



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**FILOTIPIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE
BETALACTAMASAS EN CEPAS DE
Escherichia coli AISLADAS DEL TRACTO
URINARIO.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LIC. EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

BAUTISTA CERÓN ARELI

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Eric Monroy Pérez

Proyecto financiado por la UNAM DGAPA, PAPIIT

IN218614



Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A mis padres:

Por su infinito amor, apoyo y paciencia, sin ustedes esto no sería posible. Gracias.
Los amo y admiro.

A Víctor Hugo:

Por esta etapa que comenzamos y terminaremos juntos. Tu amor, apoyo, incomparable compañía y tus palabras siempre precisas han sido y serán siempre *el sol protector* de mi vida. Te lo agradezco. Te amo.

A Alejandra y Karen:

Por esta amistad que trasciende a los años, por todo lo que hemos pasado juntas, gracias por ser parte de mi vida. Las quiero.

Agradecimientos

Al Dr. Eric Monroy Pérez por la dirección, interés, crítica y motivación necesarias para consolidar esta tesis.

A la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras por su imprescindible apoyo y sugerencias durante la realización de este trabajo.

También agradezco al comité revisor de este trabajo:

Dr. Sergio Vaca Pacheco

Biol. Alina Uribe García

Biol. Susana González Almazán

Su ayuda brindada, conocimientos y asesoría fueron de gran importancia para la realización de esta tesis.

A Ramiro y Mariana por su colaboración en la detección de las betalactamasas grupos I y V.

Para la realización de la presente tesis de investigación se contó con el apoyo económico de la **DGAPA**:

Universidad Nacional Autónoma de México, Dirección General de Asuntos del Personal Académico en su Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN218614.

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1 Características de <i>Escherichia coli</i>	6
2.2 Grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	7
2.3 Factores de virulencia	9
2.4 Patología de <i>E. coli</i>	11
2.5 Infecciones del tracto urinario.	12
2.7 Resistencia a los antibióticos	13
2.8 Producción de Betalactamasas de Espectro Extendido	14
3. ANTECEDENTES	17
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. OBJETIVOS	20
5.1 General	20
5.2 Particulares.....	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1 Origen de las cepas	21
6.2 Extracción del DNA bacteriano	21
6.3 Detección de <i>E. coli</i> por PCR convencional.....	21
6.4 Determinación de los grupos filogenéticos de <i>E.coli</i> por PCR cuádruplex... 22	
6.5 Detección de genes que codifican resistencia a los betalactámicos por PCR multiplex.....	24
6.6 Electroforesis en geles de agarosa	27
6.7 Análisis estadístico.....	27
7. RESULTADOS	28
7.1 Pacientes analizados	28
7.2 Edad de los pacientes.....	28
7.3 Diagnóstico de los pacientes analizados	29
7.4 Detección de <i>E. coli</i>	30
7.5 Asignación de grupos filogenéticos a <i>E. coli</i> por PCR cuádruplex.....	30
7.6 Detección de genes que codifican betalactamasas por PCR multiplex en <i>E. coli</i>	32
7.7 Asociación de los grupos filogenéticos y los genes BLEE en <i>E. coli</i>	36
7.7.1 Análisis estadístico.....	37
8. DISCUSIÓN	39
8.1 Pacientes estudiados	39
8.2 Identificación de <i>E. coli</i> en las infecciones urinarias de los pacientes.....	39
8.3 Grupos filogenéticos en <i>E. coli</i>	40
8.4 Detección de BLEE en las cepas de <i>E. coli</i>	42
8.5 Asociación de los grupos filogenéticos y los genes BLEE en <i>E. coli</i>	45
9. CONCLUSIONES	46
10. LITERATURA CITADA	47

1. RESUMEN

Escherichia coli uropatógena (UPEC) es responsable de la mayoría de las infecciones de vías urinarias entre la población mexicana. La selección de cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos en los últimos años ha dificultado el tratamiento médico. La producción de betalactamasas por las cepas UPEC es el principal mecanismo de resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos. El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de genes que codifican resistencia a antibióticos betalactámicos entre los diferentes grupos filogenéticos de cepas UPEC. Se analizaron 194 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones de vías urinarias atendidos en dos hospitales del Estado de México y en la clínica de la FES Iztacala. Las cepas de *E. coli* fueron identificadas por pruebas bioquímicas y por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) mediante el gen *rRNA*. Los genes que codifican para betalactamasas y los grupos filogenéticos en las cepas UPEC se detectaron por PCR multiplex. El grupo filogenético más frecuente en las cepas de *E. coli* fue B2 con el 51.5% (n=100), seguido por el filogrupo A con el 13.4% (n=26) y los grupos B1 y D con el 9.8% (n=19), en cada caso, F con 1.5% (n=3) y *Escherichia* clade con 0.5% (n=1). El filogrupo E no fue identificado. Los genes que codifican para betalactamasas detectados con mayor frecuencia fueron *bla*_{TEM} y *bla*_{OXA-like} con el 26.3% (n=51), en cada caso, seguidos por *bla*_{CIT} con 24.7% (n= 48), *bla*_{CTX-M grupo 1} con 22.7% (n=44), *bla*_{SHV} con 14.9% (n= 29), *bla*_{OXA-48-like} con 8.8% (n=17), *bla*_{CTX-M grupo 9} con 3% (n=6) y *bla*_{ACC} con 0.5% (n=1). Los genes *bla*_{CTX-M grupo 2}, *bla*_{CTX-M grupo 8/25}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX}, *bla*_{DHA}, *bla*_{EBC}, *bla*_{GES}, *bla*_{VEB}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{KPC} no fueron detectados en las cepas de *E. coli* analizadas. La elevada variabilidad filogenética y la amplia distribución de genes que codifican para betalactamasas entre las cepas de *E. coli* analizadas representa un grave problema médico para la erradicación de las infecciones de vías urinarias, lo que podría incrementar la cronicidad de los episodios y el desarrollo de infecciones más agudas, como cistitis y/o pielonefritis.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Características de *Escherichia coli*

La familia *Enterobacteriaceae* incluye al género *Escherichia*, que está integrado por distintas especies, como *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusinni*, *E. hermanni* y *E. vulneris*. *E. coli* es la especie de mayor importancia clínica, porque además de formar parte de la microbiota intestinal del hombre y otros mamíferos, también se encuentra entre los principales agentes etiológicos causantes del síndrome diarreico y de otros padecimientos extraintestinales (Greenwood *et al*, 2007).

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo cuyo tamaño oscila entre 2-3 µm de largo por 0.3 µm de diámetro, es anaerobio facultativo y no formador de esporas. Su superficie celular está provista de flagelos, pilis o fimbrias y proteínas de membrana externa, que son importantes en investigaciones epidemiológicas. El lipopolisacárido (LPS) posee actividad de endotoxina, además muchas cepas de *E. coli* están cubiertas por una cápsula de polisacárido antifagocítica (Prats, 2012).

E.coli se diferencia bioquímicamente de otras cepas entéricas por la producción de indol y la habilidad de fermentar lactosa, además es catalasa positiva y oxidasa negativo. Típicamente, es rojo metilo positiva, Voges- Proskauer negativa y no crece en el medio citrato de Simmons. *E.coli* se desarrolla en el medio McConkey como colonias de color rosa, en el medio eosina-azul de metileno normalmente produce brillo metálico y en el agar sangre hemolisis (Jawetz *et al*, 2004).

E. coli tiene la habilidad de colonizar y persistir en gran variedad de nichos en el ambiente. La flora intestinal de mamíferos comúnmente establece una relación simbiótica benéfica con esta especie y otros microorganismos, esta asociación provee al hospedero de nutrientes, señales para el desarrollo y la regulación inmune, además de protección a patógenos extraños (Wiles *et al.*, 2008).

