

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS Y GENES DE
VIRULENCIA EN AISLAMIENTOS DE *E. coli* EN ADULTOS MAYORES
CON INFECCIÓN URINARIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA

PRESENTA

CARMEN NAYELI SOTO VARGAS



MÉXICO, D.F.

2012



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor: Rodolfo Pastelín Palacios
VOCAL:	Profesor: Raúl Garza Velasco
SECRETARIO:	Profesor: Rigoberto Hernández Castro
1er. SUPLENTE:	Profesor: Alejandro Camacho Cruz
2° SUPLENTE:	Profesor: Santiago Ávila Ríos

Sitio donde se desarrolló del tema:

Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Asesor del tema

Rigoberto Hernández Castro

Supervisora técnica

Erika Margarita Carrillo Casas

Sustentante

Carmen Nayeli Soto Vargas

DEDICATORIA

*A mis padres por su amor y apoyo incondicional,
por acompañarme durante todo este trayecto,
por enseñarme con su ejemplo a ser una persona de bien
y a luchar por mis sueños.*

*Mon âme sœur complètement à l'opposé: Ricardo
parce que avec toi tout semble magique
et parce que nous avançons main dans la main sur la vie,
vers notre but commun: être ensemble et heureux.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química que fue una segunda casa y el lugar donde me forme como profesionista, donde viví la mejor etapa de mi vida hasta hoy, pues en ella conocí a la mayoría de mis mejores amigos y a mi compañero de sueños.

Al Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada en el proyecto CONACyT-87586-salud-2008.

Al Dr. Rigoberto Hernández Castro por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por todas las oportunidades brindadas.

A la M. en C. Erika M. Carrillo Casas por guiarme, por sus enseñanzas, paciencia, apoyo y todos los consejos brindados para la realización de esta tesis y para el trabajo en el laboratorio.

Al profesor Raúl Garza Velasco por las correcciones a este trabajo y por sus consejos.

Al Dr. Rodolfo Pastelin Palacios por las correcciones a este trabajo, por sus consejos, paciencia y palabras de aliento.

A la Q.F.B. Daniela Alejandra López Banda por ser además de una de mis mejores amigas, mi compañera durante toda la carrera y esta etapa. Además de ser mi apoyo en las buenas, en las malas e incluso en las locuras.

A mis compañeros de laboratorio Mario y Maricarmen por hacer del laboratorio un lugar más divertido. A Adri y Liz por su ayuda al inicio de mi estancia. A Annia, Viri, Caro, Fer y Margarita por todos los momentos compartidos.

A mis amigos; Claudia, Dora, Pancho, Chio, Mike, Sofi y Cinthya por todos los momentos divertidos que hemos compartido, por su apoyo y por haber hecho de la estancia en la facultad una de las mejores etapas de mi vida, los quiero.

A mi papá por todo su amor, consejos e incluso regaños, que me ayudaron a conseguir todo lo que he logrado.

A mi mamá por su amor, apoyo, consejos, por ser mi amiga y por saber que siempre pase lo que pase todo tiene solución y puedo contar con ella.

A mis hermanos Marco y Monse por su apoyo, por todas las travesuras y por crecer conmigo.

A Ricardo por todo lo compartido durante estos años, por ser mi apoyo, mi mejor amigo y mi alma gemela totalmente opuesta.

A todos los miembros de mi familia que siempre me apoyan y alientan.

Índice

Abreviaturas

Resumen	1
Marco teórico.....	3
<i>Escherichia coli</i>	3
Infecciones del tracto urinario (ITU)	3
Clasificación	4
Epidemiología	6
Patogénesis	7
Factores de virulencia	9
Fimbrias y adhesinas	11
Fimbria tipo 1	12
Fimbria P.....	14
Fimbria S.....	15
Fimbria FIC	16
Pili común de <i>E. coli</i>	16
Toxinas	17
α -hemolisina.....	17
Factor citotóxico necrotizante tipo 1.....	17
Sistemas de captación de hierro	18
Invasinas.....	21
Grupos filogenéticos	22
Las ITU en México	24
Tratamiento	25
Planteamiento del problema.....	27
Objetivo general	27
Objetivos particulares.....	28
Hipótesis	28
Metodología.....	29
Materiales	30
Equipo.....	30

Reactivos	30
Métodos	31
Población de Estudio	31
Urocultivos	35
Identificación y sensibilidad a antibióticos	35
Conservación	35
Determinación de grupo filogenético	36
Identificación de genes de virulencia	37
Análisis estadístico	39
Resultados	40
Urocultivos	40
Distribución de grupo filogenético entre los aislamientos de <i>E. coli</i>	40
Susceptibilidad a antibióticos en los aislamientos de <i>E. coli</i>	41
Resistencia a antibióticos en los aislamientos de <i>E. coli</i> entre hombres y mujeres	44
Resistencia a antibióticos por grupo filogenético	45
Prevalencia de genes de virulencia entre los aislamientos de <i>E. coli</i>	47
Distribución de genes de virulencia entre los aislamientos de <i>E. coli</i>	49
en hombres y mujeres	
Distribución de genes de virulencia por grupo filogenético	50
Aislamientos multi-resistentes	52
Aislamientos resistentes a quinolonas y fluoroquinolonas	54
Discusión	55
Conclusiones	60
Bibliografía	61

Abreviaturas

AB	Antibiótico
AG	Aminoglucósidos
AMC	Amoxicilina/Ácido Clavulánico
AMK	Amicacina
AMP	Ampicilina
ATM	Aztreonam
BUA	Bacteriuria asintomática
C3G	Cefalosporinas de tercera generación
CAZ	Ceftazidima
CEP	Cefalotina
CIP	Ciprofloxacino
CFZ	Cefazolina
CNF-1	Factor citotóxico necrotizante 1, por sus siglas en inglés
CRO	Ceftriaxona
CTN	Cefotetan
CTX	Cefotaxima
CXM	Cefuroxima
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECP	<i>Pili</i> común de <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patógena extraintestinal
ESBL	<i>Escherichia coli</i> productora de β -lactamasas de espectro extendido
FEP	Cefepime
FOX	Cefoxitina
FV	Factores de virulencia
GAT	Gatifloxacina
GEN	Gentamicina
IPM	Imipenem
ITU	Infección del tracto urinario

kDa	Kilo Daltones
LVX	Levofloxacin
MEM	Meropenem
μ L	Micro litros
mM	Mili molar
MOX	Moxifloxacin
MP	Marcador de peso molecular
MR	Multiresistentes
NO-MR	No multiresistentes
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIP	Piperacilina
pmol	Pico moles
SAM	Ampicilina/Sulbactam
SXT	Trimetoprim/Sulfametoxazol
TAE	Tris-Ácido Acético-EDTA
TLC	Ticarcicilina/Ácido Clavulánico
TOB	Tobramicina
TZP	Piperacilina/Tazobactam
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonia
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena

Resumen

Las infecciones en el tracto urinario (ITU) representan un problema de salud mundial. Se estima que anualmente se presentan de 130 a 175 millones de casos alrededor del mundo, lo que genera un gasto de cerca de 6 millones de dólares (1). En humanos, *Escherichia coli* es el agente causal más frecuente de ITU, causa más del 80% de ellas y abarca todos los rangos de edad (2).

En los adultos mayores, las ITU son las infecciones más frecuentes; de ellas *E. coli* es el agente más aislado, identificándose en más del 50% de los casos; otros agentes menos frecuentes son *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus spp* (3,4). En adultos mayores las ITU cursan con una presentación clínica atípica, alta prevalencia de comorbilidades y riesgo incrementado de interacciones fármaco-fármaco y enfermedad-enfermedad (5).

En México no contamos con una vigilancia exhaustiva de las ITU, por lo cual es complicado estimar su verdadera incidencia (6). Los estudios realizados alrededor del mundo indican que existe una alta correlación entre el grupo filogenético al que pertenecen las cepas de *E. coli* y sus respectivos factores de virulencia (1). Por ejemplo, las cepas patógenas extraintestinales de *E. coli* pertenecen principalmente al grupo filogenético B2 y producen una gran variedad de factores de virulencia que facilitan la colonización del tracto urinario; entre ellos destacan las adhesinas, toxinas, sistemas de captación de hierro y cápsula (7). Además, presentan resistencia a los antibióticos de elección tales como ampicilina, trimetoprim y ciprofloxacino (8).

Por lo antes expuesto, el objetivo del presente trabajo consistió en la caracterización de 105 aislamientos de *E. coli* en adultos mayores con infección urinaria, a fin de conocer si presentan las mismas características de *E. coli* aisladas alrededor del mundo. Para lo cual se determinó la presencia de los genes de virulencia implicados en la adhesión, captación de hierro y síntesis de toxinas;

fimH, *sfaS*, *focG*, *papC*, *sfa/focDE*, *ecpA*, *ecpR-B*, *hlyA*, *ibeA*, *iutA* y *fyuA* mediante la técnica de PCR, los grupos filogenéticos; A, B1, B2 y D mediante la técnica de PCR múltiple y la determinación de la susceptibilidad a antibióticos a través del sistema automatizado MicroScan.

Los resultados indican que entre los aislamientos de *E. coli* el grupo filogenético más frecuente fue el B2, los antibióticos para los cuales más del 50% de las cepas presentaron resistencia fueron: ampicilina/sulbactam, trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacino, gatifloxacina, levofloxacina y moxifloxacina. Y los genes de virulencia encontrados en alta frecuencia fueron; *ecpA*, *papC*, *fimH*, *sfa/focDE*, *sfaS*, *fyuA* e *iutA*.

Marco teórico

Escherichia coli

E. coli se encuentra naturalmente en el tracto gastrointestinal de los humanos y otras especies animales, junto con otros microorganismos que integran la microbiota intestinal de los mamíferos; sostiene una relación simbiótica benéfica con el hospedero al proveer vitaminas y señales para la regulación de la respuesta inmune. Ciertas cepas de *E. coli* pueden divergir de sus características como comensales, para adquirir una naturaleza patógena y la capacidad de generar enfermedades intra y extraintestinales (9, 2). Las cepas patógenas se han subclasificado como patógenas intestinales y extraintestinales (ExPEC) (2).

Entre las ExPEC, las cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC) son las más asociadas a enfermedades en humanos, puesto que son la causa primaria en el 70 al 95% de los casos de ITU. El origen filogenético y sus atributos de virulencia son las características que diferencian las cepas de *E. coli* extraintestinales patógenas de las comensales. Un sello característico de las cepas patógenas es la posesión de factores de virulencia especializados (10,11), los cuales generalmente no se encuentran en las cepas comensales (10). Más aún, las cepas patógenas pueden actuar como patógenos Intracelulares oportunistas (12).

Infecciones del Tracto Urinario (ITU)

El tracto urinario incluye órganos pareados: riñones y uréteres, así como vejiga y la uretra. La mucosa de la pelvis renal, el uréter y la vejiga, se encuentran revestidos por un epitelio estratificado conocido como urotelio, que actúa como componente del sistema inmune (13).

En condiciones fisiológicas, la orina y el tracto urinario (Figura 1) son estériles, excepto por la porción distal de la uretra que está colonizada (7).

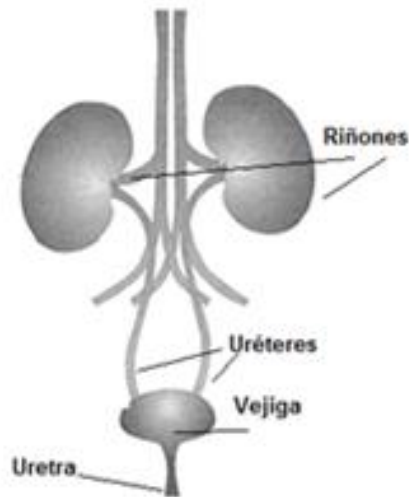


Figura 1. Representación del tracto urinario (16).

Una infección en el tracto urinario (ITU) se define como un número significativo de al menos 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de orina de organismos patógenos, en las áreas normalmente estériles del tracto urinario, con la consiguiente respuesta inflamatoria (14, 15).

Las ITU son las infecciones extraintestinales más frecuentes en humanos. Su diagnóstico se establece a partir de bacteriuria (10^5 UFC/ml) y leucocituria ($\geq 10^4$ leucocitos/ml) (7).

Clasificación

Las infecciones en el tracto urinario, se dividen en; bajas, altas, complicadas, no complicadas, y según el sitio donde se desarrollan en; bacteriuria asintomática

(orina), cistitis (vejiga), pielonefritis (riñones), urosepsis (sangre) y prostatitis (próstata) (1).

- Bajas. Se caracterizan por la colonización bacteriana a nivel de uretra y vejiga. Normalmente se asocian a la presencia de síntomas y signos urinarios, como urgencia para orinar, disuria, poliaquiuria, turbidez y olor fétido de la orina. Incluyen a la cistitis y uretritis (10).
- Altas. Además de presentar signos y síntomas de ITU baja, presentan signos y síntomas sistémicos como escalofríos, fiebre, dolor lumbar, náusea y vómito. Están asociadas a colonización bacteriana a nivel uretral y del parénquima renal. En este grupo se encuentra la pielonefritis (10).
- No complicadas. Ocurren en pacientes que tienen un tracto urinario normal, sin alteraciones funcionales o anatómicas, sin una historia reciente de instrumentación, cuyos síntomas están confinados a la uretra y vejiga. (17).
- Complicadas. Son ITU sintomáticas en individuos que presentan anormalidades funcionales o estructurales en el tracto genitourinario. Los factores del hospedero que predisponen a su desarrollo son: edad, diabetes mellitus, cateterización, comorbilidades y lesiones en la médula espinal (18).
- Bacteriuria asintomática (BUA). Es definida como presencia de bacterias en orina de un paciente que no presenta síntomas típicos de ITU. Su diagnóstico requiere de la confirmación en dos muestras consecutivas (19, 17).
- Cistitis. Se caracteriza por polaquiuria, disuria y a veces dolor suprapúbico (20).

- Pielonefritis. Presenta los mismos síntomas que la cistitis, además de fiebre, dolor en los costados, escalofríos y en ocasiones vómito. Se considera como el punto de partida de una septicemia (20).

Epidemiología

En general, las ITU son las infecciones bacterianas más comunes en la población adulta (17, 21), su prevalencia se incrementa con la edad hasta ser del 10 al 20% en las personas de 65 a 75 años (7). Las ITU en adultos mayores constituyen un riesgo debido a que en dos terceras partes de los casos la infección se localiza en el tracto urinario alto (17, 21). Además, su presentación es atípica, por lo que en ocasiones cursan asintómicamente y pueden complicarse debido a interacciones con otras enfermedades y antibióticos (22).

Las mujeres son más propensas a desarrollar una ITU que los hombres debido a las diferencias anatómicas y fisiológicas (23). Las mujeres adultas experimentan con mayor frecuencia enfermedades sintomáticas. La bacteriuria asintomática (BUA) se incrementa con la edad, llegando a una prevalencia de 20% en mujeres de 80 años de edad. En hombres sanos, la BUA es inusual hasta los 60 años, donde se incrementa hasta llegar a ser del 10% en hombres mayores de 80 años (3).

La hospitalización debida a pielonefritis aguda se incrementa con la edad alcanzando sus máximos valores en los grupos con mayor edad. Las infecciones recurrentes en adultos mayores son problemáticas cuando se acompañan de anomalías urológicas. En pacientes que se encuentran en casas de retiro, la frecuencia de BUA se incrementa en comparación con aquellos que viven en la comunidad (3).

