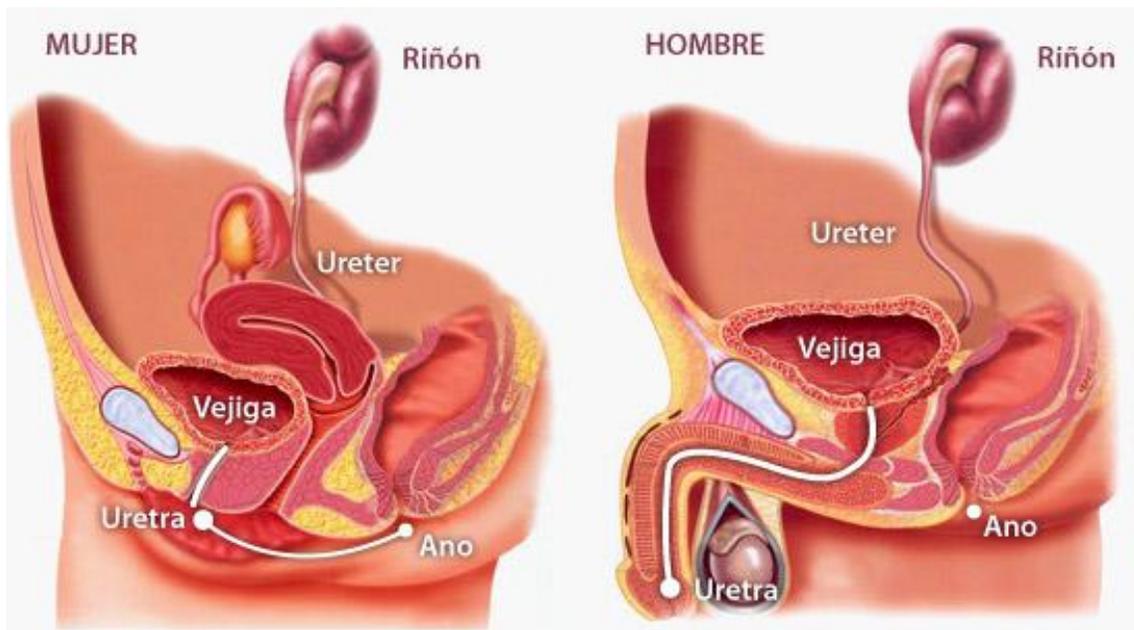


Figura 1. Diferencias anatómicas del tracto urinario de la mujer y el hombre.

Resistencia de *E. coli* a los antibióticos

El uso indiscriminado de los antibióticos, tanto para uso humano, como veterinario y agrícola ha ocasionado con el tiempo que las bacterias se seleccionen como resistentes a ellos. La emergencia de cepas de *E. coli* multirresistentes a los antibióticos es considerado un serio problema de salud que complica el tratamiento de las infecciones (World Health Organization, 2014). Dentro de los factores más importantes que contribuyen al incremento de la multirresistencia bacteriana se encuentra la transferencia de los genes de resistencia a los antimicrobianos por elementos genéticos móviles, incluyendo plásmidos, transposones, genes de cassettes e integrones (Hall, 1998). Existen cinco mecanismos principales de acción de los antibióticos; 1. Interferencia con la síntesis de la pared celular en donde antibióticos betalactámicos como penicilina y cefalosporinas impiden la síntesis de enzimas responsables de la formación de la capa de peptidoglucano. 2. La inhibición de síntesis de proteínas, en este caso algunos antibióticos se unen a alguna subunidad del ribosoma, sea 30S o 50S, bloqueando la

interacción del ribosoma con el tRNA. 3. Interferencia con la síntesis de ácidos nucleídos mediante enzimas que inhiben la síntesis de DNA en el ciclo de replicación. 4. Inhibición de una vía metabólica, en este caso se bloquean los pasos clave en la síntesis de folato, que es un cofactor en la biosíntesis de nucleótidos. 5. Desorganización de la membrana celular, donde ocurren efectos inhibidores al aumentar la permeabilidad de la membrana celular, provocando una fuga de contenido bacteriano lo que conduce a un mecanismo de eflujo de potasio dando lugar a la muerte celular (Shaikh *et al.*, 2015).

Por otra parte se han descrito siete mecanismos de resistencia a antibióticos en las bacterias Gram negativas mediados por plásmidos (Peleg *et al.*, 2010). El primer mecanismo es la disminución de las porinas (Tabla 2), lo que reduce el movimiento de los antibióticos a través de la membrana bacteriana, también la producción de betalactamasas que hidrolizan el enlace amida de los antibióticos betalactámicos. El incremento de la expresión de las bombas de eflujo transmembranales, que conduce a la expulsión del antibiótico antes de que ejerza su efecto. La presencia de enzimas que modifican el antibiótico, impidiendo que la droga actúe en el sitio blanco. Mutaciones o modificaciones en el ribosoma, que generan que el antibiótico no pueda unirse al sitio de acción y de esta manera sea incapaz de inhibir la síntesis de proteínas. Otro de ellos es el mecanismo bypass metabólico, que utiliza una enzima alternativa insensible al antibiótico, y por último la mutación de los lipopolisacáridos, que impide a los antimicrobianos de la clase de las polimixinas unirse al blanco (Paniagua *et al.*, 2016).

La identificación de los genes de resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* es esencial para prescribir adecuadamente el tratamiento y reducir el periodo de duración de la infección. Entre los genes que codifican resistencia a los antimicrobianos se encuentran (Tabla 2); *accA1* (estreptomicina), *aac(3)-IV* (gentamicina), *sul1* (sulfonamida), *blaSHV* y *CITM* (betalactámicos), *cat1* y *cmlA* (cloranfenicol), *tet(A)* y *tet(B)* (tetraciclinas), *dfrA1* (trimetoprim) y *qnr* (quinolonas) (Sáenz *et al.*, 2004).

| ANTIBIÓTICO | MECANISMO DE ACCIÓN | MECANISMO DE RESISTENCIA | GENES IMPLICADOS |
|--|---|---|--|
| BETALACTÁMICOS <ul style="list-style-type: none"> ● PENICILINAS ● CEFALOSPORINAS ● CARBAPANEMES ● MONOBACTÁMICOS ● SULBACTAM Y ÁCIDO ● CLAVULÁNICO | INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR | 1. PRODUCCIÓN DE BETACTAMASAS 2. MUTACIÓN DE PBPs 3. BAJA PENETRACIÓN | <i>blaTEM, blaSHV, blaCARB, blaOXA, blaCTX-M, CITM y blaGES.</i> |
| POLIMIXINAS <ul style="list-style-type: none"> ● POLIMIXINA B, COLISTINA | ALTERACIÓN DE LA MEMBRANA CELULAR DE GRAMNEGATIVOS. | BAJA PENETRACIÓN | |
| AMINOGLUCÓSIDOS <ul style="list-style-type: none"> ● ESTREPTOMICINA ● GENTAMICINA ● NEOMICINA ● KANAMICINA | INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS AL UNIRSE A LA SUBUNIDAD RIBOSOMAL 30S | 1. MUTACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN EN EL RIBOSOMA 2. BAJA PENETRACIÓN 3. MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA (ACETILACIÓN, FOSFORILACIÓN) | <i>aadA1, acc(3)-IV</i> |
| TETRACICLINAS | INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS AL UNIRSE A LA SUBUNIDAD RIBOSOMAL 30S | 1. DESTOXIFICACIÓN ENZIMÁTICA 2. BAJA PENETRACIÓN | <i>tetA y tetB,</i> |
| CLORANFENICOL | INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS | 1. MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA (ACETILTRANSFERASA) | <i>cat1, floR y cmlA.</i> |
| MACRÓLIDOS <ul style="list-style-type: none"> ● ERITROMICINA ● LINCOMICINA ● CLINDAMICINA | INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS AL UNIRSE A LA | 1. MUTACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN EN EL RIBOSOMA | |

| | SUBUNIDAD 50S | | |
|---|---|--|--------------------------------------|
| QUINOLONAS <ul style="list-style-type: none"> ● AC. NALIDÍXICO ● PEFLOXACINA ● NORFLOXACIN | INHIBICIÓN ACTIVIDAD DE LA DNA GIRASA AFECTANDO LA REPLICACIÓN DEL DNA | 1. MUTACIÓN DE LA SUBUNIDAD ALFA DE LA ADN GIRASA 2. DISMINUCIÓN DE LA CAPTACIÓN | <i>gyrA, parC, acrAB-lik y, qnr.</i> |
| RIFAMPICINA, RIFABUTINA | ACTUA SOBRE LA RNA POLIMERASA, INHIBIENDO LA TRANSCRIPCIÓN | 1. MUTACIÓN DE LA RNA POLIMERASA | |
| SULFONAMIDAS Y TRIMETOPRIM | INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DEL ÁCIDO FÓLICO QUE PARTICIPA EN LA SINTESIS DE PURINAS | 1. SÍNTESIS DE VÍA ALTERNA NO SENSIBLE AL FÁRMACO | <i>sul1, sul2, dfr y dfrA1</i> |

Tabla 2. Principales grupos de antibióticos, mecanismo de acción, mecanismo de resistencia y genes implicados.

Clasificación de las betalactamasas

Las betalactamasas pueden ser encontradas en el espacio periplasmático (Bush, 1988). Los genes que codifican para estas enzimas pueden estar localizados en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, lo cual permite su fácil transferencia entre diferentes bacterias, lo que representa un gran reto para el control de las infecciones (Tafur *et al.*, 2008).

Las betalactamasas se clasifican principalmente en dos esquemas (Tabla 3): la clasificación molecular de Ambler (1980) y la clasificación funcional de Bush, Jacoby y Medeiros (1995). La clasificación de Ambler o también llamada clase molecular o subclase divide las betalactamasas en cuatro clases (A-D). Se basa en la homología de las proteínas. Las clases A, C y D son serina-betalactamasas y la clase B son metalo-betalactamasas. La clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros se divide en los grupos 1, 2 y 3, que a su vez están divididos en 16 subgrupos. El número de betalactamasas actualmente descrito es sumamente elevado, incrementándose de manera continua. Dentro de las más de 890 betalactamasas que actualmente se han caracterizado, las familias más comunes dentro de las enterobacterias son: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1} y *bla*_{CARB}. Las dos primeras pertenecen 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, *bla*_{OXA-1}, pertenece al grupo 2d donde están las penicilasas que se caracterizan por la hidrólisis de cloxacilina (oxacilina); por su parte *bla*_{CARB} pertenece al grupo 2c, el cual se caracteriza por tener penicilasas con acción hidrolítica contra carbenicilina (Mosquito *et al.*, 2011). Esta clasificación se basa en las características funcionales, teniendo en cuenta distintos criterios como las propiedades bioquímicas (peso molecular, secuencia de nucleótidos), las propiedades físicas (punto isoeléctrico), el espectro de hidrólisis, el espectro de inhibición, si son codificadas por plásmidos o por el cromosoma, etc. Esta clasificación es mucho más importante en el diagnóstico microbiológico de laboratorio ya que considera los substratos y los inhibidores de las betalactamasas clínicamente relevantes (Carrillo y García, 2007). La clasificación de las betalactamasas se resume en la Tabla 3.