2.2 Grupos filogenéticos de *E. coli*

El estudio cuantitativo de la diversidad de *E. coli* inició con la medición de la movilidad electroforética de enzimas provenientes de distintas cepas de *E. coli* (Milkman, 1973). La técnica de electroforesis enzimática multilocus (MLEE) se convirtió en la más común para el estudio de la diversidad bacteriana, estos resultados constituyeron una colección de referencia con cepas llamadas ECOR (*E. coli* reference) que fueron seleccionadas por representar la gran diversidad de especies (Ochman y Selander, 1984). El fenograma basado en dichos resultados identificó 4 grandes grupos (A, B1, B2 y D) y dos grupos complementarios (C y E) (Chaudhuri y Henderson, 2012).

En el 2000, Clermont y colaboradores presentaron un análisis filogenético simple basado en el reconocimiento de tres marcadores genéticos por PCR; dos genes *ChuA*, que codifica para receptor de membrana externa de hemina (presente en grupos B2 y D, ausente en B1 y A); *yjaA* (presente en B2, ausente en D) y el fragmento TSPE4 recientemente identificado como parte del gen putativo lipasa esterasa (presente en el grupo B1, ausente en A) (Tenailon *et al.*, 2010).

Desde el 2000, la técnica de tipificación de secuencias multilocus (MLST) ha mejorado el entendimiento de la subestructura genética de *E. coli*. El filogrupo E, está formado por un grupo de cepas no asignadas en la cual O157:H7 es la mejor estudiada; los filogrupos E y F constituyen subgrupos hermanos del grupo B2 y el filogrupo C está cercanamente relacionado al grupo B1 (Dureja *et al.*, 2014; Gordon *et al.*, 2008). Además se reportaron algunas nuevas especies de *Escherichia* que son genéticamente distintas pero fenotípicamente indistinguibles de *E. coli*. Se considera que *Escherichia* clade I puede considerarse un filogrupo de *E. coli*, por la recombinación detectada entre estas dos cepas (Clermont, 2013).

En 2013 Clermont y colaboradores presentaron una modificación al método tradicional y actualmente se reconocen 8 grupos filogenéticos, 7 pertenecen a *E. coli* en sentido estricto (A, B1, B2, C, D, E, F) y el octavo es la especie críptica de

Escherichia clade I. Demostraron que alrededor del 95% de las cepas de *E. coli* pueden ser asignadas a un filogrupo con la técnica de PCR cuádruplex y que el 13% de las cepas pertenecen a los nuevos filogrupos descritos C, E, F y clado I.

Las diferencias entre las características fenotípicas de los filogrupos son variadas, incluyendo su habilidad para aprovechar carbohidratos, los perfiles de resistencia a antibióticos y la relación entre temperatura y tasa de crecimiento (Gordon *et al.*, 2008).

La composición y estructura genética de *E. coli* son altamente dependientes de las condiciones climáticas y factores asociados al hospedero, por lo tanto se han encontrado grandes variaciones en la prevalencia de los filogrupos de *E. coli* en las poblaciones humanas. De acuerdo a esto, se dividen en dos categorías: cepas comensales aisladas de Europa (Francia y Croacia), África (Mali y Benín), Asia (Pakistán) y Sudamérica (Guyana francesa, Colombia y Bolivia, pertenecen principalmente al grupo A (55%) y B1 (21%) y los grupos D (14%) y B2 (10%) son menos frecuentes. A la inversa, cepas aisladas de Europa (Francia y Suecia), Norteamérica (Estados Unidos), Japón y Australia pertenecen principalmente al grupo B2 (43%), seguido de los grupos A (24%), D (21%) y B1 (12%) (Tenailon *et al.*, 2010).

Debido a que la estructura de la población es predominantemente clonal, los antecedentes filogenéticos están relacionados con las diferencias entre *E. coli* patógena y comensal. Las cepas ExPEC pertenecen principalmente al grupo B2 y en menor proporción al D, estas cepas poseen un gran número de factores de virulencia que promueven funciones patogénicas, en contraste con los filogrupos A y B1 que corresponden a las cepas comensales (Moreno *et al.*, 2006; Tenailon *et al.*, 2010).

2.3 Factores de virulencia

UPEC posee gran variedad de factores de virulencia específicos que le permiten adherirse a las células uroepiteliales y colonizar el tracto urinario, incluyendo adhesinas, toxinas, proteínas de autotransporte, sistemas de adquisición de hierro y otros productos bacterianos (tabla 1). (Ulett, *et al*, 2013; Oelschlaeger, *et al*, 2002).

Estos genes de virulencia se localizan frecuentemente en regiones específicas del genoma de UPEC llamados “islas de patogenicidad” (PAI's), que pueden encontrarse en plásmidos o integrados en el cromosoma (Oelschlaeger, *et al*, 2002). Generalmente se encuentran rodeados por elementos genéticos móviles (bacteriófagos, secuencias de inserción o transposones) y a menudo se insertan cerca de genes de RNAt (Croxen *et al.*, 2010).

La entrada de UPEC al tracto urinario es seguida por la unión a las células uroepiteliales, donde la producción de adhesinas evita la eliminación de las bacterias durante la micción, y la producción de hemolisinas provoca la liberación de citocinas y la estimulación de la respuesta inflamatoria (Murray *et al.*, 2013; Wiles *et al.*, 2008).

Localización	Factor de virulencia	Función
Superficie bacteriana	<i>Fim</i> (type 1 fimbriae)	Adhesión a la mucosa del epitelio y la matriz del tejido, invasión, formación del biofilm.
	<i>Pap</i> (P fimbriae)	Adhesión a la mucosa del epitelio y la matriz del tejido, inducción de citoquinas.
	<i>Sfa</i> (S fimbriae) <i>F1C</i> fimbriae	Adhesión a la mucosa y células endoteliales.
	<i>Flagellum</i>	Motilidad, adaptación.
	<i>KpsMT</i> (group II capsule)	Antifagocítico, efecto anticomplementario, evasión del reconocimiento inmune.
	Lipopolisacárido	Efecto endotóxico, antígeno O.
	<i>ompT</i> (outer membrane proteins)	Receptor y funciones de transporte.
	Exportadas	<i>Hly</i> (α haemolysin)
<i>Cnf1</i> (Cytotoxic necrotising factor)		Interferencia con fagocitosis y apoptosis.
<i>Sat</i> (secreted autotransporter toxin)		Citotoxicidad.
<i>CDT</i> (cytolethal distending toxin)		
<i>CvaA</i> (cytolysin A)		
<i>Ent</i> (enterobactin) <i>iucD</i> (aerobactin) <i>iroN</i>		Sistemas de adquisición de hierro.

Tabla 1. Factores de virulencia en cepas de *E. coli* involucrados en las infecciones de vías urinarias (Adaptado de Emödy *et al.*, 2003).

2.4 Patología de *E. coli*

Existen diversas clonas de *E.coli* altamente adaptadas con combinaciones de factores de virulencia específicos, que incrementan su habilidad de colonizar nuevos nichos y les permiten causar enfermedades. La plasticidad del genoma de los patotipos de *E.coli* es resultado de la acción de tres mecanismos: la adquisición de genes por transferencia horizontal (HGT); la duplicación del gen seguida de amplificación y desintegración del genoma, que puede ocurrir durante la HGT; y la reducción del genoma por delección del DNA, rearrreglos y mutaciones puntuales (Ahmed, *et al*, 2008).