Los factores que predisponen a los adultos mayores al desarrollo de una ITU son:

- La disminución, durante la postmenopausia, de la proporción en que se encuentra colonizando la vagina el bacilo de Döderlein; éste mantiene el pH de la vagina y al encontrarse en menor proporción se genera un aumento del pH que favorece la colonización por *E. coli* y especies de *Enterococcus spp* (3). Para mujeres postmenopáusicas la ITU recurrente está asociada a un historial de ITU durante la juventud.
- La hipertrofia prostática contribuye al desarrollo de una ITU en hombres mayores, debido a que causa obstrucción uretral y flujo turbulento de orina. Esto último facilita el ascenso de la bacteria hacia la vejiga. La bacteria establecida en la próstata de adultos mayores puede persistir indefinidamente exacerbado por la difusión restringida de los antibióticos hacia las glándulas y/o a la presencia de *E. coli* en piedras prostáticas (3).

Patogénesis

El estudio de la patogénesis por *E. coli* implica el conocimiento de los procesos mediante los cuales produce enfermedad en el hospedero. La colonización del tracto urinario por *E. coli*, se sustenta en su capacidad para adherirse a las células y tejidos del hospedero, a través de organelos filamentosos adherentes conocidos como *pili* o fimbrias. Los más comunes son los tipos 1, P, S y FIC, codificados por los operones *fim*, *pap*, *sfa* y *foc*, respectivamente (7).

Existen tres rutas para la infección del tracto urinario por *E. coli*:

- Ruta ascendente: En la mayoría de los casos, *E. coli* infecta el tracto urinario a través de esta ruta (12); las cepas patógenas que se encuentran en la microbiota rectal colonizan progresivamente la mucosa vaginal (en el

caso de las mujeres), el área periuretral y la mucosa uretral antes de llegar a la vejiga. Después, pueden seguir su ascenso hacia los riñones vía los uréteres. Por lo cual, una ITU inicia usualmente como infección en la uretra, vejiga (cistitis) y según la cepa, puede ascender hacia los riñones (pielonefritis) y finalmente resultar en falla renal y diseminación hacia la sangre (urosepsis) (1).

- Ruta hematógena: Esta ruta alude a la infección de los riñones a partir de la sangre y no es común en pacientes sanos (24).
- Ruta linfática: En raras ocasiones, la bacteria que se encuentra en órganos adyacentes puede penetrar al tracto urinario a través de los vasos linfáticos. Esta ruta está asociada a abscesos retroperitoneales e infecciones intestinales (24).

La capacidad de adherirse a los tejidos del hospedero, es uno de los principales factores que favorecen la colonización, le permiten a la bacteria resistir el vaciado de la orina y promueven la invasión de las células uroteliales. Una vez en estas, *E. coli* es transportada dentro de membranas, las cuales poseen características similares a lisosomas o endosomas tardíos. Dentro de estas células, el microorganismo es capaz de multiplicarse rápidamente formando comunidades intracelulares similares a biopelículas (Figura 2) (9).

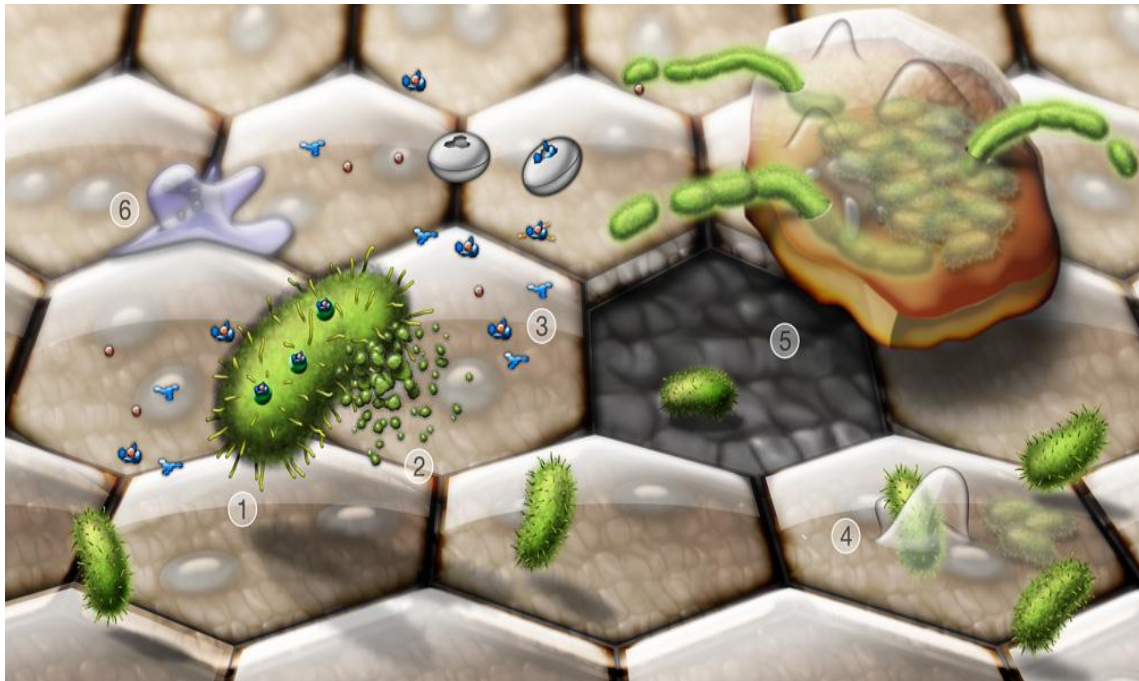


Figura 2. Mecanismo empleado por *E. coli* para la colonización e invasión de las células del epitelio. Eventos que tienen lugar durante una ITU [1]. Expresión de los *pili* tipo I; [2] Secreción de toxinas y otros factores de virulencia, solos o asociados a vesículas de membrana externa; [3, estructuras azules] Liberación de sideróforos como enterobactina y salmoquelina para la obtención de hierro en competición con moléculas quelantes de hierro del hospedero y lipocalina 2 (discos blancos); [4] Los *pili* tipo 1 median la adhesión e invasión de las células uroteliales, las células superficiales diferenciadas del lumen de la vejiga que son en ocasiones binucleadas y poseen formas hexagonales o pentagonales son los blancos primarios para la invasión; [5] UPEC puede multiplicarse rápidamente dentro de éstas, formando comunidades similares a biopelículas (9).

Factores de virulencia

La virulencia se define como la capacidad de un organismo para causar enfermedad en un hospedero particular (25). En *E. coli*, la virulencia resulta del impacto acumulativo de uno o más factores de virulencia (11). Estos determinan si una cepa puede invadir al hospedero, y le permiten sobrevivir en ambientes menos favorables, como la orina (2).

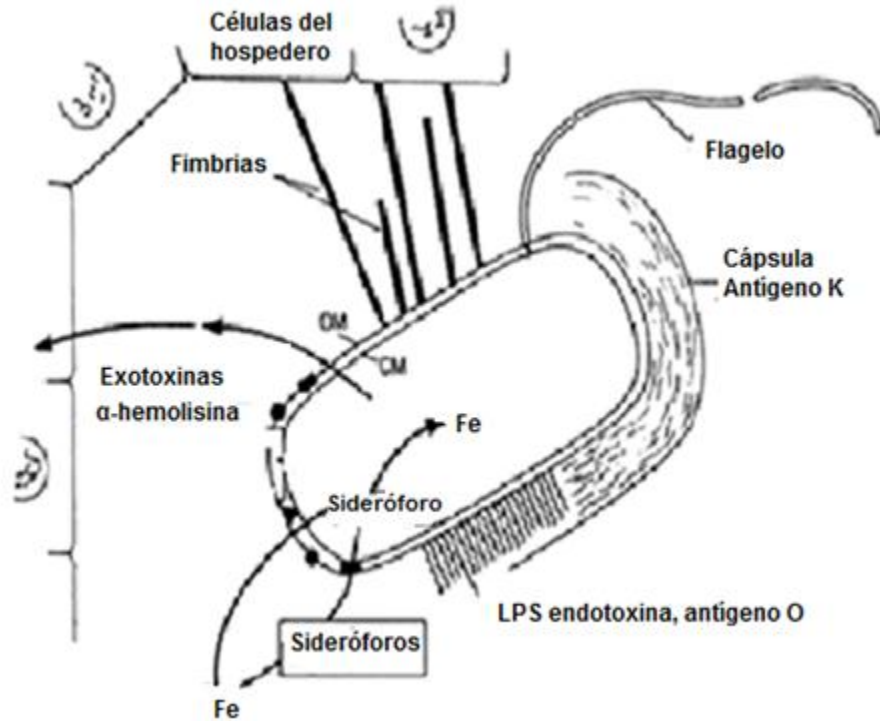


Figura 3. Representación esquemática de *E. coli* y sus factores de virulencia (11).

En el genoma de *E. coli*, de aproximadamente 4.6 a 5.6 Mb, se encuentran estructuras de mosaico que consisten de un centro conservado de genes, más un banco de genes específico de cada cepa. Este banco de genes contiene aquellos que codifican para factores tejido-específicos y, en el caso de las cepas patógenas, para factores de virulencia (1).

Estos factores de virulencia que incluyen a adhesinas, toxinas, invasinas y sistemas de captación de hierro (Figura 3) (26), facilitan la colonización e invasión del tracto urinario, al disminuir o interrumpir los mecanismos de defensa, causar daño al tejido y permitir la estimulación de la respuesta inflamatoria. Los factores de virulencia (FV) son codificados por genes que generalmente se encuentran asociados a islas de patogenicidad cuyo contenido de guanina-citosina es distinto al resto del genoma (9, 16), y se adquieren a través de transferencia horizontal de material genético.

Fimbrias y adhesinas

Las fimbrias son organelos adhesivos de máxima importancia para la colonización exitosa de tejidos específicos del hospedero; son glicoproteínas de superficie que funcionan como ligandos para receptores de glicolípidos y glicoproteínas presentes en las células uroepiteliales. Las fimbrias presentes en cepas de *E. coli* asociadas a ITU pueden clasificarse en tres categorías basándose en sus características de hemaglutinación. La primera categoría abarca fimbrias que producen hemaglutinación D-manosa resistente; por ejemplo, las fimbrias P y S. La segunda, incluye a fimbrias que producen hemaglutinación D-manosa sensible como las fimbrias tipo 1. En la tercera clase se incluyen fimbrias que no poseen características de hemaglutinación; el representante más común de esta clase es la fimbria FIC (27).

Las adhesinas se encuentran en la superficie de las bacterias, como componentes de las fimbrias, o como moléculas afimbriales monoméricas o multiméricas ancladas a la membrana externa de la bacteria. Estas estructuras adhesivas son codificadas por grupos de 6 a 11 genes y consisten de 260 a 340 aminoácidos que corresponden a una proteína de 28 a 35 kDa con cuatro cisteínas implicadas en la formación de dos puentes disulfuro.

UPEC produce diversas adhesinas cuyo “blanco” incluye a un gran número de receptores en el hospedero; proteínas extracelulares o presentes en la superficie de las células; las más comúnmente asociadas a UPEC son las de la familia Afa/Dr, S, FIC, P y las del tipo 1.

La adhesión resulta de la interacción entre una adhesina producida por *E. coli* y un receptor específico localizado en la superficie de las células del hospedero. Los receptores para adhesinas son producidos por las células uroepiteliales, eritrocitos y por la mucosa del tracto urinario (7). La capacidad de *E. coli* para adherirse específicamente a las células uroepiteliales le permite resistir los mecanismos de

defensa del hospedero, como el vaciado de la orina que es la mayor defensa fisiológica y permite la eliminación del 99.9% de las bacterias; sin embargo, ésta resulta insuficiente cuando la bacteriuria excede los 10^5 UFC/ml. Las características de la orina tales como su alta osmolaridad, contenido de ácidos orgánicos y pH ácido, contribuyen a la inhibición del crecimiento bacteriano. Las células uroepiteliales constituyen otro mecanismo de defensa, ya que actúan como una barrera física a través del moco que ellas mismas producen; este moco actúa como un elemento que enmascara los receptores en las células uroepiteliales. Finalmente, a través de la exfoliación de las células uroepiteliales se logra la eliminación de las células que contienen bacterias (7).

Fimbria tipo 1

La fimbria tipo 1 es manosa sensible. Está altamente conservada entre las cepas patógenas y las cepas comensales de *E. coli* (9), se considera uno de los FV más importantes involucrados en el establecimiento de una ITU. Está compuesta por subunidades repetidas 1,000 a 2,000 veces, arregladas en una hélice que gira en sentido derecho (7).

Tiene una distribución peritrica, mide más de 7 nm y está formada por repeticiones de la subunidad FimA. El fibrillum está compuesto de dos subunidades adaptadoras; FimF y FimG, así como de la adhesina FimH que reconoce receptores de glicoproteínas con manosa. FimH consiste en un dominio C-terminal de pilina, involucrado en la incorporación de FimH a la punta del fibrillum. Esta adhesina también se encuentra distribuida a lo largo de todo el fibrillum (Figura 4) (7).

Fimbria tipo 1

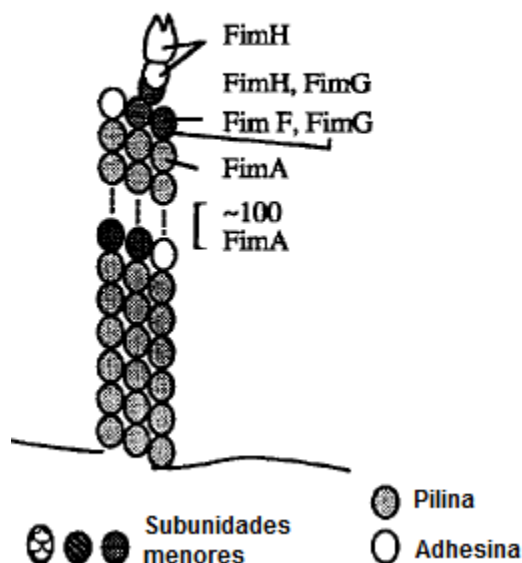


Figura 4. Representación esquemática de la morfología y composición de la fimbria tipo 1 (7).

FimH se adhiere a receptores manosilados que se encuentran en el uroepitelio. La interacción de FimH con su receptor es esencial para la colonización e infección del epitelio de la vejiga. El proceso de unión específico ocurre cuando FimH se une a uroplaquina 1a y 1b; después de la unión, las adhesinas activadas migran hacia capas más profundas y penetran la membrana celular. Una vez dentro de la célula el proceso invasivo continúa, la bacteria prolifera dentro del citosol formando grupos o biopelículas (13). La invasión requiere de un reordenamiento dinámico del citoesqueleto de la célula hospedera, así como de un número de factores de señalización asociados a integrinas y proteínas adaptadoras (9).

Los aislamientos de UPEC expresan comúnmente variantes de FimH que se unen tanto a receptores de glicoproteínas que contienen monomanosa o trimanosa. En contraste, los aislamientos de *E. coli* comensales muestran alta afinidad por residuos de trimanosa. La alta afinidad por los residuos de monomanosa está

asociada a la facilidad para la interacción de UPEC con las células uroepiteliales, puesto que le permite una mayor resistencia al vaciado de la orina (28).

Fimbria P

La fimbria P está altamente asociada a cepas que causan pielonefritis. Interviene en la unión a receptores del grupo P-sanguíneo en las células uroepiteliales (14). Está compuesta por estructuras de 1µm de longitud, arregladas en una hélice que gira en sentido derecho 3.3 subunidades por turno (7).

Posee una adhesina PapG localizada en la punta distal de la fimbria, posición que favorece la interacción con su receptor: α -D-galctopiranosil-(1-4)- β -D-galctopiranósido. Existen tres variantes de esta adhesina PapG; I, II y III, que reconocen variantes de globotriacilceramidas localizadas en los antígenos de la superficie de las células “blanco” que se encuentran particularmente en el riñón (9).