| Grupo Bush-Jacoby (2009) | Clase molecular (subclase) | Substratos preferidos | Inhibidas por: | | Enzimas representativas |
|--------------------------|----------------------------|---|----------------|------|---|
| | | | AC | EDTA | |
| 1 | C | Cefalosporinas | No | No | <i>AmpC, P99, ACT-1, CYM-2, FOX-1 y MIR-1</i> |
| 1e | C | Cefalosporinas | No | No | <i>GC1 y CMY-37</i> |
| 2a | A | Penicilinas | Sí | No | <i>PC1</i> |
| 2b | A | Penicilinas, Cefalosporinas | Sí | No | <i>TEM-1, TEM-2 y SHV-1</i> |
| 2be | A | Cefalosporinas de espectro extendido y Monobactámicos | Sí | No | <i>TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1 y VEB-1</i> |
| 2br | A | Penicilinas | No | No | <i>TEM-30 y SHV-10</i> |
| 2ber | A | Cefalosporinas de espectro extendido y Monobactámicos | No | No | <i>TEM-50</i> |
| 2c | A | Carbencilinas | Sí | No | <i>PSE-1 y CARB-3</i> |
| 2ce | A | Carbencilinas y Cefepime | Sí | No | <i>RTG-4</i> |
| 2d | D | Cloxacilina | Variable | No | <i>OXA-1 y OXA-10</i> |
| 2de | D | Cefalosporinas de espectro extendido | Variable | No | <i>OXA-11 y OXA-15</i> |
| 2df | D | Carbapenemes | Variable | No | <i>OXA-23 y OXA-48</i> |
| 2e | A | Cefalosporinas de espectro extendido | Sí | No | <i>CepA</i> |
| 2f | A | Carbapenemes | Variable | No | <i>KPC-2, IMI-1 y SME-1</i> |
| 3a | B(B1) | Carbapenemes | No | Sí | <i>IMP-1, VIM-1, CrA y IND-1</i> |
| 3b | B(B2) | Carbapenemes | No | Sí | <i>CphA y Sfh-1</i> |

Tabla 3. Clasificación de betalactamasas. AC: ácido clavulánico. Modificada en el 2009.

Genes de resistencia a los betalactámicos

Entre los genes que codifican para la resistencia a los antibióticos betalactámicos se encuentran: *TEM-1*, *TEM-2*, *SHV*, *OXA-1*, *OXA-48*, *CTXM-1*, *CTXM-2*, *CTXM-9*, *CTXM-8-25*, *ACC-1*, *FOX-1*, *MOX-1,2*, *SHA-1,2*, *LAT-1-3*, *ACT-1*, *GES-1-9*, *PER-1,3*, *VEB-1-6*, *GES-11*, *IMP-2*, *VIM-2*, *KPC1-5* (Dannelle et al., 2010).

En 1983 se descubrió en Alemania la primera enzima capaz de hidrolizar las cefalosporinas de más amplio espectro (*SHV-2*). Posteriormente en Francia se describió una *TEM-3* con fenotipo semejante. En 1989 se detectó una cepa clínica de *E. coli* con una enzima diferente a *TEM* y *SHV*, que se denominó *CTX-M-1* por su actividad hidrolítica preferente por la cefotaxima. Se considera que las cefotaximasas *CTX-M* plasmídicas derivan de las penicilinasas cromosómicas naturales de *Kluyvera* spp. El grupo *CTX-M* ha adquirido una gran relevancia epidemiológica debido a su dispersión intra y extrahospitalaria. Se han aislado en casi todas las enterobacterias, en particular en *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter* spp. Actualmente se detectan, sobre todo, en *E. coli*. En 1991, en Turquía, y más tarde en Francia, se detectaron por primera vez oxacilinasas que se inhibían débilmente por el ácido clavulánico pero que conferían, por lo demás, un fenotipo similar al de las BLEE. Resultaron ser mutantes de las betalactamasas tipo *OXA*, la mayoría de *OXA-10*. Se han descrito 11 variedades hasta la fecha, y aunque principalmente afectan a *Pseudomonas* spp., también se han descrito en enterobacterias (García et al., 2010).

Hoy se conocen más de 160 variantes de *TEM*, la mayoría de ellas BLEE, pero también aquí se incluyen las enzimas *IRT* (inhibitor resistant *TEM*) y *CMT* (complex mutant *TEM*), más de 115 para *SHV* y más de 80 de *CTX-M* (clasificadas en cinco grupos: *CTX-M-1*, *CTX-M-2*, *CTX-M-8*, *CTX-M-9* y *CTX-M-25*), y la cifra sigue creciendo. Además, aparecen nuevas BLEE como *PER*, *VEB*, *GES*, *SFO*, *TLA*, *BEL*, *BES* e *IBC* (Al-Agamy et al., 2014).

Inhibidores de betalactamasas

Los antibióticos betalactámicos ocupan actualmente el primer puesto en la terapéutica antibacteriana, pero con la aparición de enzimas que degradan estos fármacos (betalactamasas) se ha introducido un nuevo grupo de antibióticos, los inhibidores de betalactamasas, que asociados a los betalactámicos (ampicilina, amoxicilina, ticarcilina y piperacilina) permiten, por una parte, recobrar la eficacia de éstos y, por otra, amplían el espectro de acción. Constituyen un importante avance en la terapéutica antibacteriana, particularmente contra bacterias que se han seleccionado como resistentes por la producción de betalactamasas inducibles y plasmídicas. El término inhibidores de betalactamasas es muy amplio, ya que incluye compuestos con diferencias en su origen y estructura química, a lo que hay que añadir distintos modos de acción. Ahora bien, los inhibidores más importantes son de naturaleza betalactámica, destacando además del ácido clavulánico, el ácido olivánico, las sulfonas del ácido penicilánico, la tienamicina, sulbactam y las monobactamas aztreonam y tazobactam (Cuadro 1). Estas sustancias tienen una gran afinidad por las betalactamasas, se unen de forma irreversible y se metabolizan con ellas. Los principales efectos adversos que puede provocar el uso de inhibidores de betalactamasas consisten fundamentalmente en fenómenos de intolerancia (trastornos digestivos, alteraciones hematológicas, de la función hepática o renal, dermatológicas y neurológicas) y reacciones alérgicas (Tabla 4) (Giner *et al.* 1996).

- **Clavamas**

 - Ácido clavulánico

- **Derivados del ácido penicilánico**

 - Sulfonas del ácido penicilánico:

 - Sulbactam

 - Tazobactam

 - Sulfona del ácido 6-alfa-cloro-penicilánico

 - Sulfona del ácido 6- β -bromo-penicilánico

 - Sulfona de la meticilina

 - Sulfona de la quinacilina

 - Ácido 6-acetilmetilen-penicilánico

- **Penemas**

 - Carbapenemas:

 - Ácidos olivánicos

 - Compuesto PS

 - Carpetimicinas

 - Asparenomicinas

 - Epitienamicinas

 - Tienamicinas

 - Triazolmetilen-penemas:

 - BRL 42715

- **Derivados del ácido heptenoico**

 - Cilastatina

Cuadro 1. Clasificación estructural de los inhibidores de betalactamasas.

| SÍNTOMAS | A/C % | A/S % | P/T % |
|--|-------|-------|-------|
| Náuseas | 3 | 1.1 | 0.3 |
| Vómitos | 1.8 | 0.9 | 0.4 |
| Diarrea | 4.1 | 10.4 | 3.8 |
| Exantema morbiliforme | 1.1 | 1.1 | - |
| Urticaria | 0.08 | 0.08 | 0.6 |
| Flebitis | - | 1.2 | 0.2 |
| Tromboflebitis | - | - | 0.32 |
| Sobreinfección por <i>Candida</i> | 1 | 1 | - |
| Alteración transitoria de enzimas hepáticas | 1-2 | 1-2 | - |

Tabla 4. Efectos adversos de los inhibidores de betalactamasas. A/C: amoxicilina más ácido clavulánico. A/S: ampicilina más sulbactam. P/T: piperacilina más tazobactam.

3. ANTECEDENTES

Warjri y colaboradores en el 2015 detectaron mediante PCR los genes de betalactamasas de espectro extendido (BLEE, *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{SHV}) en *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Klebsiella pneumoniae* provenientes de 180 muestras fecales. En total aislaron 414 bacterias entéricas, de las cuales 333 (80.44%) fueron *E. coli*. La mayoría de las cepas fue portadora de genes de BLEE. *E. coli* presentó estos genes en un 21.6% (n=72), dentro de los cuales el gen *bla*_{CTX-M-1} se detectó en el 8.7% (n=36), y el gen *bla*_{SHV} se identificó en el 1.21% (n=5).

Al-Agamy y colaboradores en el 2014 realizaron un estudio para estimar la prevalencia de genes de BLEE en 152 cepas de *E. coli*, de las cuales 119 provenían de orina de pacientes de Arabia Saudita. Únicamente 31 cepas fueron positivas para BLEE; de las cuales 96.77% (n=30) fueron productoras de CTXM-15 y 3.23% (n=1) de CTXM-27. El 100% (n=31) de las cepas fueron portadoras del gen *TEM-1*.

García en el 2013 realizó un estudio retrospectivo para conocer la frecuencia y el patrón de sensibilidad a los antibióticos en cepas de *E. coli* identificadas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Básico de la Defensa San Carlos (San Fernando). Los resultados mostraron que 34 cepas de *E. coli* fueron productoras de BLEE. El 100% (n=34) de las cepas fue resistente a las cefalosporinas así como al aztreonam y ampicilina, mientras que el 20.6% (n=7) fue resistente a piperacilina/tazobactán, 38.2% (n=13) a amoxicilina/clavulánico, 65% (n=22) a ciprofloxacino y levofloxacino, en ambos casos, 14.7% (n=5) a amikacina, 23.5% (n=8) a gentamicina, 38.2% (n=13) a tobramicina, 50% (n=17) a trimetoprim/sulfametoxazol 13%, (n=4) a fosfomicina y 5.9% (n=2) a ceftioxitina.

En el 2010 Dannelle y colaboradores desarrollaron un método de PCR multiplex y uno de PCR sencillo para detectar los genes más comunes que codifican para betalactamasas en cepas de la familia *Enterobacteriaceae* aisladas de muestras clínicas que mostraban un fenotipo de resistencia hacia cefalosporinas, cefamicinas o carbapenemes de amplio espectro.

Tena y colaboradores en el 2010 investigaron la evolución del patrón de sensibilidad de *E. coli* en infecciones del tracto urinario en un periodo de cuatro años (2003-2007), donde analizaron datos de sensibilidad de 33,651 cepas de *E. coli*. Los antimicrobianos que fueron sensibles frente a *E. coli* fueron ampicilina, ácido nalidíxico y cotrimoxazol, con porcentajes de 37.7% (n=12,686), 60.5% (n=20,358) y 67.3% (n=22,647). Así mismo el

3.2% (n=1,076) de las cepas de *E. coli* fue portadora de genes de BLEE. Durante los cuatro años del estudio, se observó un incremento significativo de la frecuencia de cepas de *E. coli* portadoras de genes de BLEE.

Van y colaboradores en el 2008 realizaron un estudio del perfil antimicrobiano y de virulencia de cepas de *E. coli* recuperadas de alimentos, como la carne cruda, pescado y pollo que son vendidos en mercados de Vietnam. Un alto porcentaje de cepas aisladas de dichos alimentos fueron resistentes a uno o varios antibióticos. También se empleó un método de PCR multiplex para determinar los genes de betalactamasas, siendo el más frecuente el gen *TEM*.