Los patotipos de *E. coli* poseen un esquema múltiple de patogénesis que consiste en colonización de un sitio de la mucosa, evasión de la respuesta inmune, multiplicación y daño al hospedero. Los ocho tipos de la enfermedad y sus mecanismos son clasificados como *E. coli* diarrogénica o extraintestinal (ExPEC) (Prats, 2012; Kaper *et al.*, 2004).

Los principales cuadros clínicos de las infecciones entéricas son la diarrea del viajero ocasionada por *E.coli* enterotoxigénica (ETEC); la diarrea acuosa que afecta principalmente a neonatos provocada por *E.coli* enteropatógena (EPEC); la diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica y el síndrome hemolítico urémico producidos por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), la diarrea aguda y crónica originada por *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) que se manifiesta con un cuadro similar a la disentería amibiana (Puerta, *et al*, 2010).

Las cepas de ExPEC permanecen en el intestino sin causar problemas, sin embargo tienen la capacidad de diseminarse y colonizar otros sitios en el hospedero incluyendo sangre, sistema nervioso central y tracto urinario ocasionando enfermedad (Foxman *et al.*, 2002). Dentro de este grupo se encuentran *E. coli* uropatógena (UPEC) que es la causa más frecuente de infecciones en el tracto urinario (ITUs) en el mundo y *E. coli* asociada a meningitis y sepsis neonatal (NMEC) que es el Gram negativo más habitual en dicho padecimiento (Croxen *et al.*, 2010).

2.5 Infecciones del tracto urinario.

Las infecciones en el tracto urinario se definen como la presencia significativa de organismos patógenos en la orina, es decir el recuento de colonias igual o superior a 100000 UFC/ml en orina recién emitida (Neild, 2003). La mayoría de los Gramnegativos productores de ITU se originan en el colon, contaminan la uretra, siguen una ruta ascendente hasta la vejiga, y pueden migrar hasta los riñones o la próstata. (Murray *et al.*, 2013).

Las ITUs se clasifican de acuerdo al sitio de infección y la severidad de la enfermedad. Las infecciones de la vejiga urinaria, denominadas cistitis se caracterizan por inflamación en las vías urinarias bajas y presentan síntomas como micción dolorosa y frecuente con sensación continua de necesidad de orinar. La pielonefritis es la infección que afecta uréteres y los riñones, se manifiesta con fiebre, escalofríos, dolor lumbar y afectación del estado general (Prats,2012; Spurbeck y Mobley, 2013).Las UPEC son el agente responsable de más del 90% de las infecciones del tracto urinario y la principal causa de infecciones hospitalarias y adquiridas en la comunidad (Olson, 2015).

La incidencia de la enfermedad es diferente en ambos sexos, ya que las ITU afectan principalmente a mujeres sanas; por lo menos 20% de las mujeres presenta un episodio de ITU antes de cumplir los 30 años y más del 50% tiene por lo menos una ITU en toda su vida. Una de cada 10 mujeres padece infecciones recurrentes frecuentes en algún periodo. Las ITUs afectan una proporción importante de la población con anomalías estructurales o funcionales de las vías genitourinarias (Engleberg *et al.*, 2012).

2.7 Resistencia a los antibióticos

Los antibióticos de uso común para el tratamiento de las enfermedades del tracto urinario son trimetoprim/sulfametoxazol (STX), cefalosporinas, penicilinas semisintéticas con o sin inhibidores de betalactamasas y quinolonas. La selección del antibiótico depende de la condición de salud del paciente y del tipo de bacteria involucrada. Sin embargo la resistencia a antibióticos es el mayor problema en el tratamiento de ITUs (Alabsi *et al.*, 2014).

En los últimos años el tratamiento de las infecciones ocasionadas por cepas UPEC se ha complicado debido a la selección de cepas resistentes o multirresistentes a los antibióticos. El mecanismo más común de actividad antibiótica es la interferencia en la síntesis de la pared bacteriana. La mayoría de los antibióticos activos sobre la pared se agrupan en antibióticos betalactámicos, denominados así porque comparten la estructura del anillo betalactámico (Prats, 2012).

Las bacterias pueden adquirir resistencia a betalactámicos por tres mecanismos principales; impedir la unión del antibiótico y la PBP (Penicilin Binding Protein), modificación del sitio de unión a las PBP y por hidrólisis del antibiótico por enzimas betalactamasas (Rupp *et al.*, 2003).

La entrada de los betalactámicos a los bacilos gramnegativos requiere el paso a través de las porinas. Los cambios en estas proteínas pueden alterar la carga de los canales y excluir el antibiótico. Por otro lado, la resistencia por modificación de las PBP puede estar mediada por hiperproducción de PBP, adquisición de nuevas PBP o modificación de las PBP ya existentes por recombinación. Sin embargo el mecanismo más común de resistencia es la producción de betalactamasas (Murray *et al.*, 2013).

2.8 Producción de Betalactamasas de Espectro Extendido

Las betalactamasas son un grupo de enzimas que hidrolizan el anillo de C y N de los betalactámicos, eliminando así su capacidad de inhibir la formación de la pared microbiana. Diversos géneros de bacterias Gram negativas poseen de manera natural betalactamasas mediadas cromosomalmente, sin embargo, estas enzimas han evolucionado de las proteínas de unión a penicilina (PBP) (Bradford, 2001).

La clasificación de las betalactamasas tradicionalmente se fundamenta en las características funcionales de las enzimas o en su estructura primaria. La clasificación más simple se realiza con la secuencia proteínica, agrupando estas enzimas en cuatro clases moleculares A, B, C, D. En el esquema de Bush las enzimas se agrupan por su habilidad para hidrolizar clases específicas de antibióticos betalactámicos y en la inactivación de las propiedades de la enzima por los inhibidores ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Bush *et al.*, 2010). En la tabla 2 se resumen los esquemas de clasificación de las betalactamasas.

La primera betalactamasa mediada por plásmido en Gram negativos se describió en 1960. La enzima TEM-1 se encontró en una cepa de *E. coli* aislada de un cultivo sanguíneo proveniente de un paciente llamado Temoniera, de ahí la designación TEM (Bradford, 2001), otra enzima frecuentemente detectada en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* es SHV-1 (contracción de sulphydril variable; Brisse *et al.*, 2012).

El espectro de acción de TEM-1 y SHV-1 es principalmente a cefalosporinas y ampicilinas; sin embargo, mutaciones puntuales en estos dos tipos de enzimas, han originado betalactamasas con actividad frente a todos los betalactámicos excepto carbapenémicos y cefamicinas; es por ello que se han denominado Betalactamasas de Amplio Espectro (BLEEs) (Duttaroy y Mehta, 2004).

En la década de los 90, las BLEE dominantes eran del tipo TEM y SHV; posteriormente en Europa y otras partes del mundo, la familia CTX-M se posicionó como el tipo predominante en *Enterobacteriaceae*, el genotipo más diseminado es

el CTX-M-15 (Al-Agamy *et al.*, 2014). El dominio de las betalactamasas de la familia CTX-M en cepas clínicas de *Escherichia coli*, representan un problema para el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Bonnet, 2004).

El grupo de betalactamasas de clase molecular C (grupo 1 de la clasificación de Bush) tipo AmpC están codificadas por genes *bla*_{AMPc} asociados a transposones localizados en plásmidos conjugativos. Estos genes *bla*_{AMPc} plasmídicos se derivan del cromosoma bacteriano y se agrupan debido a la homología de sus genes en 6 familias; CIT, DHA, ACC, FOX, MOX y EBC.