La fimbria P se compone por otras subunidades menores: PapE, PapF, PapH y PapK (Figura 5). PapE constituye la subunidad mayor del fibrillum, PapF une a la adhesina y controla la polimerización del fibrillum. La biogénesis de la fimbria requiere de dos proteínas auxiliares PapD y PapC. PapD es una chaperona periplásmica, que permite mantener la estructura tridimensional (7). Mientras que PapC de 86 KDa es una proteína de membrana externa requerida para el ensamblaje y secreción de los *pili* tipo P en *E. coli* uropatógena. En ausencia de PapC, los diferentes complejos de chaperona-subunidad, acumulados en el periplasma, no serían capaces de producir estructuras adhesivas. Esto sugiere que es una molécula similar a porina, requerida para el paso de subunidades a través de la membrana externa (7).

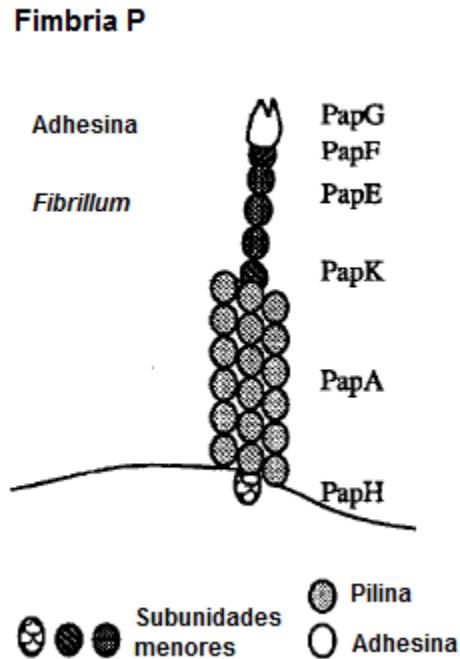


Figura 5. Representación esquemática de la morfología y composición de la fimbria tipo P (7).

Fimbria S

La fimbria S es una adhesina manosa resistente y debe su nombre al hecho de que se une específicamente a residuos con sialil-galactósidos terminales (11); glicoproteínas con terminación α -sialil-ácido-1-2-3- β -galactosamina, es expresada por cepas causantes de meningitis e ITU (29, 30). Los sitios de unión para la fimbria se encuentran en las células epiteliales de los túbulos proximales y distales, ductos colectores, glomérulos, intersticio renal y en el endotelio renal vascular.

La fimbria S está compuesta por las subunidades: mayor SfaA, que forma parte del fibrillum; menor SfaG y la adhesina fimbrial SfaS que media la actividad hemaglutinante (39).

Fimbria FIC

La fimbria FIC carece de actividad hemaglutinante y se une a residuos de β -GalNac-1,4- β -Gal (31) y a esfingolípidos presentes en los ductos colectores y túbulos distales del riñón. Pertenecer a la misma familia que la fimbria S y, al igual que ésta, tiene su composición a base de subunidades mayores y menores (27).

El gen *focA* codifica para la subunidad mayor, el gen *focH* codifica para la subunidad menor, los genes *focC* y *focD* se requieren para producir la proteína chaperona (32), y el gen *focG* codifica para la adhesina FocG.

Esta fimbria está asociada a cepas de UPEC O4 y O6, que expresan comúnmente la fimbria P (32).

Pili común de *E. coli*

Los *pili* comunes de *E. coli*. (ECP) desempeñan un rol potencial en la colonización de las células epiteliales y pueden representar un factor de adherencia, tanto en cepas de *E. coli* comensales como en las patógenas. Los ECP están compuestos por subunidades de pilina de 21KDa, cuya secuencia de aminoácidos corresponde al producto del gen *yagZ*, renombrado *ecpA* (33, 34).

El gen *ecpA* codifica para la subunidad mayor del ECP; EcpA corresponde a un segmento de 488 pb y está flanqueado por los genes *ecpR* y *ecpB*. La subunidad proteica EcpA es 60% hidrofóbica y su C-terminal no posee los dos residuos de cisteína presentes en muchos tipos de *pili* (33, 34, 35).

Toxinas

UPEC secreta un complejo de proteínas tóxicas para las células eucariotas, que incluyen a la α -hemolisina y al factor citotóxico necrotizante 1 (CNF-1).

α -hemolisina

La α -hemolisina es una toxina de 107 kDa secretada por cepas patógenas de *E. coli*; es miembro de la familia RTX, un grupo de proteínas caracterizadas por la presencia de secuencias ricas en glicina y asparagina repetidas en tándem cerca de la región C-terminal. Estas repeticiones constituyen el dominio de unión a Ca^{2+} (36).

La α -hemolisina se une al receptor integrina-2 de leucocitos o a glicoporinas del eritrocito (37) y causa hemólisis a través de la formación de poros en la membrana, aumentando la permeabilidad hasta la lisis celular (38). Así mismo, media la entrada de la bacteria a las células uroepiteliales (28).

La producción de esta toxina predomina en las ITU altas, es codificada por un operón compuesto por cuatro genes, designados *hlyABCD*; *hlyA* es el gen estructural y su activación requiere de acetilación postraducciona, mediada por el producto HlyC. Las proteínas asociadas a membrana HlyC y HlyD, forman el aparato de secreción de HlyA (7).

Factor citotóxico necrotizante tipo 1

El factor citotóxico necrotizante tipo 1 (CNF1) es una toxina de 113 kDa, se identificó hace 20 años en base a sus efectos necrotizantes en la piel de conejos. Estudios posteriores demostraron que se produce en cerca de una tercera parte

de las cepas de UPEC y estimula la producción de fibras de actina, lamellipodia y filopodia (28)

CNF1 es capaz de entrar en las células del hospedero a través de un pH bajo por la vía endocítica, mediante la unión al precursor del receptor de laminina, el cual es una proteína de membrana del hospedero que funciona también como un receptor para varios virus (28).

Dentro de las células del hospedero CNF1 funciona como una deamidasa que convierte residuos específicos de glutamina a ácido glutámico a través de las Rho GTPasas; RhoA, Rac y Cdc42. Este cambio de aminoácido inhibe la hidrólisis de GTP inducida por proteínas activadoras de GTPasa (GAP). Estas GTPasas son las principales moléculas de señalización en una variedad de procesos celulares, incluyendo la reorganización de actina en el citoesqueleto.

Sistemas de captación de hierro

En los mamíferos, el hierro está fuertemente unido a varias proteínas, incluidas las hemoproteínas tales como la ferritina, que es capaz de almacenar hasta 4,500 moléculas de Fe^{3+} por oligómero y contiene cerca del 30% de la reserva de éste. Por lo cual, la concentración de hierro libre es de 10^{-24}M ; esta restricción, provocó que durante la evolución *E. coli* desarrollara mecanismos para la captación de hierro a través de contactos directos e indirectos. Los contactos directos comprenden la captación de hierro a partir de diversas fuentes como lactoferrina, transferrina, ferritina, el grupo hemo y/o hemoproteínas. La desventaja es la necesidad de un receptor específico para cada fuente de hierro. Por lo cual, *E. coli* usa grupos de sideróforos específicos para cada fuente de hierro presente en los diferentes compartimentos del hospedero (39).

Tanto las cepas patógenas como las comensales de *E. coli* codifican para sistemas complejos de captación de hierro a través de la síntesis, exportación y captación de pequeñas moléculas quelantes de hierro conocidas como sideróforos (40). La obtención de hierro es un proceso crítico para la supervivencia de *E. coli* *in vivo*, ya que éste es un nutriente esencial requerido como donador y aceptor para muchas proteínas, incluidas las que participan en la fosforilación oxidativa el metabolismo y las condiciones de estrés oxidativo.

Los sideróforos son pequeñas moléculas quelantes de hierro que se unen a iones de hierro férrico con una alta afinidad ($K_d=10^{-20}$ - 10^{-50} M) (42). El genoma de UPEC CFT073 codifica para 14 diferentes receptores de membrana externa para hierro, los cuales se muestran en la tabla 1.

Gen	Sustrato de hierro
<i>entD, fepA, fes entF fepE fepDGC fepB entCEBE</i>	Enterobactina
<i>iucABCD iutA</i>	Aerobactina
<i>chuAS chuTWXYUV</i>	Hemo/hemoglobina
<i>iroN iroBCDE</i>	Salmoquelina
<i>fhuACDB</i>	Ferricromo
<i>fhuEz</i>	Coprogeno/ácido rodolúrico
<i>fitA fitBCER</i>	Desconocido
<i>ybtPQXS ybtA irp2 irp1 ybtUTE fyuA</i>	Yersiniabactina
<i>cirA</i>	Catecolatos
<i>fiu</i>	Catecolatos
<i>iha</i>	Enterobactina
<i>hma</i>	Hemo/hemoglobina
<i>ireA</i>	Desconocido

Tabla 1. Genes que codifican para sideróforos en UPEC (39).

Los sideróforos se dividen en tres clases, dependiendo de la naturaleza química de los residuos donadores de oxígeno, que son ligandos para la coordinación de Fe^{3+} ; (I) catecolatos que incluyen a los fenolatos, (II) hidroxamatos o hidroxicarboxilatos y (III) los mixtos.

La mayoría de las cepas comensales y patógenas de *E. coli* producen receptores para enterobactina; sin embargo, la producción de aerobactina ha sido apreciado como un marcador epidemiológico de virulencia en UPEC (38). Un estudio del año 2009 reveló que las cepas de *E. coli* provenientes del tracto urinario expresan preferentemente los sideróforos yersiniabactina y salmoquelina (41).

Otro sideróforo es ChuA, el cual es un receptor de membrana externa de 69kDa dependiente de TonB; éste es un complejo de membrana interna que se encarga de la transducción de la fuerza motriz de protones (Figura 6). ChuA contribuye a la supervivencia de UPEC *in vivo* y a la formación de comunidades bacterianas intracelulares, todas las cepas patógenas de *E. coli* que pertenecen a los grupos filogenéticos B2 y D expresan este sideróforo (42).

La captación de hierro del grupo hemo a través de ChuA juega un rol en la colonización de la vejiga y los riñones, así como en la formación de comunidades intracelulares en el epitelio de la vejiga (40).

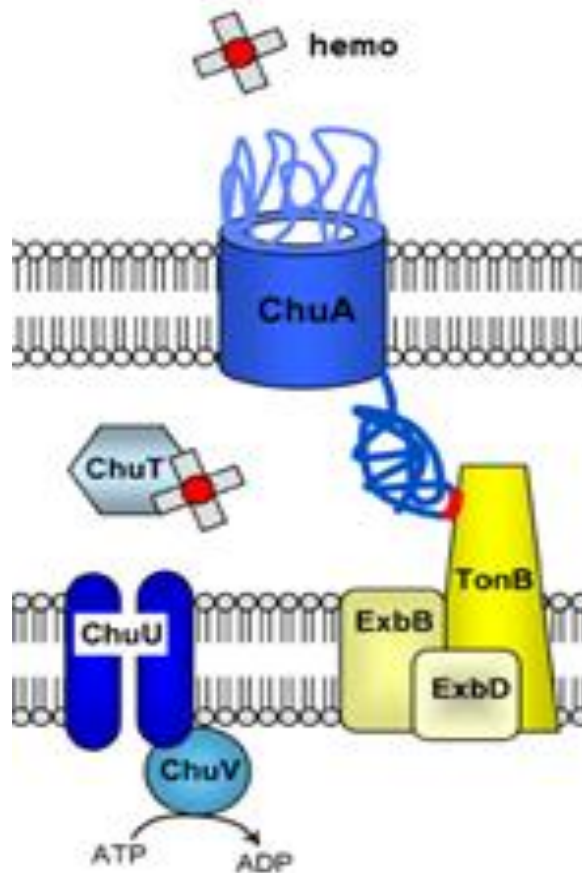


Figura 6. Complejo de membrana interna TonB y ChuA. El grupo hemo es reconocido por el receptor específico de membrana externa ChuA y transportado hacia el interior del periplasma con la energía aportada por el complejo TonB/ExbB/ExbD. La proteína de unión ChuT transfiere el sustrato a la permeasa de membrana interna ChuU donde la ATPasa ChuV conduce el transporte hacia el citoplasma (43).

Invasinas

Las invasinas son proteínas que favorecen la invasión celular. La invasina IbeA es una proteína de 50kDa y el gen que la codifica (*ibeA*) está localizado en la isla GimA. Este gen fue descrito por primera vez en la cepa RS218 aislada de un paciente con meningitis cerebral. La delección de *ibeA* en la cepa RS218 disminuye su virulencia en un modelo de rata infantil con meningitis (43). Además, posee un rol importante en la invasión de ExPEC productora de meningitis cerebral (46).

Grupos filogenéticos

Los análisis realizados han agrupado a *E. coli* en cuatro grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D. Las cepas patógenas extraintestinales pertenecen en su mayoría al grupo B2 y, en menor proporción, al grupo D. Mientras que las cepas comensales al grupo A (42).

Las técnicas de electroforesis multilocus de enzima o ribotipificación usadas anteriormente como referencia para determinación del grupo filogenético son complejas y requieren de mucho tiempo y de una amplia colección de cepas; por ello, se desarrolló una técnica que permite efectuar la identificación de los cuatro grupos filogenéticos antes mencionados a través de PCR triple, con una precisión del 99%. Este método emplea una combinación de dos genes; *chuA* y *yjaA*, así como un fragmento de DNA denominado TSPE4.C2 (Figura 7) (42).

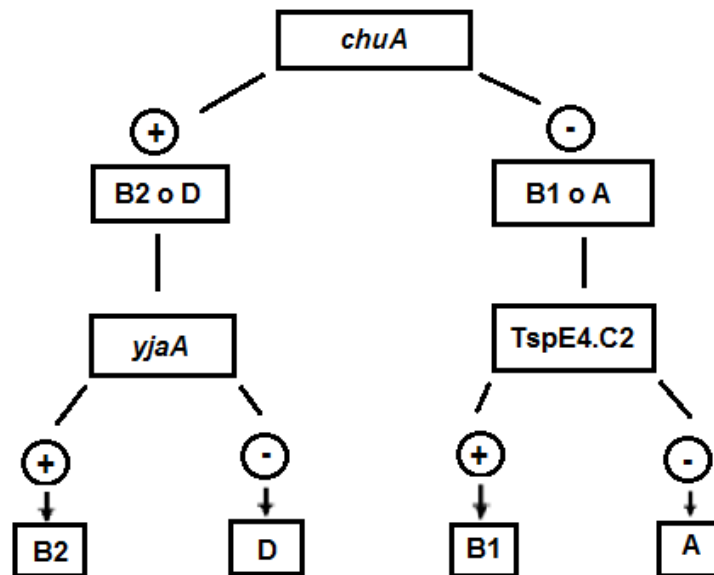


Figura 7. Diagrama para la diferenciación del grupo filogenético, basado en los resultados de la amplificación génica de *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2 (42).

Las posibles combinaciones de *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2 que pueden encontrarse en los cuatro grupos filogenéticos se muestran en la tabla 2.

Grupo filogenético	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2
A	-	+	-
	-	-	-
B1	-	+	+
	-	-	+
B2	+	+	+
	+	+	-
D	+	-	-
	+	-	+

Tabla 2. Combinaciones de los dos genes y el fragmento de DNA TSPE4.C2, para la clasificación de *E. coli* en grupos filogenéticos.