Por otra parte Baraniak y colaboradores en el 2005 detectaron los genes de betalactamasas de espectro extendido en 17 cepas de la familia *Enterobacteriaceae* recuperadas en hospitales de cinco ciudades diferentes en Polonia, donde detectaron variantes del gen *TEM*. Estos autores también realizaron un análisis comparativo de la secuencia de los genes que codifican para betalactamasas, demostrando la existencia de diversas mutaciones.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en nuestro país en los últimos años ha ocurrido un incremento notable de la resistencia a los antibióticos en cepas cérvico vaginales de *E. coli*, principalmente a los betalactámicos, el presente trabajo contribuirá a establecer la distribución de los diferentes grupos de genes que codifican para betalactamasas en cepas de *E. coli* aisladas de mujeres con infecciones cérvico vaginales.

5. OBJETIVOS

General:

Establecer la frecuencia de los diferentes grupos de genes que codifican para betalactamasas en cepas vaginales de *E. coli*.

Particulares:

- Estimar la frecuencia de *E. coli* en las infecciones cérvico-vaginales.
- Determinar la resistencia a los antibióticos en las cepas de *E. coli* por el método de Kirby-Bauer.
- Identificar por PCR los diferentes grupos de genes que codifican para betalactamasas en las cepas de *E. coli*.
- Determinar los diferentes patrones de asociación de los genes de betalactamasas en las cepas de *E. coli*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras

Se seleccionó un grupo de aproximadamente 210 mujeres de edad reproductiva (20-40 años) con signos y síntomas de infección cérvico-vaginal (ICV) de los departamentos de ginecología de las Unidades Médicas Familiares No. 64 y No. 62 del IMSS, así como de la Clínica Universitaria de la Salud Integral de la FES-Iztacala (CUSI). A las pacientes seleccionadas y bajo firma de consentimiento informado, se les aplicó un cuestionario para obtener información como edad, antecedentes de infecciones cérvico vaginales, etc. Mujeres con tratamiento previo de antibióticos fueron excluidas del estudio. Por medio de hisopos estériles y con ayuda de un espejo vaginal se tomaron las muestras de la cavidad vaginal. Las muestras fueron sembradas en Agar Sangre, Sabouraud, S-110 y EMB y se incubaron a 37° C por 24 h. A partir del crecimiento bacteriano, una colonia con morfología típica de *E. coli* fue seleccionada para la identificación por las pruebas bioquímicas bacteriológicas como; indol, manitol, kligler, sacarosa, citrato y urea. Las cepas de *E. coli* identificadas fueron guardadas en caldo Luria-Bertani/glicerol.

Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos

Para probar la susceptibilidad y/o resistencia a los antibióticos en cada una de las cepas de *E. coli* se utilizó la técnica de Bauer-Kirby (Bauer *et al.*, 1966). Con un hisopo estéril se tomaron 5 colonias de cada cepa crecida en MH (Mueller Hinton) y se inocularon sobre la totalidad de la superficie del agar de Mueller-Hinton. Por último se tomó un sensidisco con los doce antimicrobianos a determinar (BIO-RAD) con una pinza estéril y se colocó sobre el agar de Mueller-Hinton. Así el antimicrobiano se difundió formando un halo de concentración, que inhibió o permitió el crecimiento de la bacteria en un tiempo de 24 horas a 37°C, así de esta manera las cepas se clasificaron como susceptibles (S) o resistentes (R) dependiendo del diámetro del halo de inhibición (el cual se midió con un vernier), conforme a las recomendaciones del fabricante respecto a los puntos de corte.

Extracción del DNA bacteriano

Las cepas de *E. coli* fueron sembradas en el medio de Mueller-Hinton y se incubaron a 37°C por 24 horas; se realizó la extracción del DNA bacteriano por ebullición, para lo cual varias colonias fueron tomadas por medio de un asa estéril y fueron suspendidas en tubos de rosca de 16x150 que contenían 2 mL de agua desionizada estéril. Las muestras se agitaron en un vortex durante 20 segundos y posteriormente los tubos fueron colocados en baño María (100°C) por 20 minutos; los tubos se colocaron en hielo por 10 minutos. Posteriormente 1.5 mL de cada muestra fue depositada en un tubo eppendorf nuevo y estéril y se centrifugó por 10 minutos a 14,000 rpm; el sobrenadante que contenía el DNA bacteriano fue separado en otro tubo eppendorf y se guardó a -20° C, hasta su utilización para las reacciones de la PCR.

La identificación de las cepas de *E. coli* se realizó por PCR convencional mediante la amplificación del gen *16SrRNA* conforme a lo descrito previamente (Momtaz *et al.*, 2013). La cepa de *E. coli* ATCC 11775 fue utilizada como control positivo.

Identificación de los genes de betalactamasas por PCR multiplex

Las condiciones de PCR y los oligonucleótidos para identificar cada grupo de genes que codifican para betalactamasas se realizó mediante el método de PCR Multiplex conforme a lo descrito por Dannelle en el 2010; para lo cual se utilizó el equipo comercial Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™) (1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 20 microlitros, 1 microlitro de cada oligonucleótido (Sigma-Genosys) (Tabla 5), 10 microlitros de Kapa Taq, 3 microlitros de ADN molde, y el volumen restante de agua libre de nucleasas. Las condiciones para la amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 10 minutos a 94°C; 30 ciclos a 94°C por 40 segundos, para la alineación a 60°C por 40 segundos y 72°C por 1 minuto y la extensión final de 72°C durante 7 minutos.

| PCR | Gen | oligonucleótido | Secuencia del primer (5'-3') | Tamaño del amplicón (pb) |
|--|---|--|--|--------------------------|
| Multiplex I TEM,SHV y OXA-1- like | Variantes TEM incluyendo TEM-1 y TEM-2 | MultiTSO-T_for MultiTSO-T_rev | CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC | 800 |
| | Variantes SHV incluyendo SHV-1 | MultiTSO-S_for MultiTSO-S_rev | AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC ATCCCGCAGATAAATCACCAC | 713 |
| | OXA-1, OXA-4 y OXA-30 | MultiTSO-O_for MultiTSO-O_rev | GGCACCAGATTCAACTTTCAAG GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG | 564 |
| Multiplex II CTX-M grupos 1, 2 y 9. | Variantes de CTX-M grupo 1 incluyendo CTX-M- 1,CTX-M-3 y CTX-M-15 | MultiCTXMGp1_for MultiCTXMGp1- 2_rev | TTAGGAARTGTGCCGCTGYA CGATATCGTTGGTGGTRCCAT | 688 |
| | Variantes de CTX-M grupo 2 incluyendo CTX-M-2 | MultiCTXMGp2_for MultiCTXMGp1- 2_rev | CGTTAACGGCACGATGAC CGATATCGTTGGTGGTRCCAT | 404 |
| | Variantes de CTX-M grupo 9 incluyendo CTX-M-9 y CTX-M-14 | MultiCTXMGp9_for MultiCTXMGp9_rev | TCAAGCCTGCCGATCTGGT TGATTCTCGCCGCTGAAG | 561 |
| CTX-M- grupo 8/25 | CTX-Mg8/25_for CTX-Mg8/25_rev b | AACRCRCAGACGCTCTAC TCGAGCCGGAASGTGYAT | 326 | |
| Multiplex III ACC,FOX, MOX, DHA, CIT y EBC | ACC-1 y ACC-2 | MultiCaseACC_for MultiCaseACC_rev | CACCTCCAGCGACTTGTTAC GTTAGCCAGCATCACGATCC | 346 |
| | FOX-1 a FOX-5 | MultiCaseFOX_for MultiCaseFOX_rev | CTACAGTGCGGGTGGTTT CTATTTGCGGCCAGGTGA | 162 |
| | MOX- 1,MOX-2, CMY-1, CMY-8 a CMY-11 y CMY-19 | MultiCaseMOX_for MultiCaseMOX_rev | GCAACAACGACAATCCATCCT GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA | 895 |
| | DHA-1 y DHA-2 | MultiCaseDHA_for MultiCaseDHA_rev | TGATGGCACAGCAGGATATTC GCTTTGACTCTTTCGGTATTTCG | 997 |
| | LAT-1 a LAT-3, BIL- 1, CMY-2 a CMY-7, | MultiCaseCIT_for MultiCaseCIT_rev | CGAAGAGGCAATGACCAGAC ACGGACAGGGTTAGGATAGY | 538 |

| | | | | |
|---|--|--------------------------------------|--|-----|
| | CMY-12 a CMY-18 y CMY- 21 a CMY-23 | | | |
| | ACT-1 y MIR-1 | MultiCaseEBC_for MultiCaseEBC_rev | CGGTAAAGCCGATGTTGCG AGCCTAACCCCTGATACA | 683 |
| Multiplex IV VEB,PER y GES | GES-1 a GES-9 y GES-11 | MultiGES_for MultiGES_rev | AGTCGGCTAGACCGGAAAG TTTGTCCGTGCTCAGGAT | 399 |
| | PER-1 y PER-3 | MultiPER_for MultiPER_rev | GCTCCGATAATGAAAGCGT TTCGGCTTGACTCGGCTGA | 520 |
| | VEB-1 a VEB-6 | MultiVEB_for MultiVEB_rev | CATTTCCCGATGCAAAGCGT CGAAGTTTCTTTGGACTCTG | 648 |
| Multiplex V GES y OXA-48- like | GES-1 a GES-9 y GES-11 | MultiGES_for MultiGES_rev | AGTCGGCTAGACCGGAAAG TTTGTCCGTGCTCAGGAT | 399 |
| | OXA-48-like | MultiOXA-48_for MultiOXA-48_rev | GCTTGATCGCCCTCGATT GATTTGCTCCGTGGCCGAAA | 281 |
| Multiplex VI IMP, VIM y KPC | Variantes de IMP excepto IMP-9, IMP- 16, IMP-18, IMP-22 y IMP-25 | MultiIMP_for MultiIMP_rev | TTGACACTCCATTTACDG GATYGAGAATTAAGCCACYCT | 139 |
| | Variantes de VIM incluyendo VIM-1 y VIM-2 | MultiVIM_for MultiVIM_rev | GATGGTGTTTGGTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG | 390 |
| | KPC-1 a KPC-5 | MultiKPC_for MultiKPC_rev | CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC ACGACGGCATAGTCATTTGC | 538 |

Tabla 5. Oligonucleótidos que se utilizaron para la detección de los genes que codifican para betalactamasas en las cepas de *E. coli*.

Electroforesis

Los amplicones obtenidos de la PCR se observaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%; a la cual se le agregaron 0.3 μ L de Midori Green (BIORAD) para su visualización; las condiciones de corrimiento fueron: 120 volts, 94 miliampers por un tiempo de 35 minutos. Los tamaños de los amplicones fueron comparados con un marcador de 100 pb y los geles se observaron bajo luz UV y fueron fotografiados con el sistema de foto documentación GEL LOGIC 100 (KODAK).

7. RESULTADOS

Infecciones cérvico vaginales

A partir de las 210 mujeres estudiadas con signos y síntomas de infecciones cérvico-vaginales, *E. coli* fue identificada por métodos microbiológicos y por PCR mediante la amplificación del gen *16SrRNA* (Imagen 1) en el 95% de las muestras vaginales (n= 200) (Figura 2).