Las carbapenemasas son betalactamasas capaces de hidrolizar los carbapenémicos y se agrupan en diversas clases moleculares. El grupo de mayor importancia es el de las metalo- betalactamasas de la clase B, cuyas principales enzimas son IMP y VIM. Dentro de las carbapenemasas de clase A, las de mayor importancia epidemiológica son las de tipo KPC. Estas carbapenemasas son de origen plasmídico asociado a transposon. En la clase D de Ambler se encuentran enzimas OXA capaces de hidrolizar carpenémicos, el principal representante es OXA-48 (Navarro *et al.*, 2011).

Grupo de Bush, Jacoby y Medeiros	Clase molecular	Preferencia al sustrato	Perfil de inhibición		Enzimas representativas
			Ácido clavulánico	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	-	-	Amp C; MIR-1
2 ^a	A	Penicilinas	+	-	Penicilinasas de bacterias Grampositivas
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas, cefalosporinas de corto y amplio espectro, monobactámicos	+	-	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6, K1
2br	A	Penicilinas	±	-	TEM-30 a TEM-36, TRC-1
2c	A	Penicilinas, carbenicilina	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penicilinas, cloxacilina	±	-	OXA-1 a OXA -11, PSE-2 (OXA-10)
2e	A	Cefalosporinas	+	-	- Cefalosporinasas inducibles de <i>Proteus vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas, cefalosporinas carbapenémicos	+	-	NMC-A de <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 de <i>Serratia marcescens</i>
3	B	Mayor parte de betalactámicos incluyendo carbapenémicos	-	+	L1 de <i>Xanthomonas maltophilia</i> , CcrA de <i>Bacteroides fragilis</i>
4	Indeterminada	Penicilinas	-	¿?	Penicilinasas de <i>Pseudomonas cepacia</i>

Tabla 2. Esquema de clasificación de betalactamasas bacterianas. (Tomado y modificado de Bush *et al.*, 2010).

3. ANTECEDENTES

Al-Agamy y colaboradores (2014) investigaron la prevalencia de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en 152 cepas de *Escherichia coli* provenientes de distintos aislados clínicos en Arabia Saudita. De las 119 cepas aisladas de orina 24 (20.16%) fueron positivas en el test de susceptibilidad antimicrobiana con disco de difusión y todas positivas en la detección fenotípica de BLEE. La detección de genes por PCR reveló que el 100% de las cepas portaba los genes CTX-M-15 y TEM-1.

Barguigua, *et al* (2013) caracterizaron las BLEE producidas por cepas de *E. coli* provenientes de infecciones del tracto urinario en la comunidad marroquí. Se detectó la presencia de BLEE en 49 cepas; la mayor prevalencia correspondió a *bla*_{CTX-M} (77.5%) seguida por *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} y *bla*_{OXA-1}. Se detectaron los genes que codifican para betalactamasas mediadas por AmpC: *bla*_{ACT-5}, *bla*_{DHA-1} y *bla*_{CMY} y las carbapenemasas OXA-48 e IMP. El análisis filogenético mediante PCR reveló prevalencia del grupo A (48.8%), seguido por B2 (30.6%), D (22.4%) y B1 (2%).

Branger y colaboradores (2005) realizaron el análisis filogenético de 129 cepas de *E.coli* procedentes de distintos aislados clínicos en Francia, respecto a la producción de BLEE y factores de virulencia. Con el análisis filogenético por PCR, detectaron la prevalencia de los grupos B2 (36.4%) y D (25.5%), y en menor proporción los grupos A (27.9%) y B1 (10%). Reportaron que la presencia de BLEE está asociada a los filogrupos patógenos; las betalactamasas tipo TEM y SHV son acarreadas con mayor frecuencia por el grupo B2 y el tipo CTX-M por el grupo D.

Dureja, *et al* (2014) reportaron la distribución genética y la prevalencia de genes que codifican BLEE: *bla*_{VEB-1}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} en cepas de *E.coli* aisladas de pacientes sanos en India. Observaron distribución heterogénea entre los 7 grupos filogenéticos con predominancia del grupo A. Encontraron que casi el 100% de las cepas detectadas fenotípicamente como productoras de BLEE

portaban el gen CTX-M-15 y se detectó *bla*_{TEM} en el 50%; el resto de los genes no fueron detectados.

Kanamaru y colaboradores (2006) detectaron la prevalencia de PA_{usp}, factores de virulencia y serogrupos en los grupos filogenéticos de 377 cepas de *E.coli* aislada de infecciones de vías urinarias no complicadas en Japón. Encontraron mayor prevalencia del grupo B2 (83.8%), sin embargo no existe diferencia entre la presencia de los filogrupos y la fuente de enfermedad (cistitis, pielonefritis y prostatitis).

Millán y colaboradores (2014) determinaron el perfil de distribución de los grupos filogenéticos en 28 cepas productoras de CTX-M aisladas de pacientes con ITU en Venezuela. Los filogrupos A (53.57%) y B2 (42.85) mostraron amplia distribución. No se observó relación entre la recurrencia o la gravedad de la ITU y la distribución de los filogrupos.

Molina, *et al* (2011) reportaron en un estudio de *Escherichia coli* uropatógena la resistencia a antibióticos, serotipos y grupos filogenéticos de 119 cepas de México. El análisis mediante PCR para determinar los grupos filogenéticos mostró cepas pertenecientes a los grupos B2 (36%), A (28.7%), D (27.8%) y B1 (8.4). El grupo filogenético B2 represento el 52.7% de las cepas multiresistentes.

Sana, *et al* (2011) realizaron un estudio de detección de genes BLEE y pruebas de susceptibilidad a antibióticos con disco de difusión en cepas de *Escherichia coli* de diferentes aislados clínicos en Líbano. De las 73 cepas, 58 fueron aisladas de orina y el 100% portaba dos o más genes BLEE. Mediante PCR detectaron los genes CTXM (72 cepas), OXA (33 cepas), TEM (16 cepas) y SHV (3 cepas).

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en los últimos años en nuestro país ha ocurrido un incremento de la resistencia a los antibióticos en cepas de *Escherichia coli* uropatógenas (UPEC), aunado a que no se han caracterizado molecularmente los diferentes filogrupos, el presente estudio contribuirá en determinar la frecuencia de los diferentes grupos de genes que codifican para betalactamasas de espectro extendido y su relación con los diferentes grupos filogenéticos en cepas de *E.coli* uropatógenas.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Filotipificación y caracterización genética de betalactamasas en cepas de *E. coli* aisladas de infecciones de vías urinarias.

5.2 Particulares

- Determinar por PCR los grupos filogenéticos A, B1, B2, C, D, E y F en las cepas de *Escherichia coli*.
- Detectar mediante PCR multiplex los genotipos que codifican para betalactamasas de espectro extendido OXA-1-like; betalactamasas de espectro extendido; betalactamasas mediadas por el plásmido AmpC y carbapenemasas de las clases A, B y D.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Origen de las cepas

Para el desarrollo de este estudio se analizaron 194 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario de la Unidad Médico Familiar (UMF) No. 64, de la Clínica No.72 del IMSS y del laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, ubicados en Tlalnepantla de Baz, Estado de México.

6.2 Extracción del DNA bacteriano

Las cepas de *E. coli* fueron sembradas en el medio Müller Hinton e incubadas a 37°C durante 24 h. Al obtener un crecimiento bacteriano óptimo, se realizó la extracción del DNA por el método de ebullición, para lo cual se tomaron varias colonias con un asa estéril y se depositaron en tubos de rosca de 16 X 50 con 2 ml de solución salina estéril. Las muestras se colocaron en un vortex por 20 segundos y al término los tubos se mantuvieron en baño maría durante 25 minutos. Posteriormente, la muestra se colocó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos. Se almacenó el sobrenadante con el DNA bacteriano en tubos Eppendorf a -20°C, hasta su posterior utilización.