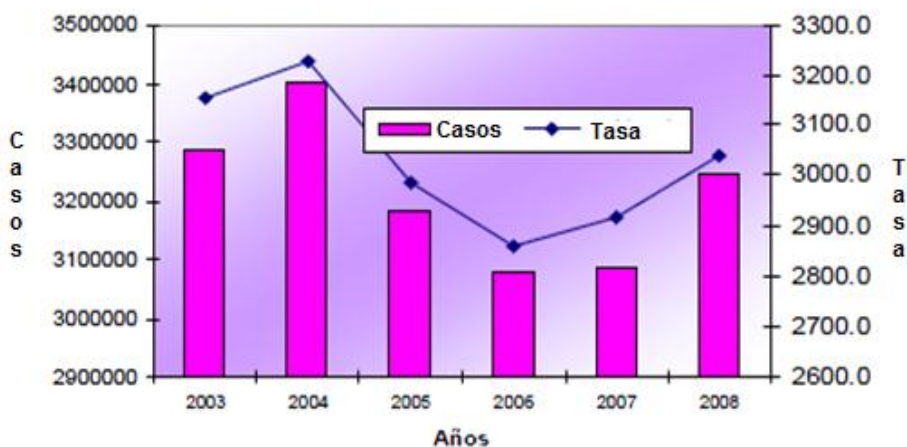
Los genes *chuA* y *yjaA*, así como el fragmento de DNA TSPE4.C2 son marcadores específicos de los grupos filogenéticos (43). El gen *chuA* es requerido para el transporte del grupo hemo en *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, y es adquirido por los grupos filogenéticos hermanos B2 y D; es decir, está presente en un ancestro común y fue perdido por los grupos hermanos A y B1. El gen *yjaA* se identificó en la secuencia genómica de *E. coli* K-12; sin embargo su función es desconocida (43).

La comparación de los perfiles genómicos de 45 cepas provenientes de diferentes fondos clínicos como urosepsis, pielonefritis, cistitis y BUA, demostró que existe una débil correlación entre los genotipos de las cepas y las presentaciones de ITU, pero si una fuerte correlación entre el genotipo y el grupo filogenético. Los aislamientos pertenecientes a los grupos A, B1 y D poseen menos genes de virulencia que los B2, lo que concuerda con la noción de que una alta proporción de cepas B2 son más virulentas, debido a que poseen una mayor cantidad de factores de virulencia (1).

Las ITU en México

En México, la mayoría de las ITU son causadas por bacilos Gram negativos; el 80% de ellas están asociadas a *E. coli* y el 20% a *Proteus* spp. Los organismos Gram positivos causan ITU en menor proporción. Los más comunes son: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp. Además, pueden detectarse micobacterias, hongos y otros microorganismos como *Chlamydia trachomatis*, *Uroplasma* y *Trichomonas vaginalis* (45).

Desde el año 2003 hasta el 2008, las ITU han ocupado el tercer lugar dentro de las 20 principales causas de morbilidad, que se reportan en la República Mexicana. En el año 2003 se notificaron 3'287,111 casos para una tasa de 3,154.2; para el 2008 se notificaron 3'244,994 casos con una tasa de 3,041.7 (45).



FUENTE: SUIVE/DGAE/Secretaría de Salud

*Incidencia por 100 000 habitantes

Gráfica 1. Casos y tasa de infecciones en el tracto urinario en México para el periodo 2003 – 2008. El valor de la tasa es por cada 100.000 habitantes.

En el 2008, el porcentaje presentado por cada sexo fue: para hombres de 24.4% mientras que para mujeres de 75.6% (45).

Los grupos más afectados en el 2008 de acuerdo a la edad son: de 65 y más años con una tasa de 5,767.9 casos; de 60 a 64 años con 5,793.4 casos; y de 50 a 59 años con 4,658.0 casos por cada 100.000 habitantes (46).

Tratamiento

En forma general los agentes antimicrobianos más usados para el tratamiento de una ITU sintomática en adultos mayores, son: trimetoprim/sulfametoxazol, las fluoroquinolonas, los β -lactámicos, nitrofurantoína y fosfomicina (47). Sin embargo, en los adultos mayores que presentan BUA, el tratamiento con antimicrobianos no está indicado porque se asocia a efectos adversos y reinfección por microorganismos más resistentes (3).

En el caso de las ITU sintomáticas en adultos mayores, el tratamiento de elección para la cistitis incluye trimetoprim/sulfametoxazol. La nitrofurantoína no está indicada para infecciones renales o de próstata, pero sí para *E. coli* productoras de β -lactamasas (ESBL). El uso de las fluoroquinolonas está restringido a casos severos como pielonefritis, debido a la alta resistencia que presenta *E. coli*, o en pacientes incapaces de tolerar otros antibióticos. Las cefalosporinas son una efectiva segunda línea de tratamiento, dependiendo de la susceptibilidad microbiana y de la tolerancia del paciente al medicamento (3).

El tratamiento clínico de las ITU es complicado debido al aumento, en años recientes, en cuanto a la incidencia de infecciones causadas por cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos de elección: cefalosporinas, fluoroquinolonas y trimetoprim (2). Esta resistencia a quimioterapéuticos reviste gran importancia debido a las limitadas opciones terapéuticas disponibles.

En México, la situación es similar, por lo cual existe una preocupación creciente por el aumento de la resistencia a los antibióticos de elección para tratar las ITU.

Aproximadamente el 10% de los aislamientos de *E. coli* son resistentes a ceftazidima, y el 6% de los aislamientos son productores de β -lactamasas. Además, en México, la tasa global de resistencia es más alta que en los países desarrollados, e incluso, que en diversos países de Latinoamérica (6, 8).

Planteamiento del problema

Es necesario el conocimiento de los factores de virulencia, del grupo filogenético y del perfil de resistencia antimicrobiana de *E. coli* en la población de adultos mayores en México. Ya que ello permitirá el mejor entendimiento de su patogenicidad y el mejoramiento de la terapia y las medidas de prevención para el control de las ITU en dicha población.

Debido a que en México no se cuenta con una vigilancia exhaustiva de las ITU, es complicado estimar su verdadera incidencia (6). Los estudios realizados alrededor del mundo indican que existe una alta correlación entre el grupo filogenético al que pertenece una cepa de *E. coli* y los factores de virulencia; es decir, las cepas patógenas extraintestinales de *E. coli* pertenecen principalmente a los grupos filogenéticos B2 y D, y son más virulentas que las de los grupos B1 y A, porque codifican para una gran variedad de factores de virulencia que promueven la colonización del tracto urinario; por ejemplo, adhesinas, toxinas, sistemas de captación de hierro, cápsula e invasinas (45). Finalmente, los principales agentes causales presentan resistencia a los antibióticos de elección tales como ampicilina, cefalosporinas, trimetoprim y ciprofloxacino (8).

Objetivo general

Caracterizar aislamientos de *E. coli* provenientes de adultos mayores con ITU obtenidos en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, a través de la determinación de los genes de virulencia, la identificación de los grupos filogenéticos y el establecimiento de susceptibilidad a antibióticos.

Objetivos particulares

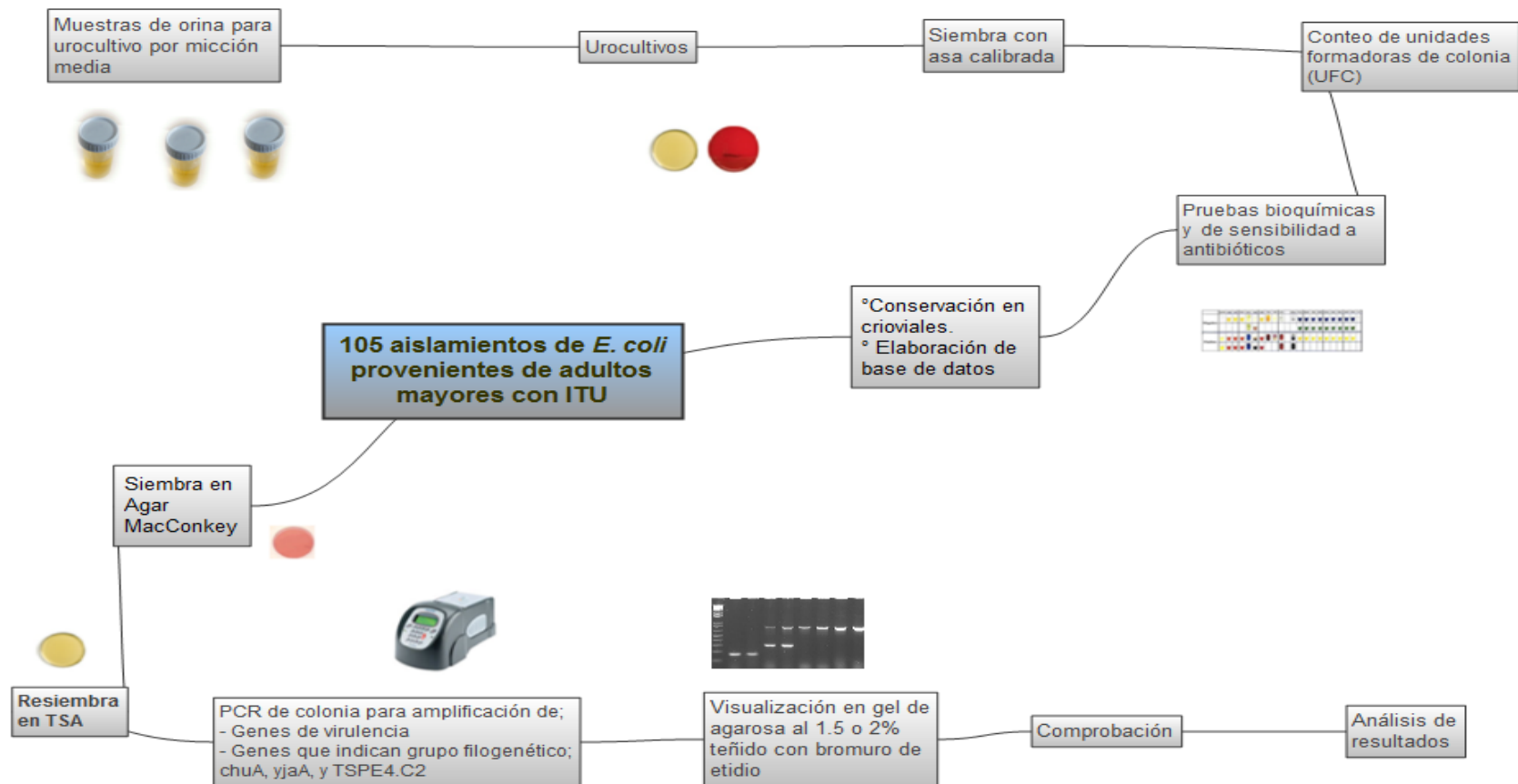
- Identificar los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D, en los aislamientos de *E. coli* en adultos mayores mediante la detección de los genes *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C y determinar su distribución entre los aislamientos en hombres y mujeres.
- Determinar la presencia de los genes de virulencia *fimH*, *sfaS*, *focG*, *papC*, *sfa/focDE*, *ecpA*, *ecpR-B*, *hlyA*, *ibeA*, *iutA*, *fyuA*; su distribución entre los aislamientos en hombres y mujeres, así como entre los cuatro grupos filogenéticos.
- Determinar la susceptibilidad a antibióticos en los aislamientos de *E. coli* y determinar si existe diferencia para la distribución de ésta entre los aislamientos en hombres y mujeres, así como entre los grupos filogenéticos.
- Determinar si existe diferencia para la distribución de los genes de virulencia entre los aislamientos susceptibles a quinolonas.
- Determinar si los aislamientos de *E. coli* en adultos mayores en México muestran algún predominio en cuanto a factores de virulencia, grupos filogenéticos y susceptibilidad a antibióticos.

Hipótesis

Los aislamientos de *E. coli* en adultos mayores pertenecen principalmente al grupo filogenético B2, presentan mayor resistencia a ciprofloxacino, trimetoprim/sulfametoxazol y cefalosporinas y evidencian más genes de virulencia que los pertenecientes a los grupos A y B1.

Metodología

En el siguiente diagrama se resume la metodología empleada para la caracterización de los aislamientos de *E. coli* obtenidos de urocultivos de pacientes adultos mayores con ITU.



Materiales

Equipo

- Sistema automatizado MicroScan (DADE BEHRING) para la identificación y determinación de sensibilidad a antibióticos.
- Termocicladores; TECHNE TC-3000, Axygen Maxigene y Corbett research, empleados para la amplificación de los genes de virulencia mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Cámara de electroforesis horizontal (APOLLO). Fuente de poder (500-2 POWER SUPPLY). Equipo empleado para la visualización de los fragmentos amplificados por PCR.
- Varios: incubadora (Forma Scientific). Campana de flujo laminar (The Baker Company). Vortex (Velp scientifica). Foto-documentador (UVP Epi Chemi II Dakroom). Balanza analítica digital (Satorius BP1215). Equipos empleados en la propagación, selección y conservación de las Cepas de *E. coli*.

Reactivos

- PCR: kit invitrogen (dNTPs mix 100 mM, taq DNA polimerasa, $MgCl_2$ 50 mM, Buffer 10x); kit promega (dNTPs mix 100 mM, Gotaq DNA polimerasa, $MgCl_2$ 25 mM, Buffer 5x); kit Altaenzymes (dNTPs mix 100 mM, taq DNA polimerasa, $MgCl_2$ 50 mM, Buffer 10x); kit Qiagen (dNTPs mix 100 mM, Toptaq DNA polimerasa, $MgCl_2$ 50 mM, Buffer 10x).
- Electroforesis en geles de agarosa: Agarosa (Promega). Buffer para electroforesis Tris-Ácido Acético-EDTA (TAE) 1X. Bromuro de etidio 0.5

µg/ml. Marcador de peso molecular: 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). 100 bp Ladder DNA Marker (Axygen).

- Cepas bacterianas de estudio: Se trabajó con 105 aislamientos de *E. coli* provenientes de urocultivos realizados a pacientes adultos mayores con infección en el tracto urinario del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”.
- Cepas de referencia: *Escherichia coli* uropatógena CFT073 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) aislada de la sangre de una mujer con pielonefritis aguda.
- Medios de cultivo: Agar Tripticasa-Soya (BDBioxon), Agar MacConkey (BBL™). Infusión Cerebro-Corazón; BHI (BDBioxon)/Glicerol 50% (Sigma) para la conservación de las cepas en criotubos a -70°C.

Métodos

Población de estudio

Se incluyeron en este estudio, 105 pacientes adultos mayores hombres y mujeres cuyas edades estuvieron en el rango de 60 a 91 años, que fueron atendidos en los servicios de consulta interna, externa y urgencias, de las divisiones de urología, ginecología, reumatología, neurología y cirugía general del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. El 37.14% de los pacientes son hombres y el 62.86% son mujeres. La edad promedio de acuerdo al sexo para la población estudiada es de 72 años para hombres y 71 años para mujeres.

La utilización de las muestras no requirió consentimiento informado por parte de los pacientes debido a que sólo se trabajó con muestras clínicas.

Las características de los pacientes de donde se aisló a *E coli* en el momento en que la muestra fue llevada al laboratorio clínico para realizar el urocultivo se describen en la tabla 3.