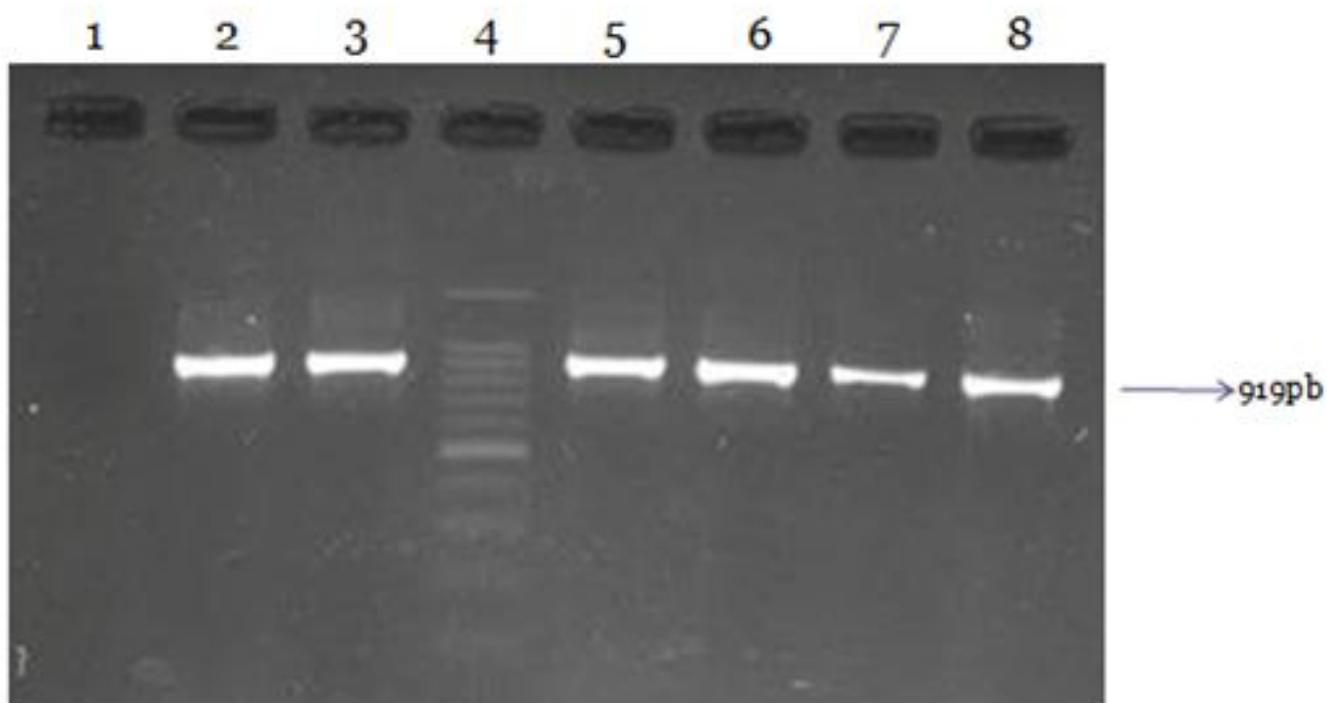


Imagen 1. Identificación del gen *16SrRNA* en las cepas de *E. coli*. Carriles 2-3 y 6-8 cepas de *E. coli*. Carril 1: control negativo (sin DNA molde). Carril 5: Control positivo (*E. coli* ATCC 11775). Carril 4: MWM (100 pb).

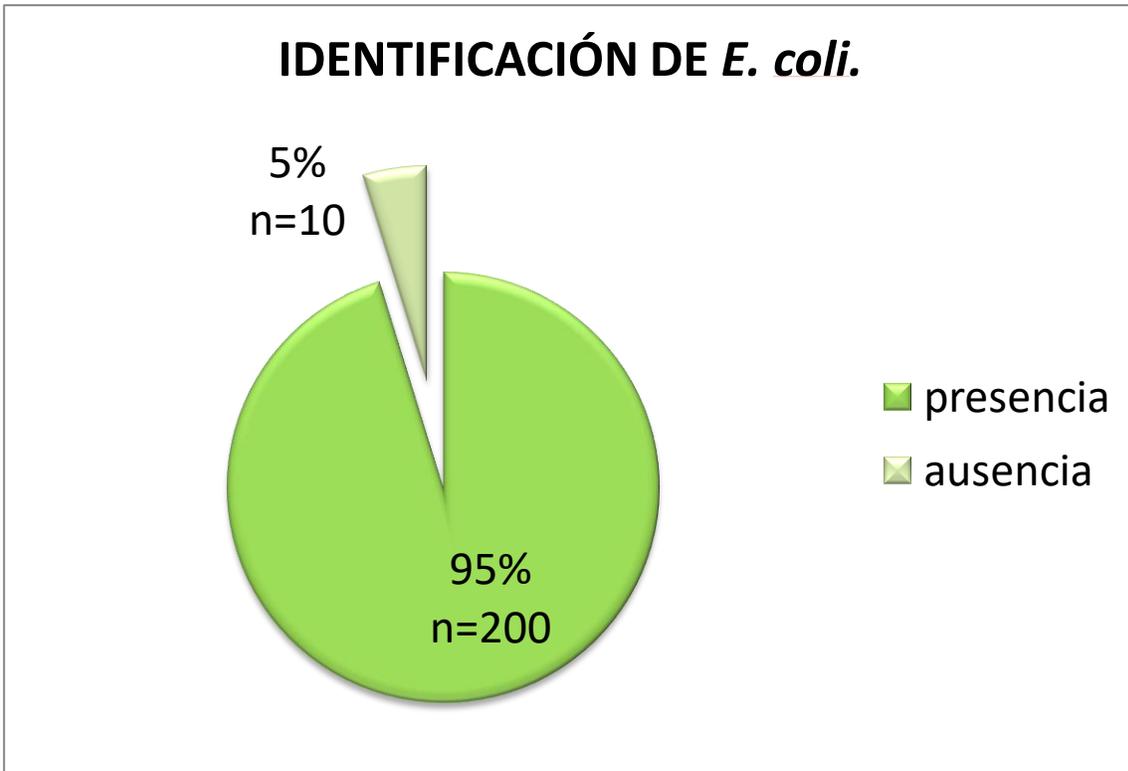


Figura 2. Porcentaje de cepas *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones cérvico vaginales.

Edad de las pacientes

El rango de edad de las pacientes más abundante fue de 31 a 50 años con 43 % (n= 86), seguido por 51 a 70 años con 30 % (n= 60), 18 a 30 años con el 21 % (n=42) y 71 a 90 años con el 4 % (n=8). En el 2 % (n=4) de las mujeres no se determinó la edad (Figura 3).

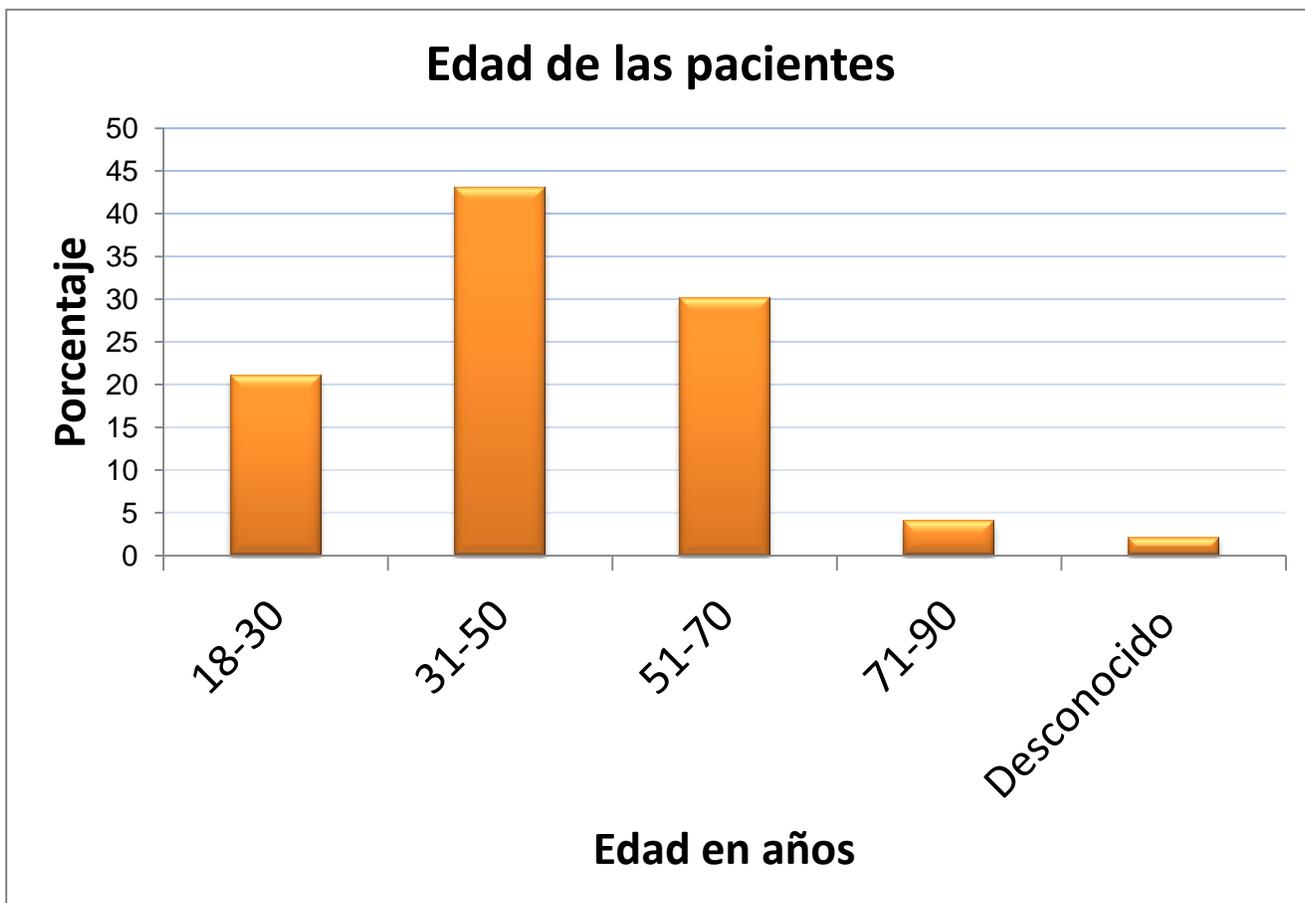


Figura 3. Porcentaje de edad de las mujeres estudiadas.

Resistencia a los antibióticos

Un mayor porcentaje de cepas de *E. coli* fue resistente a los antibióticos betalactámicos, como ampicilina (AM) con un 74% (n=151), carbenicilina (CB) con 63% (n=129) y cefalotina (CF) con un 54% (n=110). Seguido de nitrofurantoina (NF) con un 51% (n=104) y trimetoprim/sulfametoxazol (SXT) con un 50% (n=102). Los antibióticos con menor porcentaje de resistencia fueron amikacina (AK) con un 18% (n=37) y cloranfenicol (CL) con un 21% (n=43) (Figura 4).