6.3 Detección de *E. coli* por PCR convencional

Las cepas de *E. coli* se identificaron por PCR convencional mediante la amplificación del gen 16 *rRNA*, los oligonucleótidos fueron: *wl-3110* (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y *wl-3111* (CCGTCAATTCATTTGAGTT). Se utilizaron las perlas PuRetaq Ready-To-Go™ PCR (GE Healthcare) que contenían 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 nmol de dNTPs, para un volumen final de 25 µl por cada mezcla de reacción: 1 µl de cada oligonucleótido (10 pmol) (Integrated DNA Technologies), 20 µl de agua estéril libre de nucleasas y 3 µl de DNA. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 1 minuto). Finalmente la extensión se prolongó por 5 minutos a 72 °C. El tamaño del amplicón fue de 919 pb (pares de bases).

6.4 Determinación de los grupos filogenéticos de *E.coli* por PCR cuádruplex

La asignación de grupos filogenéticos, se realizó con la técnica de PCR cuádruplex descrita por Clermont y colaboradores en 2013. Primero se llevó a cabo el PCR cuádruplex que se basó en la presencia/ausencia de cuatro genes en cada cepa (*arpA*, *chuA*, *jyaA* y *TSpE4.C2*), dependiendo del genotipo obtenido se asignó un filogrupo de manera inmediata o se realizó un análisis adicional (tabla 3).

Se utilizaron las perlas PuRetaq Ready-To-Go™ PCR (GE Healthcare) que contenían 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 nmol de dNTPs, para un volumen final de 20 µl por cada mezcla de reacción: 1 µl (10 pmol) de los oligonucleótidos correspondientes (Integrated DNA Technologies; tabla 4), 3 µl de DNA y el volumen necesario de agua estéril libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación consistieron en: desnaturalización inicial de 4 min a 94°C, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 5 segundos, alineación a 57 °C para el grupo E ó 59 °C para el cuádruplex y grupo C) y la extensión final a 72°C por 5 minutos).

<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE4.C2</i>	Grupo filogenético	Paso siguiente
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	Puede ser confirmado con el gen <i>ibeA</i> .
+	-	+	-	A o C	Usar primers específicos. Si obtiene C+ es C, sino A.
+	+	-	-	D o E	Usar primers específicos. Si obtiene E+ es E, sino D
+	+	-	+	D o E	Usar primers específicos. Si obtiene E+ es E, sino D
+	+	+	-	E o clado I	Usar primers específicos. Si obtiene E- es clado I.
-	-	+	-	Clado I o II	Confirmar usando primers específicos
-	476	-	-	Clado III,IV o V	Confirmar usando primers específicos
-	-	-	+	Desconocido	MLST
-	-	+	+	Desconocido	MLST
+	-	+	+	Desconocido	MLST
+	+	+	+	Desconocido	MLST
-	-	-	-	Desconocido	Confirmar la identificación de <i>Escherichia</i> con el gen <i>uidA</i> o <i>gadA/B</i> , si es positivo usar primer específico para clados crípticos y/o MLST.

Tabla 3. Genotipos y pasos requeridos para asignar un grupo filogenético a las cepas de *Escherichia coli*.

PCR	gen	oligonucleótido	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
Cuádruplex	<i>chuA</i>	chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288
		chuA.2b	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
	<i>yjaA</i>	yjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTTCAGGAG	211
		yjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG	
<i>TspE4.C2</i>	TspE4C2.1b	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152	
	TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCCG		
Grupo E	<i>arpA</i>	AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400
		ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA	
Grupo E	<i>arpA</i>	ArpAgpE.f ArpAgpE.r	GATTCCATCTTGTCAAATATGCC GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	301
Grupo C	<i>trpA</i>	trpAgpC.1 trpAgpC.2	AGTTTTATGCCAGTGCGAG TCTGCGCCGGTCACGCC	219
Control interno	<i>trpA</i>	trpBA.f trpBA.r	CGGCGATAAAGACATCTTCAC GCAACGCGGCCTGGCGGAAG	489

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la asignación de grupos filogenéticos de *Escherichia coli*.

6.5 Detección de genes que codifican resistencia a los betalactámicos por PCR multiplex

La detección del genotipo para betalactamasas se llevó a cabo con la técnica de PCR descrita por Dallenne y colaboradores en 2010, que consistió en una serie de 6 PCR multiplex y 1 PCR convencional. Se utilizaron las perlas PuRetaq Ready-To-Go™ PCR (GE Healthcare) que contenían 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 nmol de dNTPs, para un volumen final de 20 µl (excepto para el multiplex III con 25 µl) por cada mezcla de reacción: 1 µl (10 pmol) de cada oligonucleótido (Integrated DNA Technologies; tabla 5), 3 µl de DNA y volumen variable de agua estéril libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación consistieron en: desnaturalización inicial de 10 min a 94°C, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 40 segundos, alineación a 60 °C por 40 segundos y 72°C por 1 minuto) y la extensión final a 72°C por 7 minutos.

	Gen	oligonucleótido	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
Multiplex I TEM,SHV y OXA-1- like	Variantes TEM incluyendo TEM-1 y TEM-2	MultiTSO-T_for MultiTSO-T_rev	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	800
	Variantes SHV incluyendo SHV-1	MultiTSO-S_for MultiTSO-S_rev	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC ATCCCGCAGATAAATCACCAC	713
	OXA-1, OXA-4 y OXA-30	MultiTSO-O_for MultiTSO-O_rev	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	564
Multiplex II CTX-M grupos 1, 2 y 9.	Variantes de CTX-M grupo 1 incluyendo CTX-M-1, CTX-M-3 y CTX-M-15	MultiCTXMGp1_for MultiCTXMGp1- 2_rev	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	688
	Variantes de CTX-M grupo 2 incluyendo CTX-M-2	MultiCTXMGp2_for MultiCTXMGp1- 2_rev	CGTTAACGGCACGATGAC CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	404
	Variantes de CTX-M grupo 9 incluyendo CTX-M-9 y CTX-M-14	MultiCTXMGp9_for MultiCTXMGp9_rev	TCAAGCCTGCCGATCTGGT TGATTCTCGCCGCTGAAG	561
CTX-M- grupo 8/25	CTX-Mg8/25_for CTX-Mg8/25_rev b	AACRCRCAGACGCTCTAC TCGAGCCGGAASGTGTYAT	326	

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la detección de genes que codifican betalactamasas en cepas de *E.coli*.