Cepa	Paciente			
	Sexo	Edad	Procedencia	Enfermedades asociadas
1	F	60	Endocrinología	
2	F	80	Urología	Cáncer
3	F	76	Urología	ITU
4	F	60	Preconsulta	
5	F	60	Medicina Interna	
6	F	70	Urología	ITU
7	F	60	Urología	
8	F	80	Urología	Cáncer vesical
9	F	74	Medicina Interna	
10	F	75	Urología	
11	F	65	Urología	ITU con tratamiento con Macrofantina
12	F	73		
13	F	66	Urología	ITU
14	F	76	Urología	ITU
15	F	63	Urología	
16	F	84	Medicina Interna	
17	F	82	Urgencias adultos	
18	F	80	Medicina Interna	
19	F	67	Reumatología	
20	F	71	Urología	Tratamiento con Elequin 20 días antes del urocultivo
21	M	66	Urología Consulta externa	
22	F	66	Urología Consulta externa	
23	F	75	Medicina Interna	Enfermedad cerebral vascular Insuficiencia renal crónica Síndrome de respuesta inflamatoria severa Sin antibiótico
24	F	63	Urología Consulta externa	
25	F	67	Ginecología Consulta externa	
26	F	64	Urología Consulta externa	
27	M	73	Urgencias Adultos	
28	F	64	Medicina Interna	Sepsis Psoriasis eritrodérmica Hipernatremia
29	M	63	Urología Consulta externa	
30	M	75	Urología Consulta externa	
31	M	60	Urología	
	F	78	Cirugía General	Derrame pleural bilateral

32				Posible sepsis Tratamiento con Ampiciclina y Ertapenem
33	M	79	Medicina Interna	
34	M	73	Urología Consulta externa	
35	M	78	Urología Consulta externa	
36	F	71	Medicina Interna	
37	M	75	Urología	Hiperplasia prostática benigna
38	M	88	Urología	
39	M	71	Medicina Interna	
40	M	60	Medicina interna	
41	F	71	Urología Consulta externa	
42	F	67	Urología Consulta externa	
43	F	67	Urología Consulta externa	
44	F	73	Urología Consulta externa	
45	M	70	Urología Consulta externa	
46	M	85	Medicina Interna	
47	F	81	Medicina Interna	Paciente en silla de ruedas
48	F	68	Ginecología Consulta externa	
49	F	64	Urología Consulta externa	
50	F	71	Urología Consulta externa	
51	M	91	Medicina Interna	
52	F	79	Urología Consulta externa	
53	F	84	Medicina Interna	
54	F	61	Medicina Interna,	
55	M	64	Medicina Interna	
56	M	81	Urología Consulta externa	
57	M	77	Urología Consulta externa	
58	F	60	Urología Consulta externa	
59	M	65	Neurología	
60	M	63	Urología Consulta externa	
61	M	87	Urgencias	ITU
62	F	85	Urgencias adultos	
63	M	61	Urología Consulta externa	
64	F	78	Urología	
65	F	63	Medicina Interna	
66	F	75		
67	F	60		
68	M	67		

69	M	62		
70	M	84		
71	F	63		
72	F	83		
73	M	65		
74	M	65		
75	M	69		
76	F	86	Cirugía General	ITU
77	F	84	Medicina Interna	ITU
78	F	64	Urología	
79	F	68	Urología	
80	M	77	Medicina Interna	Pancitopenia
81	M	81	Medicina Interna	
82	F	66	Urgencias Adultos	
83	F	73	Consulta Externa	
84	F	82	Urología Consulta Externa	
85	M	84	Urología	
86	F	79	Medicina Interna	
87	F	80	Urgencias Adultos Consulta Externa	
88	M	71	Cirugía General	
89	M	50	Urgencias Adultos	Choque séptico
90	M	65	Urología Consulta Externa	
91	F	75	Medicina Interna	
92	M	67	Urología Consulta externa	
93	F	68	Urología	
94	F	66	Cirugía General	
95	F	62	Urología Consulta Externa	
96	F	73	Medicina Interna	
97	M	70	Urgencias Adultos	
98	M	73	Consulta Externa	
99	F	69	Medicina Interna	
100	M	80	Consulta Externa	
101	F	70	Consulta Externa	
102	F	69	Consulta Externa	
103	F	86	Medicina Interna	Enfermedad vascular cerebral isquémica + choque séptico
104	F	63	Consulta Externa	
105	M	80	Consulta Externa	

Tabla 3. Características de los pacientes de donde se aisló *E. coli*

Urocultivos

Las muestras de orina obtenidas por micción media, fueron sembradas por el método de asa calibrada en agar sangre y CROMAgar. Transcurridas las 24 h de incubación a 37°C se realizó el conteo de UFC. Conteos mayores o iguales a 10^5 UFC/ml fueron seleccionados para la identificación del agente aislado y la realización de las pruebas de susceptibilidad a antibióticos.

Identificación y sensibilidad a antibióticos

A partir del cultivo de 24 h en placa de agar, con asa estéril, se tocan superficialmente de 4 a 5 colonias grandes o 5 a 10 colonias pequeñas aisladas y morfológicamente similares. Se emulsionan en 3 ml de agua desionizada y esterilizada, hasta obtener una turbidez similar a la del estándar de 0.5 de MacFarland, la suspensión se agita de 2 a 3 segundos en el vórtex, se pipetea 100 µL de la suspensión en 25 ml de agua desionizada y se mezcla.

Antes de cargar los paneles del sistema automatizado MicroScan se realiza la prueba de oxidasa, posteriormente se instila el inóculo en cada pocillo del panel con ayuda de un cuentagotas. Los pocillos correspondientes a las pruebas GLU (glucosa), URE (ureasa), H₂S (ácido sulfhídrico), LYS (lisina), ARG (arginina), ORN (ornitina), y DCB (descarboxilasa base) se recubrieron con tres gotas de aceite mineral. Enseguida, se incuban los paneles a 35°C durante 16 h. Finalmente, los resultados son interpretados por el software autoScan®-4 para la identificación y sensibilidad a antibióticos de cada aislamiento.

Conservación

Los aislamientos identificados como *E. coli* procedentes de urocultivos con conteos mayores o iguales a 10^5 UFC/ml y con prueba de sensibilidad a antibióticos, se sembraron en agar MacConkey y transcurridas 24 h se

recolectaron las colonias para conservarlas en criotubo con 5 ml de medio líquido infusión cerebro-corazón (BHI) / Glicerol al 50% v/v y se conservaron a -70°C, identificados con el número consecutivo en base a la fecha de realización del urocultivo.

Determinación de grupo filogenético

Se utilizó la técnica de PCR múltiple de acuerdo a Clermont *et al*, 2000. Ésta es una técnica simple y rápida que usa una combinación de dos genes; *chuA* y *yjaA*, así como un fragmento de DNA; TSPE4.C2 para determinar los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D. Las condiciones para la amplificación de fragmentos de PCR se describen en la tabla 4. La amplificación se realizó en un ciclo inicial de desnaturalización, 35 ciclos de amplificación y un ciclo de extensión final, el volumen de reacción para cada muestra fue de 10 µl, con las siguientes concentraciones de reactivos; 3.9 mM de MgCl₂, 0.7 U de taq polimerasa, 1.2 mM/µl de dNTPs y los iniciadores *chuaAF* (4.17 pmol), *chuAR* (8.34 pmol), *yjaA* (2.1 pmol) y TSPE4.C2 (7 pmol) se describen en la tabla 5.

Fase	Desnaturalización Inicial	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Extensión final
Temperatura °C	94	94	58	72	72
Tiempo	5'	30"	24"	30"	5'
Ciclos	1	35			1

Tabla 4. Programa utilizado para la amplificación de los genes *chuaA*, *yjaA*, y el fragmento TSPE4.C2.

Gen	Iniciadores (5'-3')		Producto (pb)	Ref.
<i>chuA</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	42
<i>yjaA</i>	TGAAGTGTCTAGGAGACGCT	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	42
TSPE4.C2	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	42

Tabla 5. Secuencias de los iniciadores empleados para la determinación del grupo filogenético, así como el peso del producto amplificado respectivamente.

Identificación de genes de virulencia

Se identificaron los genes *ecpA*, *ecpA** (*ecpR-B* para variantes del gen *ecpA*), *fimH*, *papC*, *sfa/focDE*, *focG*, *sfaS*, *hlyA*, *iutA*, *fyuA* e *ibeA*, mediante la técnica de PCR. Los programas de amplificación se describen en la tabla 5 y los iniciadores utilizados se describen en la tabla 6. El volumen final para cada reacción fue de 10 µl, con las concentraciones de cada reactivo descritas en la tabla 7.

Gen	Fase	Desnaturalización Inicial	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Extensión final
<i>ecpA</i>	°C	96	94	62	72	72
	Tiempo	5'	30''	45''	45''	5'
	Ciclos	1	35			1
<i>ecpR-B</i>	°C	95	95	57.5	72	72
	Tiempo	5'	30''	33''	1'30''	5'
	Ciclos	1	35			1
<i>fimH</i>	°C	96	94	65.5	72	72
	Tiempo	5'	30''	30''	30''	5'
	Ciclos	1	35			1
<i>papC</i>	°C	95	94	58.2	72	72
	Tiempo	5'	30''	30''	40''	5'
	Ciclos	1	40			1
<i>sfa/foc</i>	°C	95	94	68	68	72
	Tiempo	5'	30''	30''	40''	3'
	Ciclos	1	35			1
<i>focG</i>	°C	95	95	68	72	72
	Tiempo	5'	30''	40''	30''	5'
	Ciclos	1	30			1
<i>sfaS</i>	°C	95	94	64	72	72
	Tiempo	5'	30''	30''	25''	5'
	Ciclos	1	35			1
<i>hlyA</i>	°C	95	94	63	68	72
	Tiempo	5'	30''	30''	1'	3'
	Ciclos	1	35			1
<i>fuya</i> <i>iutA</i> <i>ibeA</i>	°C	95	94	67	68	72
	Tiempo	5'	30''	30''	1'40''	5'
	Ciclos	1	30			1

Tabla 6. Programas de amplificación para los genes de virulencia.

Gen	Oligonucleótido delantero (5'-3')	Oligonucleótido reverso (5'-3')	Producto (pb)	Ref
<i>ecpA</i>	TGAAAAAAAAAGGTTCTGGCAATAGC	CGCTGATGAGGAGAAAGTGAA	488	35
<i>ecpR-B</i>	GTGACATGGCAAAATGATACAGC	TCACGGGAATGAACCTTATCACC	1300	35
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCCGTGG	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	10
<i>papC</i>	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	200	10
<i>sfa/focDE</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGA	410	10
<i>focG</i>	CAGCACAGGCAGTGGATACGA	GAATGTCGCCTGCCCATTTGCT	360	10
<i>sfaS</i>	GTGGATACGACGATTACTGTG	CCGCCAGCATTCCCTGTATTTC	240	10
<i>hlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTC	1117	10
<i>fyuA</i>	TGATTAACCCCGCGACGGGAA	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	880	10
<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	300	10
<i>ibeA</i>	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	170	10

Tabla 7. Oligonucleótidos para la amplificación de los genes que de virulencia.

Gen	Mg ²⁺ mM	Taq polimerasa U	dNTPs mM/ µL	Iniciadores pmol	BSA mg	Sol. Q
<i>ecpA</i>	1.5	1	2.5	20		
<i>ecpR-B</i>	2.5	1.25	1	10	2.5	1.5x
<i>fimH</i>	2.0	0.75	1	7.5		
<i>papC</i>	2.0	0.9	1	8.2		2.0x
<i>sfa/focDE</i>	2.5	0.5	1	15		
<i>focG</i>	3.0	0.63	1	10		
<i>sfaS</i>	1.5	0.6	1	7.5		
<i>hlyA</i>	3.0	0.6	1	10		
<i>fiuA</i>	3.0	0.5	1	4		
<i>iutA</i>	3.0	0.5	1	4		
<i>ibeA</i>	3.0	0.5	1	4		

Tabla 8. Concentración de reactivos para la amplificación de cada gen.

Análisis estadístico

Para determinar diferencias significativas entre la población de aislamientos de *E. coli* provenientes de hombres y mujeres, así como entre los grupos filogenéticos para la resistencia a antibióticos y factores de virulencia, se empleó el software GraphPad Prism v5. Mediante éste se aplicó la prueba de Fisher, con un intervalo de confianza de 99% y significancia estadística cuando $P^* \leq 0.05$.

Resultados

Urocultivos

Para los fines de este trabajo sólo se seleccionaron los urocultivos positivos cuyo agente aislado e identificado fue *E. coli*. De los 105 urocultivos realizados; 103 tuvieron un conteo de UFC $\geq 100,000$, 1 aislamiento con un conteo de 80,000 UFC y un aislamiento con un conteo de 30 000 UFC, ambos se incluyeron debido a que presentaban antecedentes de ITU recurrente, así como de haber recibido tratamiento previo con ceftriaxona.

Distribución del grupo filogenético entre los aislamientos de *E. coli*

Para determinar qué grupo filogenético es el más frecuente entre los aislamientos de *E. coli* se realizó la amplificación de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento TSPE4.C2 (42) Se encontró que el grupo más frecuente es el B2, seguido del A, D y B1, con los siguientes porcentajes 59.05%, 24.76%, 9.52% y 6.67% respectivamente. En cuanto a la distribución de grupos filogenéticos entre los aislamientos de *E. coli* en hombres y mujeres, el análisis estadístico indicó que no existe diferencia significativa para la distribución en ambos grupos, como se ilustra en la tabla 9.

Grupo filogenético	Prevalencia, no. (%)		<i>P</i> * ≤ 0.05
	Aislamientos en hombres n=39	Aislamientos en mujeres n=66	
A	9 (23.08)	17 (25.76)	0.818
B1	2 (5.13)	5 (7.58)	1.000
B2	26 (66.67)	36 (54.55)	0.304
D	2 (5.13)	8 (12.12)	0.315

Tabla 9. Distribución de grupos filogenéticos entre los aislamientos de *E. coli* en hombres y mujeres adultos mayores (*p* significativa ≤ 0.05).

Susceptibilidad a antibióticos en los aislamientos de *E. coli*

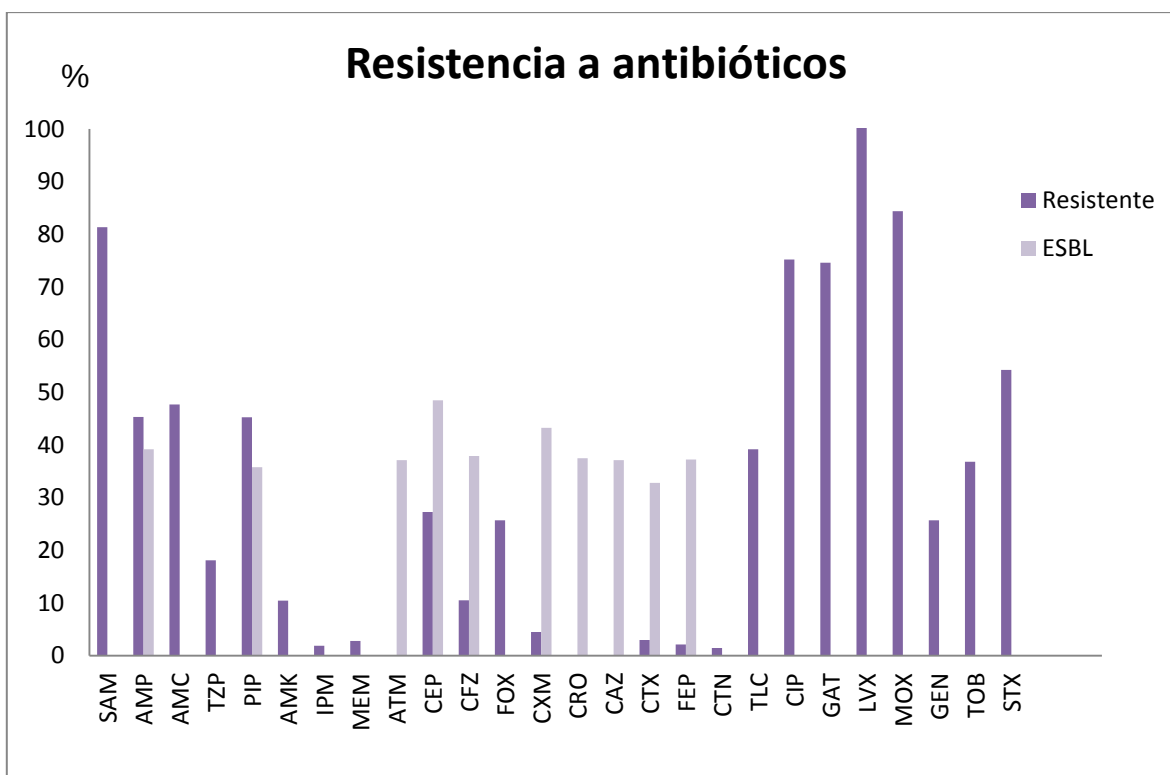
Para determinar la resistencia que presentaron los aislamientos de *E. coli*, se determinó la susceptibilidad a los siguientes antibióticos; ampicilina, ampicilina/sulbactam, amicacina, amoxicilina/ácido clavulánico, aztreonam, ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima, ceftazidima, cefotaxima, cafoxitina, cefalotina, cefazolina, cefepime, cefotetan, cefuroxima, ciprofloxacino, gatifloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem, moxifloxacina, piperacilina/tazobactam, piperacilina, trimetoprim/sulfametoaxol, ticarcicilina/ácido clavulánico, tobramicina. También se determinó la presencia de aislamientos productores de β -lactamasas. Los resultados indican que de los 105 aislamientos de *E. coli*:

- Más del 50% de las cepas aisladas fueron resistentes a ampicilina/sulbactam, ciprofloxacino, gatifloxacina, levofloxacina, moxifloxacina y trimetoprim/sulfametoaxol.
- Entre el 10% y 50% fueron resistentes a ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, ceftazidima, cefalotina, gentamicina, piperacilina/tazobactam, piperacilina y ticarcicilina/ácido clavulánico.
- El 90% o más fueron sensibles a amicacina, cefotetan, imipenem y meropenem.
- El 34.29% producen algún tipo de β -lactamasa; ESBL^{-a} y ESBL^{-b} para los siguientes antibióticos; ampicilina, aztreonam, ceftriaxona, ceftazidima, cefalotina, cefazolina, cefepima, cefuroxima, y piperacilina.