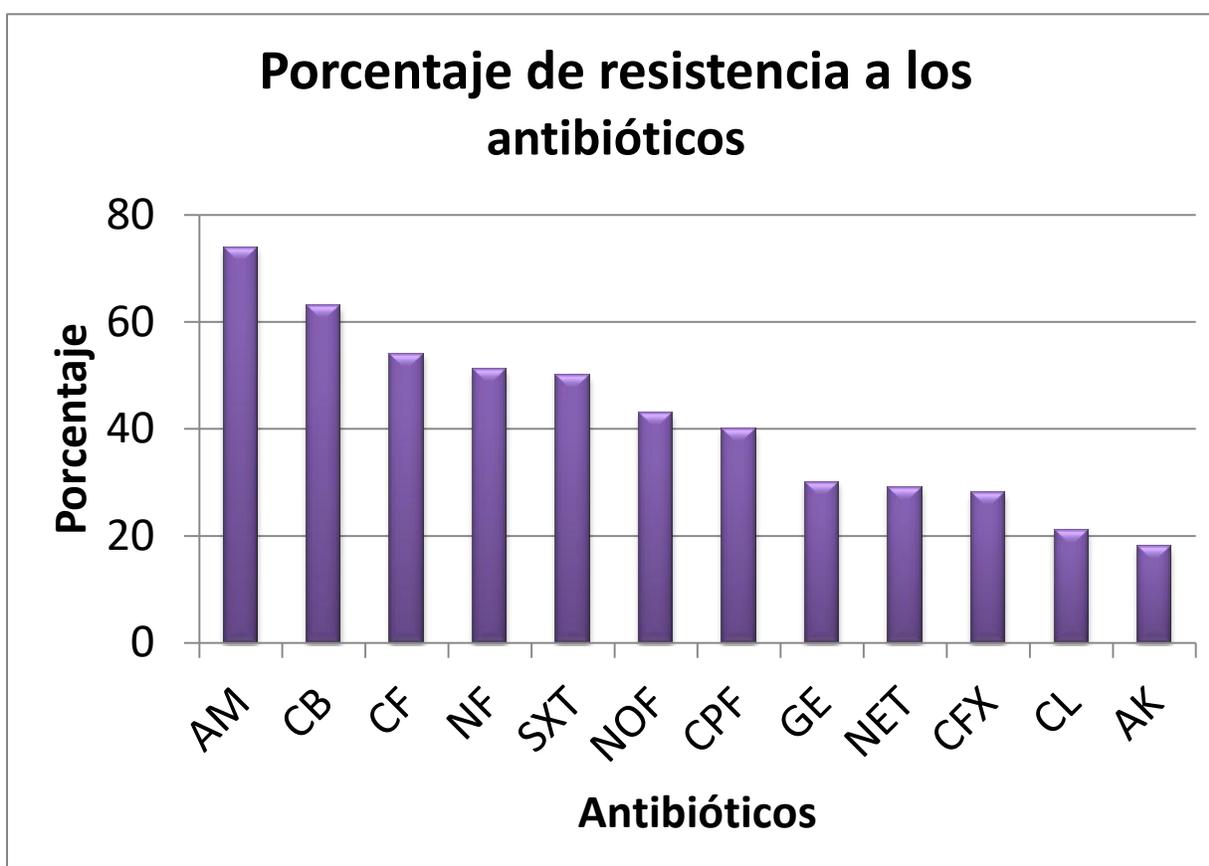


Figura 4. Porcentaje de resistencia a los antibióticos en cepas de *E. coli* cérvico vaginales. AM= Ampicilina, CB=Carbenicilina, CF=Cefalotina, NF= Nitrofurantoína, SXT=Trimetoprim con sulfametoxazol, NOF=Norfloxacina, CPF=Ciprofloxacina, GE=Gentamicina, NET=Netilmicina, CFX=Cefotaxima, CL=Cloranfenicol y AK=Amikacina.

DetECCIÓN DE GENES QUE CODIFICAN BETA-LACTAMASAS

En este estudio se analizó por PCR la presencia de 21 genes de β -lactamasas en las cepas de *E. coli* (n=200), de los cuales solo 14 de ellos se lograron identificar en las cepas. El gen *TEM* estuvo presente en el 61.5% (n=123), *SHV* en 35.5% (n=71) (Imagen 2), *OXA-1*, *OXA-4* y *OXA-30* en un 24.5% (n=49), para *CTXM-1*, *CTXM-3* y *CTXM-15* un 9.5% (n=19), para *CTXM-2* 11.5% (n=23), para *CTXM-9* y *CTXM-14* un 5% (n=10), para *CTXM-8*, *CTXM-25*, *CTXM-26* y *CTXM-39*, *40* y *41* es el 2% (n=4), para *LAT-1* 10.5% (n=21) (Imagen 3), para *ACT-1* y *ACT-2* un 8.5% (n=17), para *MOX-1* y *MOX-2* 1.5% (n=3), para *VEB-1* a *VEB-6* un 0.5% (n=1) (Imagen 4), para *IMP* un 26.5% (n=53), para *VIM-1* y *VIM-2* 8.5% (n=17), para *KPC-1* a *KPC-5* 0.5% (n=1) (Imagen 5) y los genes *ACC-1*, *ACC-2*, *FOX-1* a *FOX-5*, *DHA-1*, *DHA-2*, *GES-1* a *GES-9*, *PER-1*, *PER-3* y *OXA-48* no fueron identificados en ninguna de las cepas estudiadas. (Tabla 6).

| Gen | Numero de cepas (n=200) | Porcentaje |
|--|-------------------------|------------|
| <i>TEM</i> | 123 | 61.5 |
| <i>SHV</i> | 71 | 35.5 |
| <i>OXA-1</i>, <i>OXA-4</i> y <i>OXA-30</i> | 49 | 24.5 |
| <i>CTXM-1</i>, <i>3</i> y <i>15</i> | 19 | 9.5 |
| <i>CTXM-2</i> | 23 | 11.5 |
| <i>CTXM-9</i> y <i>CTXM-14</i> | 10 | 5 |
| <i>CTMX-8</i>, <i>25</i>, <i>26</i> y <i>CTXM-39</i>, <i>40</i> y <i>41</i> | 4 | 2 |
| <i>ACC-1</i> y <i>ACC-2</i> | 0 | 0 |
| <i>FOX-1</i> a <i>FOX-5</i> | 0 | 0 |

| | | |
|----------------------|----|------|
| MOX-1 y MOX-2 | 3 | 1.5 |
| DHA-1 y DHA-2 | 0 | 0 |
| LAT-1 | 21 | 10.5 |
| ACT-1 y ACT-2 | 17 | 8.5 |
| GES-1 a GES-9 | 0 | 0 |
| PER-1 y PER-3 | 0 | 0 |
| VEB-1 a VEB-6 | 1 | 0.5 |
| OXA-48 | 0 | 0 |
| IMP | 53 | 26.5 |
| VIM-1 y VIM-2 | 17 | 8.5 |
| KPC-1 a KPC-5 | 1 | 0.5 |

Tabla 6. Porcentaje de cepas de *E. coli* portadoras de los diferentes genes de betalactamasas.

Patrones de asociación de genes de betalactamasas con fenotipos de resistencia a antibióticos

En las cepas de *E. coli* se encontraron trece diferentes patrones de genes que codifican para betalactamasas en asociación con fenotipos de resistencia a antibióticos (tabla 7). El patrón no. 1 formado por los genotipos *TEM* y *OXA*, en asociación con los fenotipos de resistencia AM, CB, CF, CFX, CPF y NOF fue el más frecuente con el 13.5% (n=27), seguido por el patrón no. 2 con el 3.5% (n=7). Los fenotipos de resistencia a Ampicilina, Carbenicilina, Cefalotina, Cefotaxima y Norfloxacin fueron encontrados en el 18% de las cepas (n=36), principalmente en los patrones No. 1 al 4 (Tabla 7). Por otro lado el patrón con más asociación de genes de betalactamasas fue el No. 5 con cinco asociaciones presente en un 0.5% (n=1), mientras que el patrón No. 2 con un 3.5% (n=7) presentó una asociación de dos genes asociados fenotípicamente a nueve antibióticos (Tabla 7).

| No. de patrón | Fenotipos. | Genotipos | No. de cepas | Porcentaje |
|---------------|--|--------------------------------------|--------------|------------|
| 1 | AM, CB, CF, CFX, CPF, NOF | <i>TEM, OXA</i> | 27 | 13.5 |
| 2 | AM, CB, CF, CFX, CPF, NF, GE, NET, NOF | <i>SHV, OXA</i> | 7 | 3.5 |
| 3 | | <i>IMP, VIM</i> | 4 | 2 |
| 4 | AM, CB, CF, CFX, CPF, NOF, SXT | <i>TEM, SHV, OXA</i> | 2 | 1 |
| 5 | CF, NF | <i>SHV, OXA, CTXM-2, CTXM-9, IMP</i> | 1 | 0.5 |
| 6 | CF, NF | <i>TEM, OXA, IMP, VIM</i> | 1 | 0.5 |
| 7 | NF | <i>LAT-1, ACT-1, IMP, VIM</i> | 1 | 0.5 |
| 8 | NF | <i>IMP, VIM, KPC</i> | 1 | 0.5 |
| 9 | AM, CL, NF, | <i>CTXM-1,</i> | 1 | 0.5 |

| | | | | |
|-----------|-------------------------------------|---------------------------------|---|-----|
| | GE, NET, NOF, SXT | <i>CTXM-9</i> | | |
| 10 | | <i>TEM, SHV</i> | 1 | 0.5 |
| 11 | AM, CFX, CPF, GE, NOF, SXT | <i>LAT, ACT</i> | 1 | 0.5 |
| 12 | AM, CB, CPF, NF | <i>CTXM-9,</i> <i>CTXM-8</i> | 1 | 0.5 |
| 13 | AM, CB, CPF, NF, GE, NOF, SXT | <i>CTXM-2,</i> <i>CTXM-8</i> | 1 | 0.5 |

Tabla 7. Patrones de asociación de genotipos de betalactamasas con fenotipos de resistencia a los antibióticos en las cepas de *E. coli*.