PCR	Gen	oligonucleótido	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)
Multiplex III ACC,FOX, MOX, DHA, CIT y EBC	ACC-1 y ACC-2	MultiCaseACC_for MultiCaseACC_rev	CACCTCCAGCGACTTGTTAC GTTAGCCAGCATCACGATCC	346
	FOX-1 a FOX-5	MultiCaseFOX_for MultiCaseFOX_rev	CTACAGTGCGGGTGGTTT CTATTTGCGGCCAGGTGA	162
	MOX-1,MOX-2, CMY-1, CMY-8 a CMY-11 y CMY-19	MultiCaseMOX_for MultiCaseMOX_rev	GCAACAACGACAATCCATCCT GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA	895
	DHA-1 y DHA-2	MultiCaseDHA_for MultiCaseDHA_rev	TGATGGCACAGCAGGATATTC GCTTTGACTCTTTCGGTATTCG	997
	LAT-1 a LAT-3, BIL-1, CMY-2 a CMY-7, CMY-12 a CMY-18 y CMY-21 a CMY-23	MultiCaseCIT_for MultiCaseCIT_rev	CGAAGAGGCAATGACCAGAC ACGGACAGGGTTAGGATAGY	538
	ACT-1 y MIR-1	MultiCaseEBC_for MultiCaseEBC_rev	CGGTAAAGCCGATGTTGCG AGCCTAACCCCTGATACA	683
Multiplex IV VEB,PER y GES	GES-1 a GES-9 y GES-11	MultiGES_for MultiGES_rev	AGTCGGCTAGACCGGAAAG TTTGTCCGTGCTCAGGAT	399
	PER-1 y PER-3	MultiPER_for MultiPER_rev	GCTCCGATAATGAAAGCGT TTCGGCTTGACTCGGCTGA	520
	VEB-1 a VEB-6	MultiVEB_for MultiVEB_rev	CATTTCCCGATGCAAAGCGT CGAAGTTTCTTTGGACTCTG	648
Multiplex V GES y OXA-48- like	GES-1 a GES-9 y GES-11	MultiGES_for MultiGES_rev	AGTCGGCTAGACCGGAAAG TTTGTCCGTGCTCAGGAT	399
	OXA-48-like	MultiOXA-48_for MultiOXA-48_rev	GCTTGATCGCCCTCGATT GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	281
Multiplex VI IMP,VIM y KPC	Variantes de IMP excepto IMP-9, IMP-16, IMP-18, IMP-22 y IMP-25	MultiIMP_for MultiIMP_rev	TTGACACTCCATTTACDG GATYGAGAATTAAGCCACYCT	139
	Variantes de VIM incluyendo VIM-1 y VIM-2	MultiVIM_for MultiVIM_rev	GATGGTGTTTGGTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	390
	KPC-1 a KPC-5	MultiKPC_for MultiKPC_rev	CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC ACGACGGCATAGTCATTTGC	538

Tabla 5 (continuación). Oligonucleótidos utilizados para la detección de genes que codifican betalactamasas en cepas de *E.coli*.

6.6 Electroforesis en geles de agarosa

Después de la amplificación, 3 μ l de cada muestra se analizaron en geles de agarosa al 2%, bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliamperes por 120 minutos. Los geles fueron teñidos con 0.3 μ l de Midori Green y fotografiados bajo luz ultravioleta con el digitalizador de imágenes Gel Logic 100 KODAK.

6.7 Análisis estadístico

La prueba de X^2 fue aplicada para identificar la relación entre los grupos filogenéticos y la presencia de genes que codifican para betalactamasas en cepas de *Escherichia coli* aislada de pacientes con infecciones en el tracto urinario. El nivel de significancia estadística $\alpha \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Pacientes analizados

A partir de los 194 pacientes con infecciones del tracto urinario causadas por *E. coli* atendidos en la Unidad Médico Familiar (UMF) no.64, de la Clínica No.72 del IMSS y del laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, se encontró que el 80.9% (n=157) de los pacientes correspondió al sexo femenino y el 19.1% (n=37) restante al sexo masculino (figura 1).

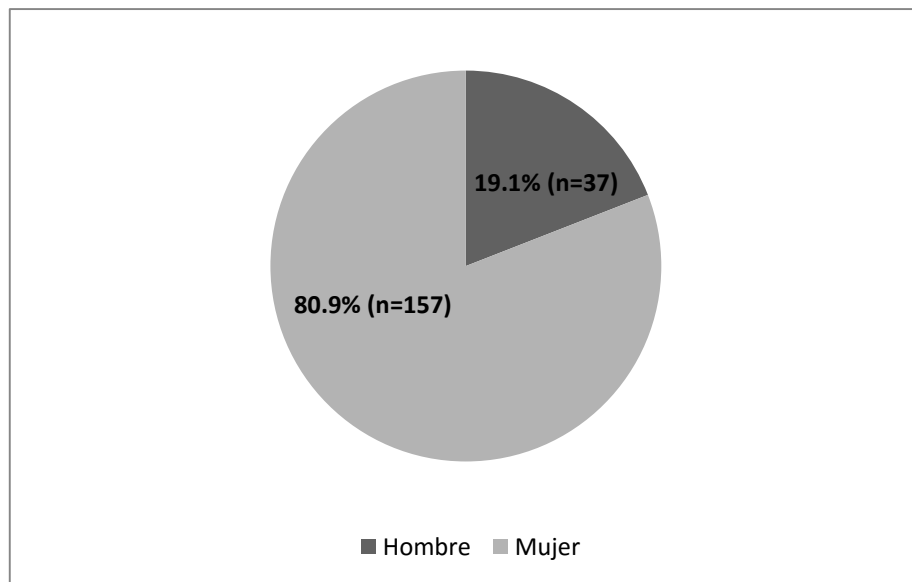


Figura 1. Distribución de los pacientes analizados por sexo.

7.2 Edad de los pacientes

La distribución de los pacientes por rango de edad se muestra en la figura 2. El rango de edad más abundante fue el de 41 a 60 años con el 56% (n=86), seguido el de 61 a 86 años con el 26% (n=40), de 21 a 40 años con el 16% (n=24) y de 1-20 años con el 2% (n=4). En el 20.6% (n=40) de los pacientes restantes no se logró determinar la edad.

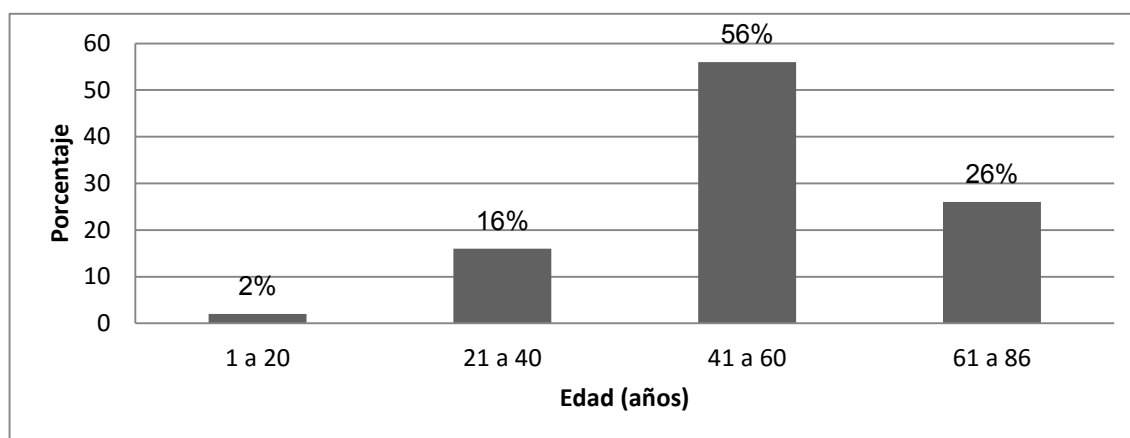


Figura 2. Distribución de los pacientes por rango de edad.