Estos resultados se ilustran en la gráfica 5, los datos porcentuales de resistencia a antibióticos se presentan en la tabla 10

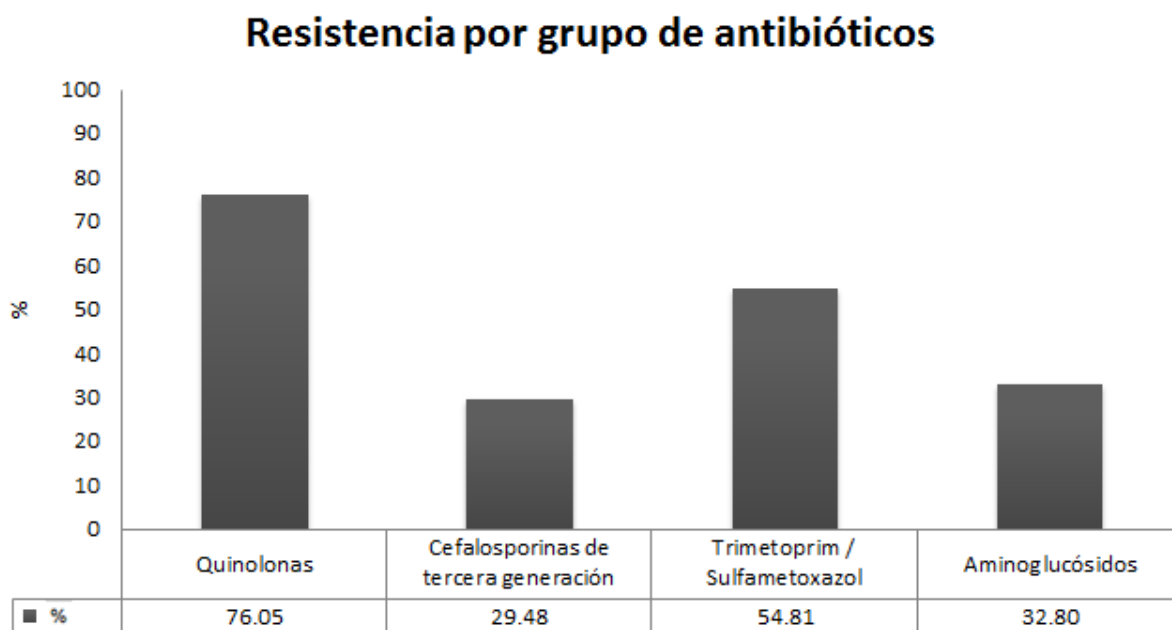
Antibiótico	%Sensibles	%Resistentes	%ESBL
SAM	18.63	81.37	0
AMK	89.52	10.48	0
AMP	15.46	45.36	39.18
AMC	52.31	47.69	0
ATM	62.89	0	37.11
CRO	62.5	0	37.50
CAZ	62.89	0	37.11
CTX	64.18	2.99	32.84
FOX	74.29	25.71	0
CEF	24.24	27.27	48.48
CFZ	51.58	10.52	37.89
CIP	24.76	75.24	0
FEP	60.64	2.13	37.23
CXM	52.24	4.48	43.28
CTN	98.55	1.45	0
ESBL ^{-a} Scrn	0	0	100
ESBL ^{-b} Scrn	0	0	100
GAT	25.37	74.63	0
GEN	66.35	33.65	0
IPM	98.10	1.90	0
LVX	24.76	75.24	0
MEM	97.22	2.78	0
MOX	15.63	84.37	0
TZP	81.90	18.10	0
PIP	18.95	45.26	35.79
SXT	45.19	54.81	0
TLC	60.81	39.19	0
TOB	45.71	54.29	0

Tabla 10. Prevalencia de resistencia a antibióticos entre los 105 aislamientos de *E. coli*.



Gráfica 5. Resistencia global a antibióticos (ESBL: *E. coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido).

La resistencia por grupo de antibióticos: (I) quinolonas: ciprofloxacino, gatifloxacina, levofloxacino y moxifloxacino, (II) cefalosporinas de tercera generación: ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima y cefotetan, (III) trimetoprim con sulfametoxazol, (IV) aminoglucósidos: gentamicina, amikacina y tobramicina. Mostró que el grupo de quinolonas es el que presenta mayor resistencia, seguido por trimetoprim/sulfametoxazol, aminoglucosidos y finalmente el de las cefalosporinas de tercera generación, en este último grupo la resistencia esta dada por la producción de β -lactamasas (Gráfica 6).



Gráfica 6. Resistencia global a los cuatro grupos de antibióticos para el tratamiento de una ITU, quinolonas, cefalosporinas de tercera generación, trimetoprim/sulfametoxazol y aminoglucósidos.

Resistencia a antibióticos en los aislamientos de *E. coli* entre hombres y mujeres

Para saber si los aislamientos de *E. coli* en hombres y mujeres presentaron diferencia en la resistencia a antibióticos se analizaron los datos de susceptibilidad por medio de la prueba de Fisher, el análisis indicó que:

- Los aislamientos de *E. coli* en hombres son significativamente más resistentes a ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefazolina, ciprofloxacino, gatifloxacina, levofloxacina y tobramicina, que los aislamientos en mujeres (Tabla 11).

Antibiótico	Aislamientos en mujeres no (%)		Aislamientos en hombres no (%)		*P
	n	R	n	R	
AMP	40	27(67.50)	39	17(43.59)	0.024
AMC	40	15(37.50)	25	16(64.0)	0.045
CFZ	58	3 (5.17)	37	7 (18.92)	0.043
CIP	66	42 (63.64)	39	37 (94.87)	0.0003
GAT	41	26 (63.41)	26	24(92.31)	0.009
LVX	66	42(63.64)	39	37(94.87)	0.0003
PIP	57	26(45.61)	38	17(44.74)	0.032
TOB	66	29(43.94)	39	28(71.79)	0.008

Tabla 11. Sensibilidad a antibióticos de los aislamientos de *E. coli* entre hombres y mujeres.

Para determinar si existe diferencia para la distribución de aislamientos resistentes en los cuatro grupos de antibióticos; quinolonas, cefalosporinas de 3^{ra} generación, trimetoprim/sulfametoxazol y aminoglucósidos se realizó el analisis estadístico por medio de la prueba de Fisher. El análisis indicó que los aislamientos de *E. coli* provenientes de hombres fueron significtivamente mas resistentes a quinolonas, cefalosporinas de tercera generación y aminoglucósidos que las aisladas en mujeres (Tabla 12).

Sexo	Quinolonas (%)	C3G (%)	STX(%)	AG (%)
Hombres	94.78	37	52.31	41.59
Mujeres	64.58	25.25	60.53	28.28
*P	0.0001	0.026	0.538	0.017

Tabla 12. Resistencia para los cuatro grupos de fármacos de elección en los aislamientos de hombres y mujeres, *P ≤ 0.05 significativa.

Resistencia a antibioticos por grupo filogenético

Con el objetivo de determinar si los aislamientos provenientes de cada grupo filogenético presentaban diferencia en la distribución de la resistencia para los antibioticos probados, se analizaron los datos con la prueba de Fisher (Tabla 13).

El análisis indicó que los aislamientos pertenecientes al grupo filogenético A son significativamente más sensibles a tobramicina que los de los grupos B1, B2 y D. Que los aislamientos pertenecientes al grupo B1 son significativamente más resistentes a cefotaxima que los de los grupos A, B2 y D. Además de que los aislamientos de *E. coli* pertenecientes al grupo B2 son significativamente menos resistentes a cefotaxima, gentamicina y a cefuroxima que los aislamientos de los grupos A, B1 y D.

Grupo	A %		B1 %		B2 %		D %	
AB	R	*P	R	*P	R	*P	R	*P
CTX	6.67	0.759	0	0.046	2.78	0.022	0	0.299
CXM	0	0.608	0	0.607	5.56	0.006	16.67	0.100
GEN	46.15	0.146	50	0.393	24.19	0.031	44.44	0.473
TOB	0	0.003	50	1.000	50	0.155	50	0.747

Tabla 13. Sensibilidad a antibióticos en cada grupo filogenético, *P ≤0.05 es significativa.

En la distribución de aislamientos resistentes a los grupos de antibióticos; quinolonas, cefalosporinas de 3^{ra} generación (C3G), trimetoprim/sulfametoxazol (SXT) y aminoglucósidos (AG), entre los grupos filogenéticos, los resultados en la tabla 14 muestran que los aislamientos de *E. coli* que pertenecen al grupo D son menos resistentes a quinolonas que los de los grupos A, B1 y B2; los aislamientos pertenecientes al grupo B2 son significativamente menos resistentes a cefalosporinas de 3^{ra} generación que los que pertenecen a los grupos A, B1 y D.

Grupo Filogenético	Quinolonas %	*P	% C3G	*P	% SXT	*P	% AG	*P
A	76.32	1.000	33.33	0.338	57.69	0.821	24.59	0.432
B1	75	1.000	47.62	0.079	83.33	0.218	38.10	0.239
B2	79.12	0.138	22.83	0.004	48.39	0.159	27.96	0.691
D	58.06	0.024	41.67	0.118	70	0.505	37.93	0.283

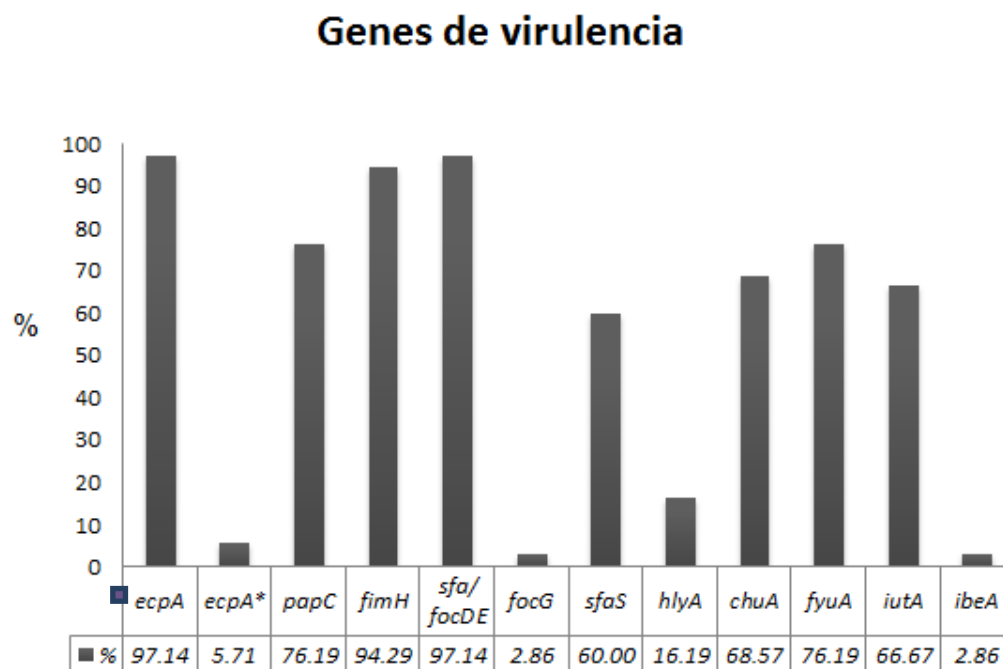
Tabla 14. Resistencia entre los aislamientos de los cuatro grupos filogenéticos para los grupos de antibióticos en el tratamiento de una ITU, *P significativo cuando es ≤0.05.

Prevalencia de genes de virulencia entre los aislamientos de *E. coli*

La prevalencia de los genes de virulencia *fimH*, *sfaS*, *focG*, *papC*, *sfa/focDE*, *ecpA*, *ecpR-B*, *hlyA*, *ibeA*, *iutA*, *fyuA* entre los 105 aislamientos de *E. coli* se muestra en la gráfica 7 y figura 8. Se observa que los aislamientos de *E. coli* causantes de ITU poseen alta prevalencia de genes que codifican para fimbrias y adhesinas, no sólo para los tipos comunes como ECP (con sus variantes genéticas) o más conservados como el tipo 1, sino también para fimbrias; FIC, P y S cuyos receptores se encuentran en el riñón, en las células epiteliales de los túbulos proximales y distales, en los ductos colectores, glomérulos, intersticio renal y en el endotelio renal vascular, lo que les confiere la capacidad de generar ITU altas y por lo tanto complicadas.

Cerca del 70% de los aislamientos poseen genes que codifican para sistemas de captación de hierro frecuentemente encontrados en UPEC: *iutA* para aerobactina y *fyuA* para yersiniabactina, además de que el 68.57% de los aislamientos poseen el gen *chuA* que ayuda a la captación de hierro del grupo hemo y a la formación de comunidades intracelulares o biopelículas, además de estar presente en todas las cepas patógenas de *E. coli* que pertenecen a los grupos filogenéticos B2 y D.

El 16.19% de los aislamientos poseen el gen *hlyA* (gen estructural de la α -hemolisina) presente en cepas patógenas con capacidad de producir ITU altas. Además se encontró que el 2.86% de los aislamientos poseen el gen *ibeA* involucrado en la síntesis de la invasina IbeA que se expresa preferentemente en cepas de *E. coli* productoras de meningitis.



Gráfica 7. Prevalencia de los genes de virulencia entre los aislamientos de *E. coli*. (*ecpA** variantes genéticas del gen *ecpA*).