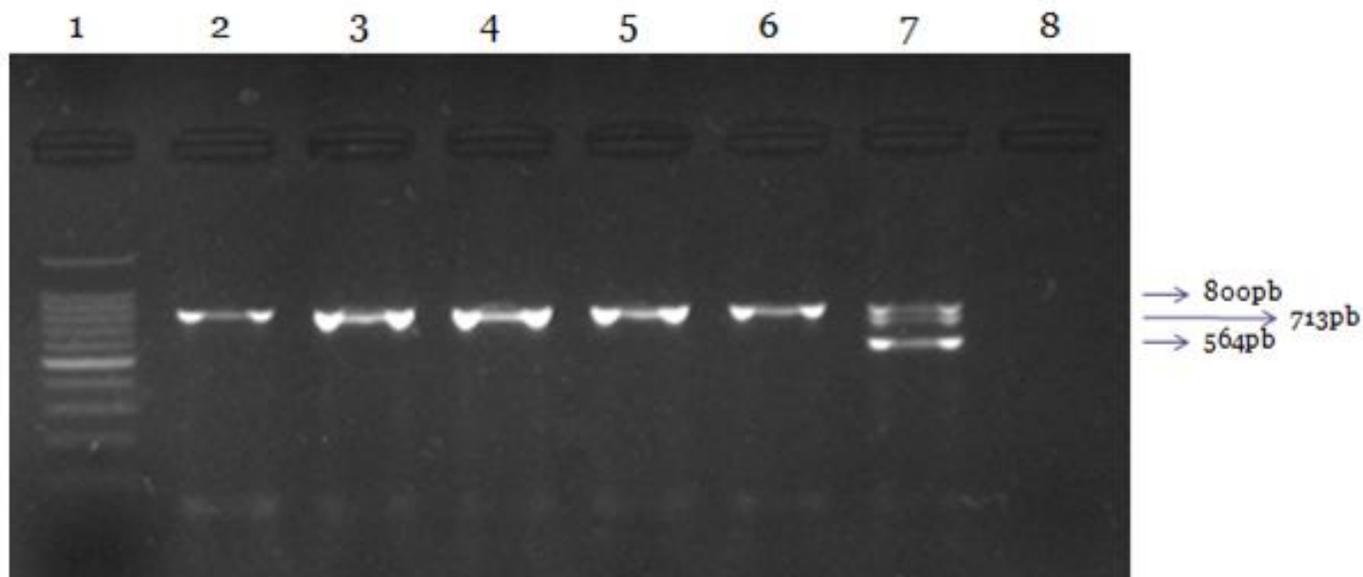


Imagen 2. Identificación por PCR multiplex de los genes de betalactamasas en las cepas de *E. coli*. Carril 1: MWM (100 pb). Carril 2: Control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. Clin.). Carril 3-6: *TEM* (800 pb). Carril 7: *TEM* (800 pb), *SHV* (713 pb) y *OXA1-4-30* (564 pb). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

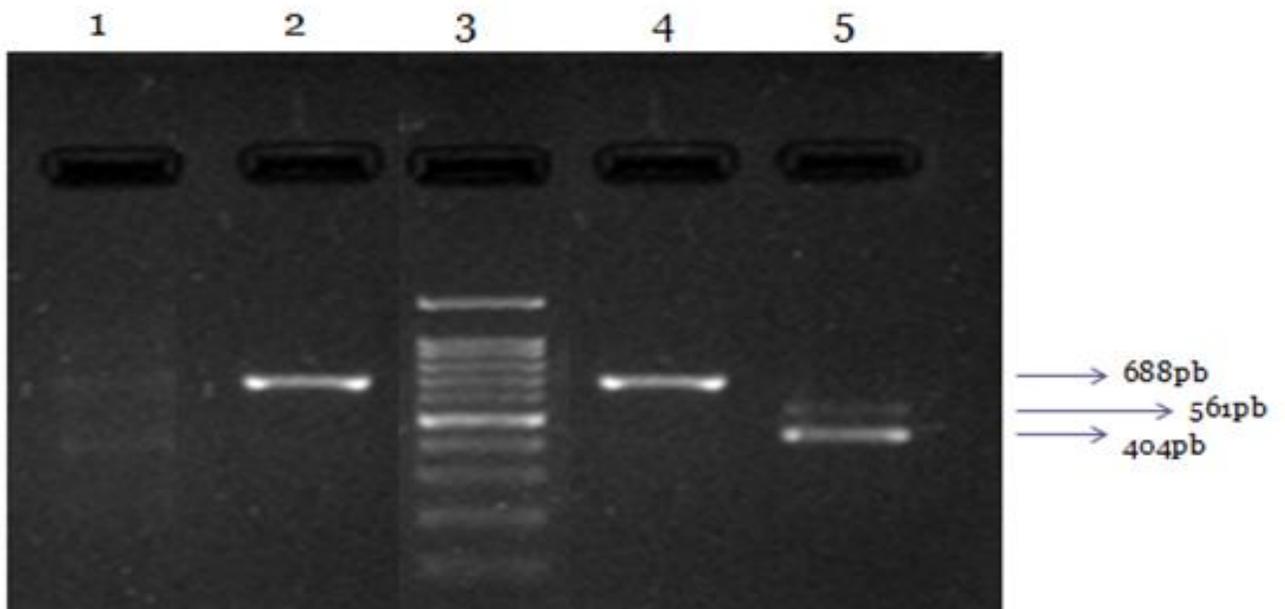


Imagen 3. Identificación por PCR multiplex de los genes de betalactamasas en las cepas *E. coli*. Carril 1: control negativo (sin DNA molde). Carril 2: *CTX-M* grupo 1 (688 pb). Carril 3: MWM (100 pb). Carril 4: Control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab Clin.). Carril 5: *CTX-M* grupo 2 (404 pb) y *CTX-M* grupo 9 (561 pb).

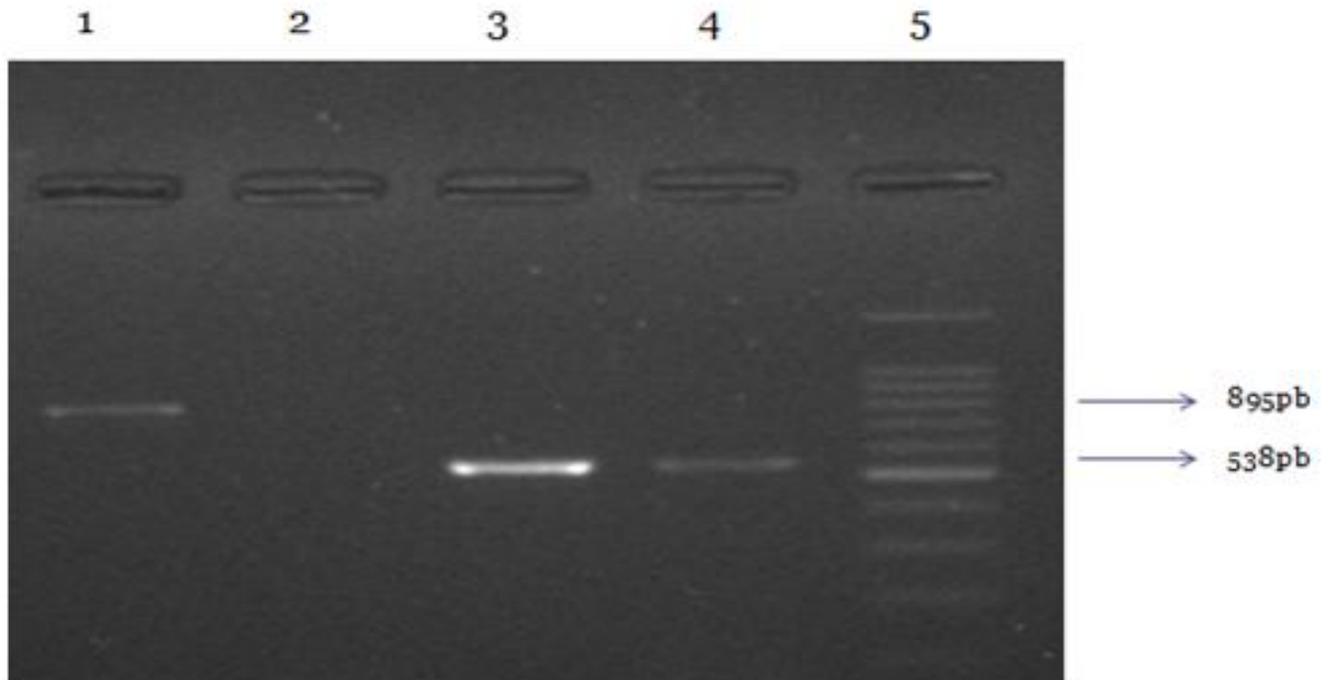


Imagen 4. Identificación por PCR multiplex de los genes de betalactamasas en las cepas *E. coli*. Carril 1: *MOX1-2*, *CMY1-8-11* y *DHA1-2* (895 pb). Carril 2: Control negativo (sin DNA molde). Carril 3: *LAT* (538 pb). Carril 4: Control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. Clin.). Carril 5: MWM (100 pb).

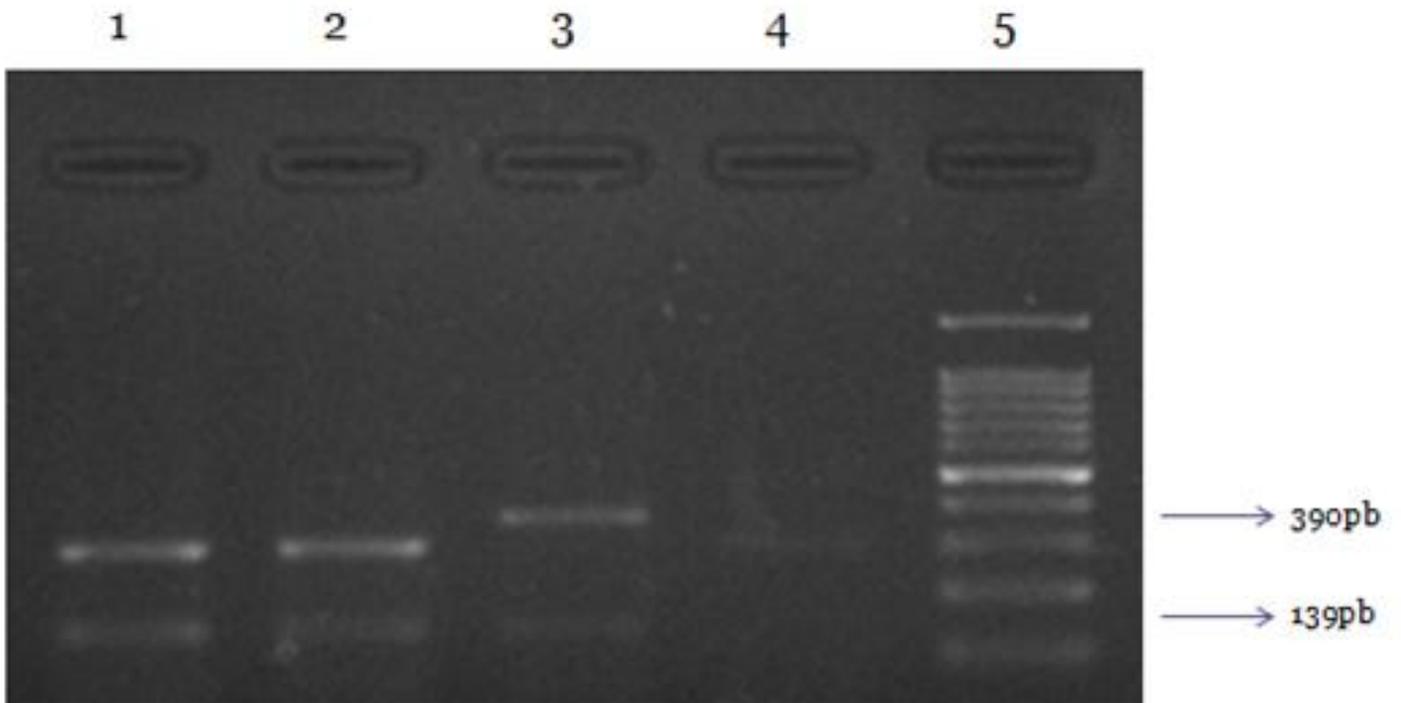


Imagen 5. Identificación por PCR multiplex de los genes de betalactamasas en las cepas de *E. coli*. Carril 1: *IMP* (139 pb). Carril 2: Control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. Clin.). Carril 3: *IMP* (139 pb) y *VIM1-2* (390 pb). Carril 4: Control negativo (sin DNA molde). Carril 5: MWM (100 pb).