7.3 Diagnóstico de los pacientes analizados

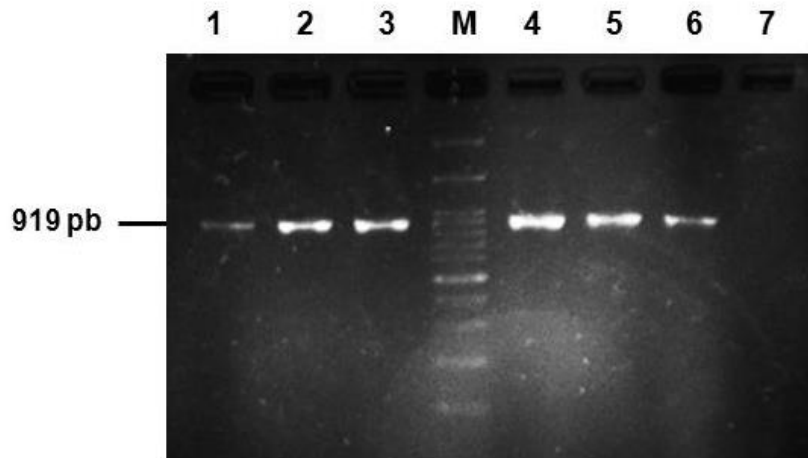
En la tabla 6 se observa el diagnóstico clínico de los 194 pacientes estudiados. El diagnóstico más frecuente fue el de infección de vías urinarias con el 95.3% (n=185), seguido por pielonefritis, urosepsis e infección vaginal con el 1% (n=2), en cada caso, y de lupus eritematoso, cervicovaginitis y litiasis renal con el 0.5% (n=1), en cada caso.

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

Tabla 6. Diagnóstico clínico de los pacientes estudiados.

7.4 Detección de *E. coli*

Escherichia coli se identificó en el 100% (n=194) de los pacientes con infecciones de vías urinarias mediante la amplificación del gen 16S *rRNA* (Fotografía 1).



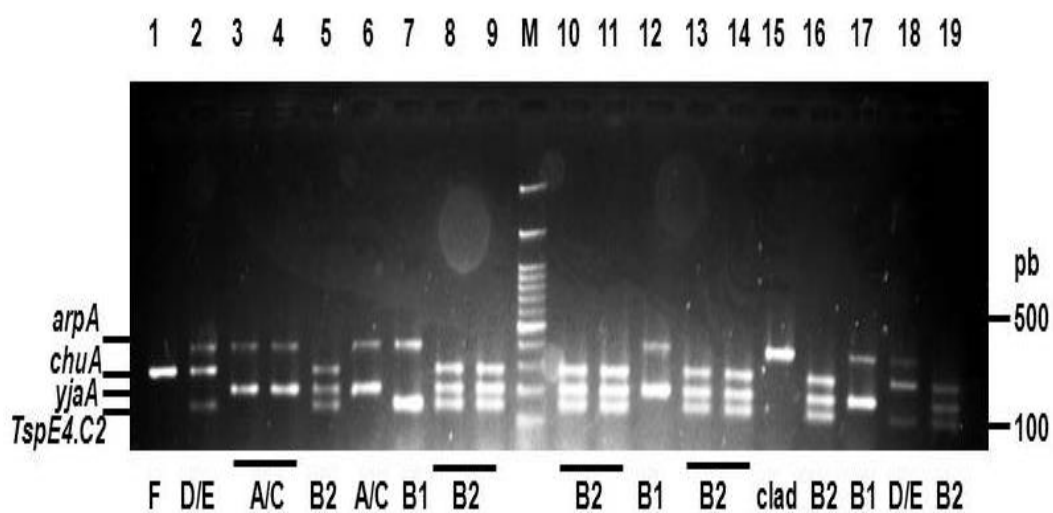
Fotografía 1. Identificación de las cepas de *E.coli* por PCR mediante la detección del gen 16SrRNA. Carriles 1-3, 4 y 5 cepas *E.coli*. (M), MWM 100 pb. Carril 6, control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). Carril 7, control negativo (sin DNA molde).

7.5 Asignación de grupos filogenéticos a *E. coli* por PCR cuadruplex

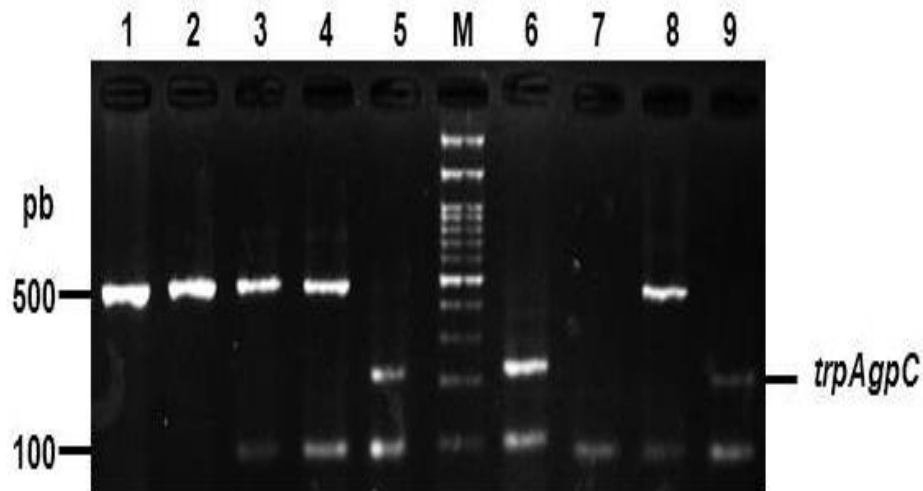
El grupo filogenético más frecuente fue B2 con 51.5% (n=100; fotografía 2), seguido por el grupo A con 13.4% (n=26; fotografía 3), B1 y D con 9.8% (n=19; fotografía 2), en cada caso, C con 8.8% (n=17; fotografía 3), F con 1.5% (n=3; fotografía 2) y clade con 0.5% (n=1; fotografía 2). El filogrupo E no fue identificado en las cepas analizadas. En el 4.7% (n=9) de las cepas no se logró asignar un grupo filogenético con el método utilizado (Tabla 7).

filogrupo	Número	%
A	26	13.4
B1	19	9.8
B2	100	51.5
C	17	8.8
D	19	9.8
F	3	1.5
Clade	1	0.5
No asignado	9	4.7

Tabla 7. Frecuencia de los grupos filogenéticos detectados en las cepas de *E. coli*.



Fotografía 2. Asignación de los grupos filogenéticos en las cepas de *E. coli*. Carril 1, grupo F. Carriles 2 y 18, grupo D/E. Carriles 3, 4 y 6, grupo A/C. Carriles 5, 8, 9, 10, 11, 13, 14 y 19, grupo B2. Carriles 7, 12 y 17, grupo B1. Carril 15, Clade. (M), MWM 100 pb.



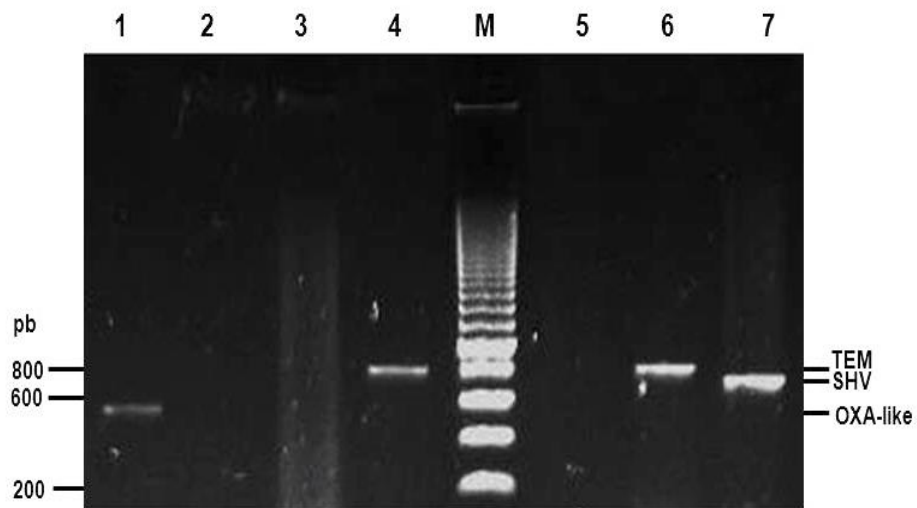
Fotografía 3. Análisis filogenético adicional para las cepas A/C y D/E. Carriles 1 y 2, filogrupo D. Carriles 3, 4, 7 y 8 grupo A. Carriles 5, 6 y 9 grupo C. (M), MWM 100 pb.