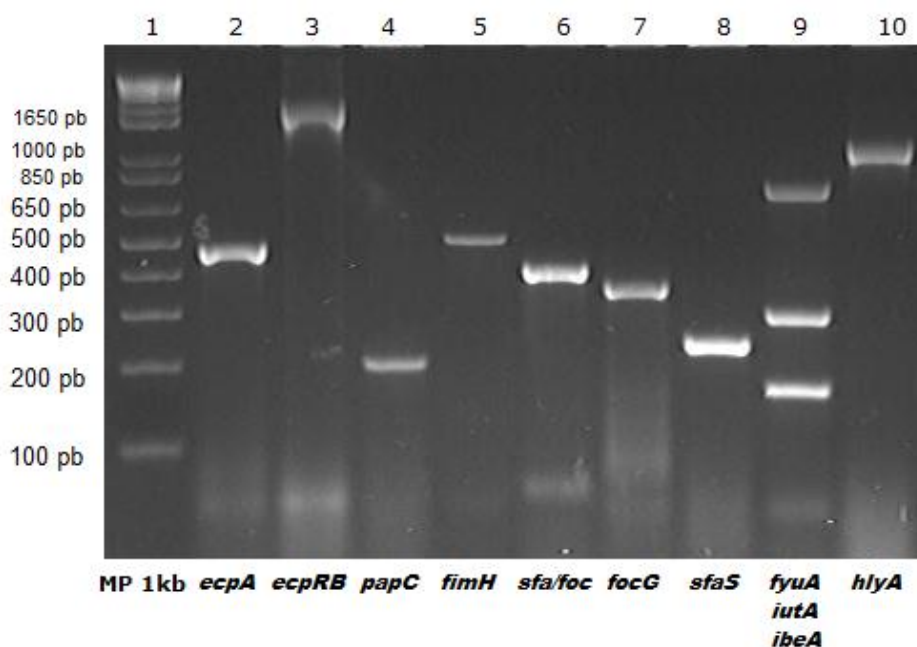


Figura 8. Visualización en gel de agarosa al 2% de los fragmentos amplificados de los genes de virulencia utilizando la cepa de referencia CFT073 (Pozos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10). Marcador de peso molecular de 1Kb (Pozo 1).

Distribución de genes de virulencia en los aislamientos de *E. coli* entre hombres y mujeres

Para determinar si los aislamientos de *E. coli* en hombres y mujeres mostraban una distribución diferente de genes de virulencia debido a las diferencias anatómicas y hormonales entre ambos grupos, además de las secreciones prostáticas en hombres y la microbiota genital en las mujeres. Se analizaron los resultados para ambos grupos. El análisis indica que los aislamientos de *E. coli* no muestran diferencia significativa entre hombres y mujeres (Tabla 15). Sin embargo se puede notar que el gen *ibeA* y las variantes del gen *ecpA** sólo se encuentran en *E. coli* aisladas de mujeres. Además de que todos los aislamientos de *E. coli* de hombres con ITU presentan los genes *ecpA* y *sfa/focDE*.

Sexo	Hombres		Mujeres		<i>P</i> *≤0.005
Gen	Frecuencia n= 39	%	Frecuencia n= 66	%	
<i>ecpA</i>	39	100	63	95.43	0.292
<i>ecpA</i> * (<i>ecpR-B</i>)	0	0	6	9.09	0.082
<i>papC</i>	30	76.92	50	75.76	1.000
<i>fimH</i>	37	76.92	62	93.94	1.000
<i>sfa/focDE</i>	39	100	63	95.45	0.292
<i>focG</i>	1	2.56	2	3.03	1.000
<i>sfaS</i>	24	61.54	39	59.09	0.839
<i>hlyA</i>	4	10.26	13	19.7	0.276
<i>chuA</i>	28	71.79	44	66.67	0.666
<i>fyuA</i>	31	79.49	49	74.24	0.638
<i>iutA</i>	26	79.49	44	66.67	1.000
<i>ibeA</i>	0	0	3	4.55	0.292

Tabla 15. Distribución de los factores de virulencia entre los aislamientos para la población de hombres y mujeres.

Distribución de genes de virulencia por grupo filogenético

Para determinar si existía relación entre los genes de virulencia y el grupo filogenético al que pertenecen los aislamientos de *E. coli*, se analizó la frecuencia de genes de virulencia en los diferentes grupos filogenéticos. El análisis indicó (Tabla 16) que todos los aislamientos del grupo B2 y D poseen el gen *chuA*, mientras que ningún aislamiento de los grupos A y B1 lo poseen. Que el grupo B2 abarca significativamente más aislamientos que el gen *fyuA*, y que el gen *iutA* se encontró distribuido significativamente en menor proporción entre los aislamientos del grupo A que entre los de los otros tres grupos.

Grupo filogenético	A			B1			B2			D		
Gen	n=26	%	p≤0.05	n=7	%	p≤0.05	n=62	%	p≤0.05	n=10	%	p≤0.05
<i>ecpA</i>	26	100	1.000	7	100	1.000	61	98.39	1.000	10	100	1.000
<i>papC</i>	17	65.38	0.197	4	57.14	0.360	50	80.65	0.167	8	80	1.000
<i>fimH</i>	24	92.31	0.635	6	85.71	0.345	59	95.16	0.687	10	100	1.000
<i>sfa/focDE</i>	25	96.15	1.000	7	100	1.000	61	98.39	0.566	9	90	0.261
<i>focG</i>	0	0	0.572	0	0	1.000	2	3.23	1.000	1	10	0.262
<i>sfaS</i>	13	50	0.255	5	71.43	0.699	42	67.74	0.068	3	30	0.085
<i>hlyA</i>	5	19.23	0.759	0	0	0.595	10	16.13	1.000	2	20	0.663
<i>chuA</i>	0	0	0.0001	0	0	0.001	62	100	0.0001	10	100	0.028
<i>fyuA</i>	15	57.69	0.016	4	57.14	0.353	54	87.10	0.002	7	70	0.698
<i>iutA</i>	13	50	0.003	5	71.43	1.000	46	74.19	0.059	6	60	0.728
<i>ibeA</i>	1	3.85	1.000	0	0	1.000	1	1.61	0.566	1	10	0.261

Tabla 16. Distribución de los factores de virulencia en cada grupo filogenético, ***P** significativa cuando es ≤0.05.

Aislamientos multiresistentes

Para determinar la prevalencia de aislamientos multiresistentes (MR) de *E. coli* en adultos mayores se determinó el porcentaje de aislamientos resistentes a tres ó más antibióticos, los resultados indican que el 89.52% de los aislamientos son resistentes a tres o más antibióticos.

La distribución de aislamientos MR entre hombres y mujeres indica que en el grupo de hombres hay significativamente más aislamientos multiresistentes (Tabla 17).

Sexo	MR % (frecuencia)
Hombres (n=39)	100 (39)
Mujeres (n=66)	83.33 (55)
p≤0.05	0.006

Tabla 17. Distribución de los aislamientos de *E. coli* MR entre la población de hombres y mujeres con ITU.

En la distribución de aislamientos multiresistentes en cada grupo filogenético se observa que el grupo B2 es el grupo que posee significativamente mayor número de aislamientos multiresistentes, aunque existe un alto porcentaje de aislamientos multiresistentes en los grupos A, B1 y D (Tabla 18).

Grupo filogenético	%MR (frecuencia)	p≤0.05
A (n=26)	80.77 (21)	0.135
B1 (n=7)	85.71 (6)	0.550
B2 (n=62)	95.16 (59)	0.047
D (n=10)	80 (8)	0.281

Tabla 18. Distribución de los aislamientos de *E. coli* MR entre los grupos filogenéticos.

En referencia a los genes de virulencia entre los aislamientos de *E. coli* que fueron multiresistentes y los que no lo fueron, es significativa la presencia de los genes *fyuA* e *iutA* que se encuentran distribuidos principalmente entre los aislamientos multiresistentes (Tabla 19).

Gen	MR (n= 94)	NO-MR (11)	<i>P</i> *
	(n) %	(n) %	
<i>ecpA</i>	(87) 92.55	(9) 81.81	0.239
<i>papC</i>	(74) 78.72	(6) 54.55	0.127
<i>fimH</i>	(89) 94.68	(10) 90.91	0.494
<i>sfa/focDE</i>	(92) 97.87	(10) 90.91	0.285
<i>hlyA</i>	(13) 13.83	(4) 36.36	0.076
<i>focG</i>	(2) 2.13	(1) 9.09	0.285
<i>sfaS</i>	(56) 59.57	(7) 63.63	1.000
<i>chuA</i>	(67) 71.27	(6) 45.45	0.096
<i>fyuA</i>	(76) 80.85	(4) 36.36	0.003
<i>iutA</i>	(67) 71.28	(3) 27.27	0.005
<i>ibeA</i>	(2) 2.13	(1) 9.09	0.285

Tabla 19. Distribución de los genes que codifican para FV entre las cepas multiresistentes (MR) y las no multiresistentes (NO-MR). **P* significativa cuando es ≤0.05.

Aislamientos resistentes a quinolonas

El 76.20% de los 105 aislamientos de *E. coli* fueron resistentes por lo menos a dos de los siguientes antibióticos; ciprofloxacino, gatifloxacino, levofloxacino y moxifloxacino. El grupo filogenético más frecuente en estos aislamientos resistentes a quinolonas fue el B2, seguido del A, D, y B1 con 61.25%, 25%, 7.5% y 6.25% respectivamente.

Finalmente para determinar si se cumple la premisa de que los aislamientos que son resistentes a quinolonas poseen menos factores de virulencia que los que son sensibles se realizó el análisis estadístico.

El análisis indica que la premisa no se cumple pues no existe diferencia significativa para la distribución de los genes de virulencia; *papC*, *fimH*, *sfa/focDE*, *hlyA*, *sfaS*, *chuA*, *iutA* e *ibeA*, entre los aislamientos que fueron resistentes y sensibles a quinolonas, además de que los aislamientos que son resistentes a quinolonas poseen significativamente más proporción de los genes *ecpA* y *fyuA* (Tabla 20).

Gen	Resistentes a quinolonas n=80	Sensibles a quinolonas n=25	P
	n (%)	n (%)	
<i>ecpA</i>	77 (96.25)	20 (80)	0.018
<i>papC</i>	61 (76.25)	18 (72)	0.791
<i>fimH</i>	76 (95)	23 (92)	0.626
<i>sfa/focDE</i>	79 (98.75)	23 (92)	0.140
<i>hlyA</i>	10 (12.5)	7 (28)	0.115
<i>focG</i>	0	3 (12)	0.012
<i>sfaS</i>	49 (61.25)	14 (56)	0.648
<i>chuA</i>	55 (68.75)	17 (68)	1.000
<i>fyuA</i>	66 (82.5)	14 (56)	0.014
<i>iutA</i>	57 (71.25)	13 (52)	0.091
<i>ibeA</i>	2 (2.5)	1 (4)	0.562

Tabla 20. Distribución de los genes de virulencia entre los aislamientos que son resistentes y sensibles a quinolonas.

Discusión

Los 105 aislamientos de *E. coli* en adultos mayores con infección en el tracto urinario pertenecieron, en su mayoría, al grupo filogenético B2 lo cuál fue similar a lo reportado en la literatura (42, 48) y lo encontrado en estudios realizados en la ciudad de México (Molina *et al* 2011) y en adultos mayores con ITU en Nottingham, UK (Croxall *et al* 2011). La distribución de los grupos filogenéticos entre los aislamientos obtenidos de hombres y mujeres adultos mayores indica que es similar para ambos grupos con una naturaleza patógena, lo que concuerda con lo encontrado en estudios realizados alrededor del mundo en hombres y mujeres en edad reproductiva y en infantes.

Los genes que se encontraron en alta frecuencia fueron los implicados en la adhesión *ecpA*, *papC*, *fimH*, *sfa/focDE* y *sfaS*, así como los implicados en la síntesis de sistemas de captación de hierro como *chuA*, *fyuA* e *iutA*. Esto se explica dado que el gen *chuA* se presentó en todas las cepas patógenas de *E. coli* (38), a que *fyuA* está implicado en la síntesis del sideróforo yersiniabactina y es expresado preferentemente por las cepas de *E. coli* provenientes del tracto urinario (41), y a que el sideróforo aerobactina es considerado como un marcador de virulencia en UPEC (32). Estos resultados nos indican que las cepas de *E. coli* que causan ITU en México poseen una mayor prevalencia de genes involucrados en adhesión; *papC*, *sfaS* y *sfa/focDE* que las cepas aisladas en España de adultos mayores con ITU en el trabajo de Craxall *et al*, 2011.

El gen *hlyA* que codifica para la α -hemolisina, en este trabajo se observó presente en una proporción semejante a la encontrada en el trabajo de Craxall *et al*, 2011 realizado en adultos mayores. Sin embargo, al comparar la prevalencia del gen *hlyA* en las cepas de *E. coli* en mi trabajo y en el realizado por Johnson *et al*, 1999 en aislamientos de *E. coli* en adultos con urosepsis realizado en Seattle, Washington, se observa que la prevalencia de *hlyA* es menor en adultos mayores que en adultos con urosepsis debido a que la frecuencia con que se aíslan cepas

hemolíticas de *E. coli* incrementa con la severidad de la enfermedad; heces < bacteriuria asintomática < cistitis < pielonefritis (51).

El hecho de que exista un porcentaje considerable de cepas que poseen el gen *hlyA* entre los aislamientos de *E. coli* en adultos mayores, puede sugerir que éstas tienen un potencial más virulento que las que no poseen el gen *hlyA* en base a estudios previos (51), que indican que la hemolisina juega un rol en el desarrollo de la enfermedad ya que al generar mutantes no-hemolíticas, éstas pierden virulencia, así mismo existe evidencia de que en los organismos nefrotóxicos la hemolisina tiene un papel decisivo en la virulencia. Además de que estudios realizados en ratones indican que las cepas hemolíticas son más tóxicas que las no-hemolíticas (51).

Los genes que se encontraron en menor proporción fueron; *focG* e *ibeA*. La frecuencia en que se encontró el gen *focG* fue notablemente menor que la encontrada en el trabajo de Johnson *et al* 2000 (10). El gen *ibeA*, se encontró en baja frecuencia entre los 105 aislamientos de *E. coli* debido a que éste se encuentra con una alta prevalencia en los aislamientos de *E. coli* productores de meningitis (50), sin embargo, se considera que puede promover la invasión del torrente sanguíneo durante una urosepsis al promover la penetración de la barrera sanguínea cerebral durante la meningitis (10, 52). El análisis estadístico indicó que no existe diferencia entre la distribución de estos factores de virulencia en la población de hombres y mujeres adultos mayores. En contraste, la distribución de los factores de virulencia entre los cuatro grupos filogenéticos indica que los aislamientos del grupo B2 poseen mayor proporción del gen *fyuA*, y que el gen *iutA* se encuentra en menor proporción en el grupo filogenético A que en los otros tres grupos.

Los aislamientos de *E. coli* de adultos mayores mostraron alta resistencia a los antibióticos de elección en el tratamiento de una ITU principalmente en el grupo de las quinolonas. La resistencia a ciprofloxacino fue mayor que la encontrada en

aislamientos de *E. coli* en adultos mayores en Nottingham, UK (49) y mayor a lo reportado en aislamientos de la población mexicana (6, 8). Los aislamientos de *E. coli* provenientes de hombres adultos mayores fueron significativamente más resistentes a quinolonas que las provenientes de mujeres y estos aislamientos preponderantemente pertenecen a los grupos A, y B2. Esto significa que las cepas productoras de ITU en hombres adultos mayores son más resistentes a fluoroquinolonas que las de mujeres, lo que corresponde con el estudio de Sahuquillo *et al*, 2011 realizado en España, donde se analizó la resistencia en más de 100,000 aislamientos de *E. coli* en pacientes de la comunidad Valenciana y se encontró que los aislamientos en hombres son más resistentes a Ciprofloxacino que los aislamientos de *E. coli* en mujeres, además de que la prevalencia de aislamientos resistentes a este antibiótico aumenta conforme lo hace la edad del paciente (53).

Las cepas resistentes a quinolonas poseen generalmente menos factores de virulencia que las cepas susceptibles (54). Sin embargo, dentro de los 105 aislamientos analizados e identificados como resistentes por lo menos a dos de las cuatro quinolonas que se probaron (ciprofloxacino, gatifloxacina, levofloxacina y moxifloxacina) se encontró un alto porcentaje de genes implicados en la síntesis de adhesinas, *ecpA*, *papC*, *fimH*, *sfa/focDE* y *sfaS*, así como genes implicados en la síntesis de sistemas de captación de hierro *chuA*, *fyuA* e *iutA*, con lo cual se observa que estas cepas no cumplen la premisa de poseer pocos factores de virulencia. Además, la distribución de cepas resistentes a quinolonas entre los grupos filogenéticos indica que la mayoría de los aislamientos resistentes pertenecen al grupo B2, lo que corresponde con lo previamente reportado para *E. coli* causante de ITU resistente a quinolonas en trabajos recientes (55).