8. DISCUSIÓN

Pacientes estudiadas

En este estudio se analizaron los exudados vaginales de 210 mujeres con infecciones cérvico-vaginales atendidas en las unidades médicas No. 62 y 64 de IMSS y en la Clínica Universitaria de la Salud Integral CUSI, FES Iztacala, UNAM, donde *E. coli* fue identificada en el 95% (n=200) de las muestras por las pruebas bioquímicas tradicionales y por PCR mediante amplificación del gen *16SrRNA* (Imagen 1). La elevada frecuencia de *E. coli* en las infecciones cérvico vaginales es muy superior a lo reportado por Flores *et al.*, (2003), en un estudio realizado en mujeres infectadas en el Hospital Juárez de la Ciudad de México. Estos autores identificaron a *E. coli* en el 13.4% (n=916) de los cultivos cérvico vaginales, y también es superior al descrito en un estudio realizado en 425 mujeres con infecciones cérvico-vaginales, en donde *E. coli* fue identificada en el 23% (n=96) (Padilla *et al.*, 2007). En otro estudio realizado en mujeres embarazadas con infecciones cérvico vaginales (n=2135) se identificó a *E. coli* en el 15.5% (n=330) de las muestras (García *et al.*, 2017). La elevada frecuencia de *E. coli* en las infecciones cérvico vaginales puede deberse a que en las mujeres la distancia desde el colon a la abertura uretral y la zona vaginal es muy corta, lo que permite frecuentemente las infecciones por *E. coli* (Molina y Manjarrez, 2015), no solamente las infecciones vaginales sino también las de las vías urinarias, por ejemplo en un estudio realizado en el Hospital de la Mujer de Culiacán, Sinaloa, se encontró a *E. coli* uropatógena asociada al 74.4% (n=72) de las infecciones de las vías urinarias (UTIs) (Acosta *et al.*, 2014).

En este estudio se encontró que las pacientes entre 31 a 50 años fueron las que presentaron más frecuencia de infecciones cérvico vaginales (figura 3). Se ha descrito que el 80% de la población femenina entre 18 a 40 años con vida sexual activa presenta mayor probabilidad de adquirir infecciones vaginales (Molina y Eslava, 2015). En un estudio realizado por Sánchez *et al.*, (2010) se encontró que las adolescentes entre 12 y 20 años fueron más propensas a infecciones de este tipo con un 70% (n=70), este resultado se lo atribuyen a un mal hábito higiénico. Por otra parte en un estudio realizado en mujeres embarazadas de 15 a 35 años se encontró que la mayoría de las infecciones vaginales ocurrió entre los 15 y 19 años con un 36.2% (n=773) (García *et al.*, 2017), lo cual coincide con lo descrito por Sánchez *et al.*, (2010).

Por otro lado se ha descrito que la frecuencia de *E. coli* en mujeres menopáusicas entre 38 a 65 es del 3.7% (n=18) (González *et al.*, en el 2007), la baja frecuencia que se atribuye al déficit estrógeno que provoca que el epitelio vaginal se adelgace y que en el moco vaginal sólo se encuentren células parabasales e intermedias.

Resistencia a los antibióticos

El tratamiento de las infecciones cérvico vaginales por *E. coli* se ha complicado recientemente debido a la selección de cepas resistentes a los antibióticos (Shaikh *et al.*, 2015). La resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos se debe principalmente a que *E. coli* es portadora de numerosos genes que codifican para betalactamasas, las cuales hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico del núcleo estructural (ácido 6-aminopenicilámico), provocando la formación de ácido penicilóico sin actividad antimicrobiana (Tavares, 2001). Los genes que codifican para betalactamasas frecuentemente se encuentran en plásmidos, transposones e integrones (Pérez y Robles 2013).

En este estudio se encontró que la mayoría de las cepas de *E. coli* fue resistente a ampicilina (AM) con el 74% (n=151), carbencilina (CB) 63% (n=129) y cefalotina (CF) 54% (n=110) (Figura 4). Estos porcentajes son semejantes a los descritos en cepas de *E. coli* obtenidas de mujeres con infecciones urinarias en México, en donde la resistencia para ampicilina/sulbactam fue del 75.9%, ampicilina 55.2% y trimetoprim 56.1% (Lopes *et al.*, 2014). En este estudio la resistencia a ampicilina en las cepas vaginales de *E. coli* fue inferior al 96.6% descrita en cepas UPEC (Alyamani *et al.*, 2017), y también al 94.6% detectado en cepas de *E. coli* cérvico vaginales (Rashki, 2014)

Los antibióticos a los que las cepas de *E. coli* presentaron menor resistencia fueron amikacina con 18% (n=37), gentamicina con 30% (n=62) y cefotaxima con 28% (n=57) (Figura 4). Estos porcentajes son inferiores a los descritos por López *et al.*, (2014), para amikacina (93.5%), gentamicina (72.2%) y cefotaxima (78.9%) y también con los descritos por Rashki (2014) para amikacina (68.9%) y gentamicina (77.2%). Por el contrario se han descrito porcentajes de resistencia muy bajos en cepas UPEC para amikacina (0.5%) y gentamicina (13.4%) (Troya *et al.*, 2016).

En este estudio se encontró que el 50% (n=100) de las cepas de *E. coli* fue resistente al trimetoprim/sulfametoxazol (SXT), 40% (n=80) a ciprofloxacina (CPF), 43% (n=86) a norfloxacina (NOF) y 51% (n=102) a nitrofurantoína (NF) (Figura 4). Estos resultados coinciden con los encontrados en cepas UPEC, en donde el 56.7% de las cepas fue resistente al trimetoprim y 32.5% a ciprofloxacina (Guamán *et al.*, 2017).

Detección de genes que codifican betalactamasas en cepas de *E. coli*

Las infecciones cérvico-vaginales causadas por *E. coli* productoras de betalactamasas ha aumentado en los últimos años. Se ha reportado que entre los principales factores que influyen en la rápida diseminación de las cepas productoras de betalactamasas se encuentra el uso excesivo de antibióticos de amplio espectro (Barguigua *et al.*, 2013). En este estudio se encontró a *TEM* en el 62% (n=123) de las cepas de *E. coli* y a *SHV* en el 35.5% (n=71) (Tabla 6, Imagen 2). Estos resultados son semejantes con los descritos por Baraniak (2005) en cepas de la familia *Enterobacteriaceae* recuperadas en hospitales de cinco ciudades diferentes en Polonia, en donde detectó un alto porcentaje del gen *TEM*, además de otras variantes del mismo; también coinciden con los reportados en un estudio realizado sobre perfiles antimicrobianos y de virulencia en cepas de *E. coli* recuperadas de alimentos de granja, en Vietnam (Van *et al.*, 2008). Estos autores determinaron elevados porcentajes de los genes de betalactamasas, siendo el más frecuente *TEM*. Los altos porcentajes de *TEM* y *SHV* puede deberse al hecho de que estos genes se encuentran frecuentemente en plásmidos, lo que ha facilitado la propagación entre las bacterias, además de que a partir de ellas pudieron haber evolucionado otro tipo de betalactamasas como las de espectro extendido, como resultado de mutaciones en su centro activo, (García, 2013).

De manera global en este estudio la frecuencia de las variantes de los genes *CTX-M* fue del 28% (n=56) (Tabla 6). Estos resultados son inferiores a los descritos por Morgand *et al.*, (2014) en cepas de *E. coli* provenientes de hospitales pediátricos de París; teniendo como resultado un 97.2% de cepas portadoras del gen *CTX-M* y también son diferentes a los encontrados en cepas aisladas de infecciones del tracto urinario en Arabia Saudita, en donde la prevalencia para *CTX-M1* y *CTX-M15* fue del 46.7%, en ambos casos (Alyamani, 2017). Blanco *et al.*, (2016) ha descrito recientemente que el 53.7% de las cepas de *E. coli* aisladas de infecciones en el tracto urinario en Colombia fueron portadoras de

CTX-M15. Las diferencias de los estudios pueden deberse a la distribución geográfica, ya que se ha descrito que en los últimos años *CTX-M* de tipo BLEE son más prevalentes en cepas bacterianas de Europa y América del Sur (Pitout, 2008).

Por otro lado Rodríguez *et al.*, (2004) realizaron un amplio estudio en donde analizaron 112 cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infecciones urinarias. Estos autores reportaron que el 69% de las cepas de *E. coli* fue portadora del grupo *CTX-M*, dentro de las cuales el gen más frecuente fue *CTX-M-9*, seguido de *CTX-M-14*. También encontraron que el 32% de las cepas fue portadora del grupo *SHV* y solo un 6% para el grupo *TEM*.

Patrones de asociación de genes de betalactamasas en las cepas de *E. coli*

En este estudio se identificaron 13 diferentes patrones de asociación de genes que codifican para betalactamasas en asociación con fenotipos de resistencia a antibióticos (tabla 7). Los resultados dieron un total de 43 cepas, los que difieren con un estudio donde reportan únicamente 30 cepas (Sana *et al.*, 2011).

Es interesante hacer notar que la mayoría de los patrones presentaron la combinación de dos genes de betalactamasas siendo los más predominantes *TEM* y *OXA*, en asociación con los fenotipos de resistencia a ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cefotaxima y norfloxacin (Tabla 7). Estos resultados son diferentes a los reportados por Sana *et al.*, (2011), ya que la asociación de genes que se presentaron con mayor frecuencia fueron *CTX-M* y *OXA*. También son distintos a los resultados de Cortés *et al.*, (2017) donde los genes con mayor frecuencia de asociación fueron *CTX-M15* y *OXA1*.

El patrón de asociación de genes *TEM-SHV* en este estudio estuvo presente únicamente en 1 cepa, número que no muestra mayor diferencia con los resultados de Barreto *et al.*, (2009) donde dicha asociación estuvo presente en 2 cepas.

Por otra parte, las cepas con los patrones de genes *IMP-VIM* y *TEM-SHV* mostraron sensibilidad fenotípica a los antimicrobianos probados en este estudio. Estos resultados difieren con lo reportado en un estudio de cepas de *E. coli* provenientes de muestras fecales de humanos en México donde las cepas con la asociación entre todos los genes implicados en el estudio mostraron resistencia fenotípica a esos antibióticos. En ese

mismo estudio el antibiótico que presentó mayor resistencia fue ampicilina, presente en un 100% (n=11) de las asociaciones de genes de betalactamasas, lo que difiere de igual forma con lo obtenido en este estudio ya que los antibióticos ampicilina y nitrofurantoína fueron los que presentaron mayor frecuencia en los patrones de asociación con un 13.4% (n=7).

Por otra parte el patrón con más asociación de genes es el cinco con 0.5% (n=1), presentando una resistencia únicamente a dos antibióticos, cefalotina y nitrofurantoína, en contraste con el patrón número dos con un 3.5% (n=7) presentando una asociación de dos genes (*SHV* y *OXA*) y una resistencia fenotípica a nueve antibióticos (tabla 7). Con dichos resultados se puede observar que a pesar de tener una asociación mayor de genes no quiere decir que presentar una resistencia fenotípica a varios antibióticos, sin embargo al tener una asociación de dos genes puede presentar una resistencia fenotípica a un mayor número de antibióticos.