Otro fármaco de elección para el tratamiento de una ITU para el que se encontró alta resistencia fue trimetoprim/sulfametoxazol, resultado que coincide con lo previsto en México (6, 8). Sin embargo, el porcentaje de aislamientos resistentes en este trabajo fue mayor que el encontrado en el trabajo de Croxall *et al.*, 2011

(49) para aislamientos en adultos mayores. Este resultado pone de relieve el hecho de que los aislamientos de *E. coli* en adultos mayores en México muestran mayor resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol que los aislamientos de *E. coli* en adultos mayores en Nottingham, UK (49). Así mismo, no se identificó diferencia significativa en la distribución de cepas resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol, ni entre los grupos filogenéticos entre hombres y mujeres, lo que indica que no existe diferencia entre la población por género.

La resistencia para los antibióticos de elección cefalosporinas de tercera generación y aminoglucósidos fue menor que para las quinolonas y trimetoprim/sulfametoxazol. Sin embargo, debe considerarse como alta ya que cerca del 30% de los aislamientos son resistentes a alguno de los fármacos que forman parte de estos grupos, los aislamientos provenientes de hombres fueron significativamente más resistentes a estos dos grupos de fármacos que los obtenidos de mujeres, la distribución de cepas entre los cuatro grupos filogenéticos indicó que no existe diferencia para la distribución de aislamientos resistentes a aminoglucósidos, y la distribución de cepas entre las cefalosporinas de tercera generación indicó que el grupo B2 es el que presenta una menor cantidad de cepas resistentes a este grupo que los otros tres grupos.

El porcentaje de aislamientos que producen β -lactamasas en la población de adultos mayores estudiada, fue mayor que el porcentaje encontrado en el estudio de Arredondo G J *et al*, 2008 (8), trabajo realizado en la población mexicana. Estos resultados nos indican la necesidad de conocer el tipo de β -lactamasa producida en la población mexicana a fin de conocer el fondo genético y orientar hacia el diseño de mejores tratamientos.

Los fármacos para los cuales las cepas de *E. coli* presentaron la menor resistencia fueron cefotetan, imipenem, y meropenem, antibióticos que no se consideran como primera línea de elección para el tratamiento de las infecciones en el tracto urinario. Estos fármacos fueron demostrados con óptima actividad antimicrobiana

contra ESBL en España (56), por lo cual son considerados buena opción para el tratamiento de las ITU en adultos mayores. La actividad y resistencia ante las β -lactamasas bacterianas de los carbapenemos; imipenem y meropenem están dadas por sus características estructurales, en el caso del imipenem, la sustitución del átomo de azufre, que contienen en su anillo principal la mayor parte de los antibióticos β -lactámicos, por un grupo metileno aumenta la reactividad del imipenem con las proteínas fijadoras de penicilina de las bacterias. Además, tiene una cadena lateral hidroxietílica que está unida al anillo β -lactámico en posición trans; esta singular configuración lo hace excepcionalmente estable ante las β -lactamasas bacterianas. En el caso del meropenem, en su estructura contiene un grupo metilo en el C1 y un grupo dimetilcarbamoilpirrolidintio en C2 que sustituye a la cadena lateral tio-alquílica del imipenem. Es precisamente esta sustitución la que incrementa la actividad del meropenem respecto a imipenem. Además el meropenem cuenta con la ventaja respecto al imipenem de alcanzar concentraciones terapéuticas en líquido cefalorraquídeo (57).

En este trabajo se observó que además de que un gran número de aislamientos de *E. coli* en adultos mayores fueron resistentes a antimicrobianos empleados para el tratamiento de ITU, estos aislamientos mostraron multiresistencia. Esta multiresistencia se observó principalmente en los aislamientos provenientes de hombres y pertenecen en mayor proporción al grupo filogenético B2.

La distribución de genes que codifican factores de virulencia entre las cepas multiresistentes y las sensibles, mostró que ambos grupos poseen un alto porcentaje de genes involucrados en la adhesión (*ecpA*, *papC*, *fimH*, *sfa/focDE* y *sfaS*). La distribución de los genes *hlyA*, *ibeA*, *focG* y *chuA* en los dos grupos no fue diferente. Los únicos genes que presentan diferencia significativa entre el grupo de cepas MR y NO-MR fueron *fyuA* (yersiniabactina) e *iutA* (aerobactina), genes que codifican para sistemas de captación de hierro y en este trabajo se encontraron significativamente en mayor proporción en las cepas MR.

Conclusiones

- Los aislamientos de *E. coli* en adultos mayores con ITU pertenecen en su mayoría al grupo filogenético B2, y presentan distribución equitativa en ambos géneros.
- Los aislamientos de *E. coli* en adultos mayores presentan alta resistencia a quinolonas, trimetoprim/sulfametoxazol, aminoglucósidos y cefalosporias de tercera generación.
- Los aislamientos de *E. coli* en adultos mayores presentan un alto porcentaje de genes involucrados en la síntesis de fimbrias e implicados en la síntesis de sistemas de captación de hierro.
- Los aislamientos de *E. coli* en adultos mayores con ITU presentaron alta frecuencia del gen *papC* lo que indica que les califica como potencialmente productores de pielonefritis.
- Los aislamientos de *E. coli* en adultos mayores son altamente multiresistentes, entre estos aislamientos se identificó alta frecuencia de los genes *fyuA* y *iutA*.
- Los fármacos más efectivos para el tratamiento de ITU en adultos mayores son cefotetan y los carbapenemos; imipenem y meropenem.

Bibliografía

1. Vejborg R M, Hancock V, Schembri M A y Klemm P. Comparative genomics of *Escherichia Coli* strains causing urinary tract infection. *Appl Environ Microbiol* 2011;**77**:3268-3278.
2. Moura A, Nicolau A, Hooton T y Azeredo J. Antibiotherapy and pathogenesis of uncomplicated UTI: difficult relationships. *J Appl Microbiol* 2009;**106**:1779-1791.
3. Nicole L E. Urinary Tract Infections in the Elderly. *Clin Geriatr Med* 2009;**25**:423-436.
4. Nicolle L E, Bradley S y Colgan R. Infectious Diseases Society of America Guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis* 2005;**40**:643-654.
5. Shortliffe L M, McCue J D. Urinary tract infection at the age extremes: pediatrics and geriatrics. *Am J Med* 2002;**113**:55S-66S.
6. Molina L J, Aparicio O G, Ribas A R, Gavilanes P S, Chávez B M, Hernández C R y Manjarrez H A. Drug resistance, serotypes and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico city. *J Infect Dev Ctries* 2011;**5**:840-849.
7. Garcia M L y Le Bouguénec C. Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*. *Bull. Inst. Pasteur* 1996;**94**:201- 236.
8. Arredondo G J, Amábile C C. High resistance prevalence towards ampicillin, co-trimoxazole and ciprofloxacin, among uropathogenic

Escherichia coli isolates in Mexico City. *J Infect Dev Ctries* 2008;**2**: 350-353.

9. Wiles T J, Kulesus R R y Mulvey M A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 2008; **85**:11-19.
10. Johnson J R, Stell A L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000;**181**:261-272.
11. Johnson J R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infections. *Clin Microbiol Rev* 1991;**4**:80-128.
12. Hooton T M, Pathogenesis of urinary tract infections: an update. *J Antimicrob Chemother* 2000;**46**:1-7.
13. Mulvey M, Schiling J D, y Hultgren J S. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun* 2001;**69**:4572-4579.
14. Marrs C F, Zhang L y Foxman B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiol Lett* 2005;**252**:183-190.
15. Lliyod A L, Rasko D A y Mobley H L. Defining genome islands and uropathogen-specific genes in Uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2007;**189**:3532-3546.
16. Guyer D M. Secreted proteins and other features specific to uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 2003;**183**:532-535.

17. Nicolle L E, Bradley S, Colgan R. Infectious Diseases Society of America Guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis* 2005;**40**:643-654.
18. Khan S W y Ahmed A. Uropathogens and their susceptibility pattern; a retrospective analysis. *J Pak Med Assoc* 2001;**51**:98-100.
19. Scottish Intercollegiate Guidelines Network [SIGN]. Management of suspected bacterial urinary tract infection in adults: a national clinical guideline. SIGN 2006. Disponible en: www.sign.ac.uk. Accessed May 3, 2011.
20. Jonhson J R, Kuskowski M A, Gajewski A, Soto S, Horcajada J P, y Vita J. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis or prostatitis. *J Infect Dis* 2005;**191**:46-50.
21. Bonnal C, Baune B, Mion M, Armand-Lefevre L, L'Heriteau F, Wolmark Y, Lucet J C. Bacteriuria in a Geriatric Hospital: impact of an antibiotic improvement program. *J Am Med Dir Assoc* 2008;**10**: 605-611.
22. Shortliffe L M, McCue J D. Urinary tract infection at the age extremes: Pediatrics and geriatrics. *Am J Med* 2002;**113**:55S-66S.
23. Foxman B, Brown P. Epidemiology of urinary tract infections transmission and risk factors, incidence and costs. *Infect Dis Clin North Am*. 2003;**17**:227-241.
24. Smellie J, Edwards D, Hunter N, Normand I C, Prescod N. Vesico-ureteric reflux and renal scarring, *Kidney Int Suppl* 1975;**4**, S65-72.

25. Rama G, Chhina D K, Chhina R S, y Sharma S. Urinary tract infections – microbial virulence determinants and reactive oxygen species. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2005; **28**:339-349.
26. Yamamoto S. Molecular Epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Chemother* 2007;**13**:68-73.
27. Lindberg S, Xia Y, Sondén B, Göransson M, Hacker J, y Uhlin B E. Regulatory interactions among adhesin gene systems of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2008;**76**:771-780.
28. Bower J M, Eto D S y Mulvey M A. Cover operations of Uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *NHI-Public Access*. 2008;**6**:18-31.
29. Ott M. Hoschützky H, Jann K, Van Die I y Hacker J. Gene Clusters for S fimbrial adhesion (sfa) and FIC fimbriae (foc) of *Escherichia coli*: Comparative aspects of structure and function. *J Bacteriol* 1988;**170**:3983-3990.
30. Marre R, Krept B, Hacker J. Genetically engineered S y FIC fimbriae differ in their contribution to adherence of *Escherichia coli* to cultured renal tubular cells. *Infect Immun* 1990;**58**:3434-3437.
31. Dobrindt U. S-fimbria-encoding determinant *sfa_i* is located on pathogenicity island III₅₃₆ of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* 2001;**69**:4248-4256.
32. I van Die, Krammer C, Hacker J, Bergmans H, Jongen W y Hoekstra W. Nucleotide sequence of the genes coding for minor fimbrial subunits of the FIC fimbriae of *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 1991;**142**:653-658.

33. Rendón M A, Saldaña Z, Erdem A, Nieto V, Vazquez A, Kaper J, Puente J, y Girón J. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;**104**:10637- 10642.
34. Xicohtencatl C J, Monteiro N V, Ledesma M A, Jordan D M, Francetic O, Kaper J B, Puente J L, Girón J A. Intestinal adherence associated with type IV *pili* of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Invest* 2007;**117**:3519-3529.
35. Blackburn D, Husband A, Saldaña Z, Nada R, Klena J, Qadri F, y Girón J. Distribution of the *Escherichia coli* common *pilus* among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli*. *Clin Microbiol Rev* 2009;**47**:1781-1784.
36. Baumann U, Wu S, Flaherty K, McKay D. Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif *EMBO J* 1993;**12**:3357–3364.
37. Cortajarena AL, Goñi FM, Ostolaza H. Glycophorin as a receptor for *Escherichia coli* alpha-hemolysin in erythrocytes. *J Biol Chem* 2001;**276**:12513-12519.
38. Bhakdi S, Mackman N, Nicaud JM, Holland IB. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect Immun* 1986;**52**:63–69.
39. Miethke M, Marahiel M. A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007;**71**: 413–451.

40. García E C, Brumbaugh A R y Mobley L T H. Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infect Immun* 2011;**79**:1225–1235 40.
41. Henderson J P, Crowley J R, Pinkner J S, Walker J N, Tsukayama P, Stamm W E, Hooton T M, Hultgren S J. Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for Iron acquisition in Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* 2009;**5**:1-11 41.
42. Clermont O, Bonacorsi S, y Binguen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000;**66**:4555-4558.
43. Cortes M A, Gibon J, Chanteloup N K, Moulin-Schouleur M, Gilot P, Germon P. Inactivation of *ibeA* and *ibeT* results in decreased expression of type 1 fimbriae in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908. *Infect Immun*. 2008;**76**:4129-36.
44. Wang S, Niu C, Shi Z, Xia Y, Yaqoob M, Dai J y Lu C. Effects of *ibeA* Deletion on Virulence and Biofilm Formation of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2011;**79**: 279–287.
45. Panorama epidemiológico de las infecciones de vías urinarias en México 2003-2008. (Primera parte). Fecha de consulta junio 2010. www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2009/sem51/pdf/edit5109.pdf
46. Panorama epidemiológico de las infecciones de vías urinarias en México 2003-2008. (Segunda y ultima parte) Fecha de consulta junio 2010. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2009/sem52/pdf/edit5209.pdf>

47. Gupta K, Hooton T M y Stamm W E. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community acquired urinary tract infections. *Ann Intern Med* 2001;**135**:41-50.
48. Gouillet P, Picard B. Electrophoretic type B2 of carboxylesterase B for characterization of highly pathogenic *Escherichia coli* strains from extraintestinal infections. *J Med Microbiol* 1990; **33**:11–16.
49. Croxall G, Hale J, Weston V, Manning G, Cheetham P, Achtman M, MacNally A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from a regional cohort of elderly patients highlights the prevalence of ST131 strains with increased antimicrobial resistance in both community and hospital care settings. *J Antimicrob Chemother* 2011;**66**: 2501–2508.
50. Bingen E, Picard B, Brahimi NI. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J Infect Dis* 1998;**177**:642–650.
51. Cavalieri S J, Bohach G A, Snyder I S. *Escherichia coli* α -hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol Rev* 1984;**48**:326-343.
52. Huang S, Wass C, Fu Q, Prasadaraao N, Stins M, Kim K. *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo: molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*. *Infect Immun* 1995; **63**:4470–4475.
53. Sahuquillo-Arce J M, Selva M, Perpiñán H, Gobernado M, Armero C, López-Quílez A, González F, Vanaclocha H. Antimicrobial resistance in

more than 100,000 *Escherichia coli* isolates according to culture site and patient age, gender, and location. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;**55**: 1222–1228.

54. Drews S J, Poutanen S M, Mazzulli T, McGeer A J, Sarabia A, Pong-Porter S, Rzaev Y, Willey B, Green K, Low D E. Decreased prevalence of virulence factors among ciprofloxacin-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* 2005;**43**:4218–4220.
55. Kamura S, Yoshida R, Shibayama K, Ohta M. Virulence genes, quinolone and fluoroquinolone resistance, and phylogenetic background of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in Japan. *J Infect Dis* 2010;**63**:113-115.
56. Díaz M, Hernández J, Rodríguez J, Martínez L, Clavo J, Blanco J, Pascual A. Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases in Spain: second nationwide study. *J Clin Microbiol* 2010;**48**: 2840-2845.
57. Giner Almaraz, S.; Canos Cabedo, M.; Ferrer Gomez, C. Meropenem: un nuevo carbapenem en el arsenal terapéutico *Farm hosp* 1995;**19**:109-113.