9. CONCLUSIONES

- En este estudio *E. coli* fue la principal bacteria asociada a las infecciones cérvico-vaginales de las mujeres de la zona norte del Estado de México muestreadas.
- La frecuencia de *E. coli* fue más elevada en mujeres de edad reproductiva.
- Las cepas de *E. coli* fueron resistentes con mayor frecuencia a la ampicilina, carbenicilina, cefalotina, nitrofurantoína y trimetoprim/sulfametoxazol.
- Los genotipos de betalactamasas *TEM* y *SHV* fueron los más frecuentes entre las cepas de *E. coli*.
- Los genes *OXA-48*, *PER*, *GES*, *DHA*, *FOX* y *ACC* no fueron identificados en ninguna de las cepas.
- La combinación de los genes *TEM-OXA* en asociación con los fenotipos de resistencia a ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cefotaxima, ciprofloxacina y norfloxacina fue muy frecuente entre los patrones 1 y 4.
- Los resultados encontrados aquí demuestran la elevada frecuencia de cepas resistentes a los antibióticos en las cepas de *E. coli* causantes de infecciones vaginales, por lo que es indispensable implementar programas de monitoreo para mejorar las alternativas de tratamiento médico a fin de disminuir las infecciones por esta bacteria y evitar la propagación de cepas multiresistentes a los antibióticos.

10. LITERATURA CITADA

- Acosta, T., Ramos, M., Zamora, A. y Murillo, L. 2014. Prevalencia de infección de vías urinarias en pacientes hospitalizadas con amenaza de parto pretérmino. *Ginecología Obstetra México*. 82: 737-743.
- Al-Agamy M., Shibi, A., Hafez, M., Al-Ahdal, M., Memish, Z. y Khubnani, H. 2014. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Riyadh: emergence of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 13: 1-7.
- Alyamani, E., Anamil, M., Rayan, Y., Majed, A., Fayes, S. y Rechkina, E. 2017. The occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* carrying aminoglycoside resistance genes in urinary tract infections in Saudi Arabia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 16: 1-6.
- Ambler, R. 1980. The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 27: 321-331.
- Baraniak, A., Fiett, J., Mrówka, A., Walory, J., Hryniewicz, W. y Gniadkowski, M. 2005. Evolution of TEM-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Enterobacteriaceae Strains in Poland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49: 1872-1880.
- Barguigua, A., Otmani, F., Talmi, M., Zerouali, K. y Timinouni, M. 2013. Prevalence and types of extended spectrum β -lactamases among urinary *Escherichia coli* isolates in Moroccan community. *Microbiology Pathogenic*. 61: 16-62.
- Barreto, A., Guimaraes, B., Radhouani, H., Arapujo, C., Goncalves, A., Gaspar, E., Rodrigues, J., Igrejas, G. y Poeta, P. 2009. Detection of antibiotic resistant *E. coli* and *Enterococcus* spp. in stool of healthy growing children in Portugal. *Journal of Basic Microbiology*. 49: 503-512.
- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45: 493-496.
- Blanco, V., Maya, J., Correa, A., Perenguez, M., Muñoz, J., Motoa, G., Pallares, C., Rosso, F., Matta, L., Celis, Y., Garzón, M. y Villegas, M. 2016. Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 34: 559-565.

- Bush, K. 1988. β -lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clinical Microbiology*. 1: 109-123.
- Bush, K., Jacoby, G. y Medeiros, A. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents Chemother.* 39: 1211-1233.
- Cárdenas, P., Cruz, L., Gándara, R. y Pérez, H. 2014. Factores de virulencia bacteriana: la "inteligencia" de las bacterias. *Elementos*. 94: 35-43.
- Carrillo, R. y García, B. 2007. Betalactamasas de espectro extendido importancia clínica. *Asociación Española de Biopatología Médica*. 18-20.
- Chulain, M., Murray, A., Cormican, M. y Cobert, G. 2005. Antimicrobial resistance in *E.Coli* associated with urinary tract infection in the west of Ireland. *Medical Science*. 174: 6-9.
- Cortés, C., Lozano, Z., Torres, C., Alosno, A., Ríos, T., Castañeda, M., López, P., Navarro, A. y Rocha, G. 2017. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy humans in Mexico, including subclone ST131-B2-O25:H4-H30-Rx. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 9: 130-134.
- Dannelle, C., Da Costa, A., Drecreé, D., Favier, C. y Arlet, G. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobials Chemother.* 65: 490-495.
- Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J., Picard, B. y Denamur, E. 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*. 147: 1671-1676.
- Flores, R., Rivera, R., García, E. y Arriaga, M. 2003. Etiología de la infección cérvico vaginal en pacientes del Hospital Juárez de México. *Salud Pública de México*. 45: 694-697.
- García, M. 2013. *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido. *Resistencia. Revista Española de quimioterapia*. 24: 57-66.
- García, P. y Rodríguez, M. 2010. Enterobacterias. *Medicine*. 51: 26-31.
- García, P., Estrada, N. y Proenza, F. 2017. Infección vaginal en gestantes y su influencia en la morbilidad y mortalidad perinatal. *Médica Granma*. 21: 52-65.

- García, S., Pardos, M. y Castillo, J. 2010. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 28: 12-18.
- Giner, A., Canos, C., Rodilla, C. y Ferrer, G. 1996. Valoración de los inhibidores de las betalactamasas. Farmacia Hospitalaria. 20: 225-235.
- Gonzales, P., Ortiz, Z., Dávila, M. y Valencia, G. 2007. Infecciones cérvico-vaginales más frecuentes; prevalencia y factores de riesgo. Cubana Obstetra Ginecologica. 33: 10-15.
- Guamán, W., Tamayo, V., Villacís, J., Reyes, J., Muñoz, O., Torres, O., Paz, W., Vallejo, M., Echeverría, M., Satan, E., Muñoz, J. y Grijalva, R. 2017. Resistencia bacteriana de *Escherichia coli* uropatogénica en población nativa amerindia Kichwa de Ecuador. Facultad de Ciencias Médicas. 42: 32-41.
- Hall, R. y Collis, C. 1998. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: The role of gene cassettes and integrons. Drug Resistance Updates. 1: 109-119.
- Hilbert, S., Paulish, T., Mordechai, E., Adelson, M. y Trama, J. 2008. O serogroups, phylogeny, and virulence factors of cervico-vaginal and rectal *Escherichia coli* isolates, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 27: 1265-1268.
- López, B., Carrillo, C., Leyva, L., Orozco, H., Manjarrez, H., Arroyo, E., Moncada, B., Villanueva, R., Cortes, X. y Hernandez, C. 2014. Identification of Virulence Factors Genes in *Escherichia coli* Isolates from Women with Urinary Tract Infection in Mexico. Bio-Medical. (2014) 3-7.
- Molina, A. y Manjarrez, H. 2015. *Escherichia coli*, Infecciones urinarias. Departamento de Salud Pública. Visto 03/04/2017. 0:48.
- Molina, J. y Eslava, C. 2015. *Escherichia coli*. diarrogenica. Departamento de parasitología y microbiología. Visto 09/02/17. 09:21.
- Momtaz, H., Karimian, A., Madan, M., Dehkordi, SF., Ranjbar, R., Sarshar, M. y Souod, N. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 12: 8.
- Morgand, M., Vimont, S., Bleibtreu, A., Boyd, A., Vu, H., Zahar, J., Denamur, E. y Arlet, G. 2014. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* infections in children: Are community-acquired strains different from nosocomial strains?. Journal Medicine Microbiology. 304: 970-975.

- Mosquito, S., Ruíz, J., Bauer, J. y Ochoa, J. 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. Perú Medicina Experimental Salud Publica. 28: 56-648.
- Padilla, C., Lobos, O., Padilla, R., Fuentes, L. y Nuñez, L. 2007. Aislamiento de cepas de *Escherichia coli* desde casos clínicos de infección vaginal: asociación con otros microorganismos y susceptibilidad antibacteriana. Chilena de obstetricia y ginecología. 72: 222-228.
- Paniagua, C., Monroy, P., Uribe, G. y Vaca, P. 2016. PCR Análisis molecular, caracterización de bacterias y levaduras de interés médico. Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM. 33-45.
- Peleg, A. y Hooper, R. 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. The new England Journal of Medicine. 362: 1804-1813.
- Pérez, C. y Robles, C. 2013. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. Centro de investigación Biomédica. Revista Médica. 4: 188-190.
- Pitout, J. 2008. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. The lancet. 8: 159-166.
- Rashki, A. 2014. Cervico-vagino pathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Microbial Pathogenesis 75: 29-34.
- Rodríguez, B., Navarro, M., Romero, L., Martínez, M., Mniain, M., Perea, E. y Pascual, A. 2004. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in non hospitalized patients. Clinical Microbiology. 42: 89-94.
- Rodríguez, G. 2002. Principales características y diagnósticos de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México. 44: 464-475.
- Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruíz, J., Zarazaga, M., Vila, J. y Torres, C. 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48: 3996-4001.
- Sana, T., Rami, K., Racha, B., Fouad, D., Marcel, A., Hassan, M., Sani, H. y Monzer, H. 2011. Detection of genes TEM, OXA, SHV and CTX-M in 73 clinical isolates of *Escherichia coli* producers of extended spectrum β -lactamases and determination of their susceptibility to antibiotics. Arabic Journal of Antimicrobial Agents. 1: 1-6.

- Sánchez, V., Almiñaque, C., Borrego, L. y Formoso, M. 2010. Vulvovaginitis en niñas y adolescentes. *Cubana Obstetra Ginecologica*. 36: 73-85.
- Shaikh, S., Fatima, S., Shazi, S., Syed, M. y Mohammad, K. 2015. Antibiotic resistance and extended spectrum β -lactamases: types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22: 90-101.
- Tafur, D., Torres, A. y Villegas, M. 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *CIDEIM*. 12: 217-221.
- Tavares, W. 2001. Resistência bacteriana. In: Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos 3ª ed. Atheneu, São Paulo. p. 79.
- Tena, D., González, A., Gonzáles, J., Heredero, E., Illescas, S., Baranda, C. y Seseña, G. 2010. Evolución del patrón de sensibilidad de *Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario diagnosticadas en la comunidad durante el periodo 2003-2007. Estudio multicéntrico en Castilla la Mancha. *Revista Española de quimioterapia*. 23: 36-42.
- Troya, C., Herrera, D., Guevara, A., Obregón, M., Gaus, D., Larcos, D. y Sánchez, X. 2016. Monitoreo local de resistencia a los antibióticos en *Escherichia coli* en una zona rural de Ecuador: más allá del modelo biomédico. <http://dx.doi.org/10.23936/pfr.v1i1.128.g190> (visto 25 Octubre 2017).
- Van, T., Chin, J., Champ, T., Tran, L. y Coloe, P. 2008. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: An analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *International Journal of Food Microbiology*. 124: 217-223.
- Warjri, I., Dutta, T., Lalzampaia, H. y Chandra, R. 2015. Detección y caracterización de β -lactamasas de espectro extendido (*bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{SHV}) productoras de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Klebsiella pneumoniae* aislados de humanos en Mizoram. *Veterinary World*. 8: 599-604.
- World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/ (visto 9 Noviembre 2016).