7.6 Detección de genes que codifican betalactamasas por PCR multiplex en *E. coli*.

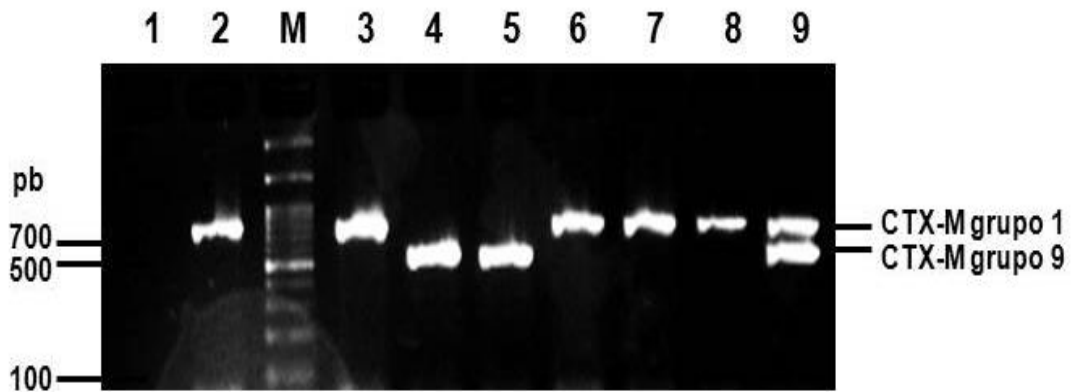
En este trabajo se analizó la presencia de 21 genes que codifican para betalactamasas en las cepas de *E. coli* (n=194), dentro de los cuales únicamente 8 (38%) de estos genes lograron ser identificados en las cepas (Tabla 8). Los marcadores genéticos detectados con mayor frecuencia fueron *bla*_{TEM} y *bla*_{OXA-like} con el 26.3% (n=51; fotografía 4), en cada caso, seguido por *bla*_{CIT} con 24.7% (n=48; fotografía 6), *bla*_{CTX-M grupo 1} con 22.7% (n=44; fotografía 5), *bla*_{SHV} con 14.9% (n=29; fotografía 4), *bla*_{OXA-48-like} con 8.8% (n=17; fotografía 7), *bla*_{CTX-M grupo 9} con 3% (n=6; fotografía 5) y *bla*_{ACC} con 0.5% (n=1).

Gen	Número	Porcentaje
<i>bla</i> _{TEM}	51	26.3
<i>bla</i> _{OXA-like}	51	26.3
<i>bla</i> _{CIT}	48	24.7
<i>bla</i> _{CTX-M grupo 1}	44	22.7
<i>bla</i> _{SHV}	29	14.9
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	17	8.8
<i>bla</i> _{CTX-M grupo 9}	6	3
<i>bla</i> _{ACC}	1	0.5

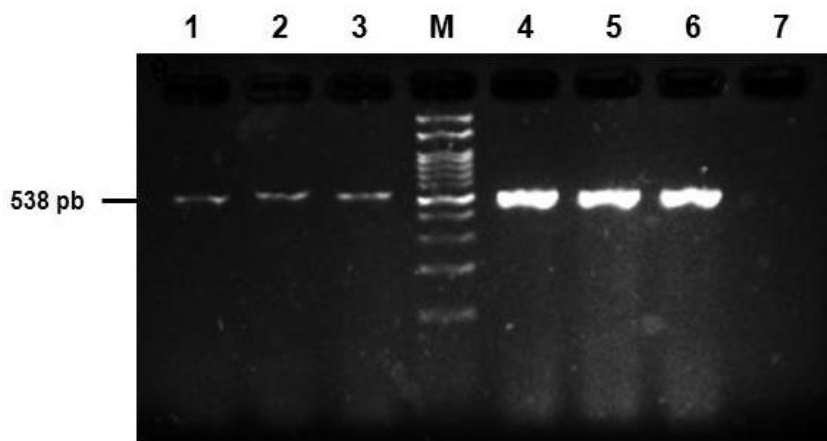
Tabla 8. Frecuencia de los genes que codifican betalactamasas en las cepas de *E. coli*.



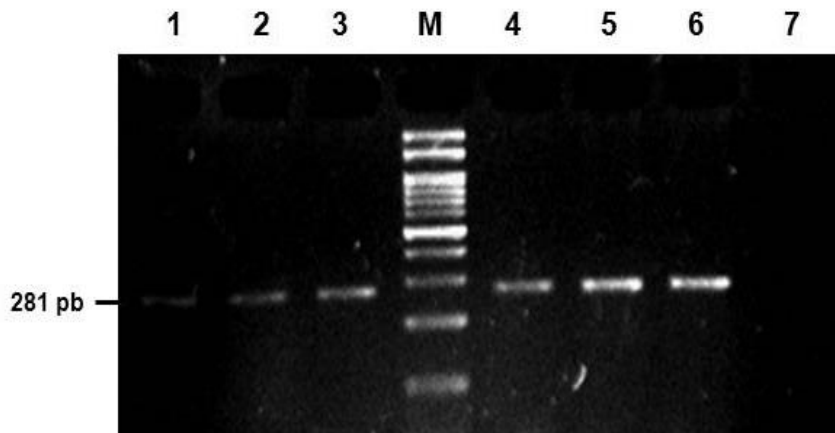
Fotografía 4. Detección de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{OXA-like} en cepas de *E. coli*. Carril 1, *bla*_{OXA-like} (564 pb). Carriles 2 y 3, cepas negativas. Carril 4 y 6, *bla*_{TEM} (800 pb). Carril 7, *bla*_{SHV} (713 pb). (M), MWM 200 pb. Carril 5, control negativo (sin DNA molde).



Fotografía 5. Detección de los genes *bla*_{CTX-M} grupo 1 y *bla*_{CTX-M} grupo 9 en cepas de *E.coli*. Carriles 2, 3, 6, 7 y 8, *bla*_{CTX-M} grupo 1 (688 pb). Carriles 4 y 5, *bla*_{CTX-M} grupo 9. (M), MWM 100 pb. Carril 9, control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). Carril 1, control negativo (sin DNA molde).



Fotografía 6. Detección del gen *bla*_{CIT} en cepas de *E. coli*. Carriles 1-3 y 4-5, *bla*_{CIT} (538 pb). (M), MWM 100 pb. Carril 6, control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). Carril 7, control negativo (sin DNA molde).



Fotografía 7. Detección del gen *bla*_{OXA-48-like} en cepas de *E. coli*. Carriles 1-3 y 4-6, *bla*_{OXA-48-like} (281 pb). (M), MWM 100 pb. Carril 6, control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). Carril 7, control negativo (sin DNA molde).

Con respecto a la distribución de los genes de betalactamasas agrupados por familias encontramos que la familia más frecuente fue la de las penicilinas [*TEM/SHV/OXA*; 67.5% (n=131)], seguida por las cefotaximas [*CTX-M*; 25.8% (n=50)], carbapenemasas tipo *AmpC*; 25.5% (n=49) y las carbapenemasas tipo *OXA-48*; 8.7% (n=17: figura 3).

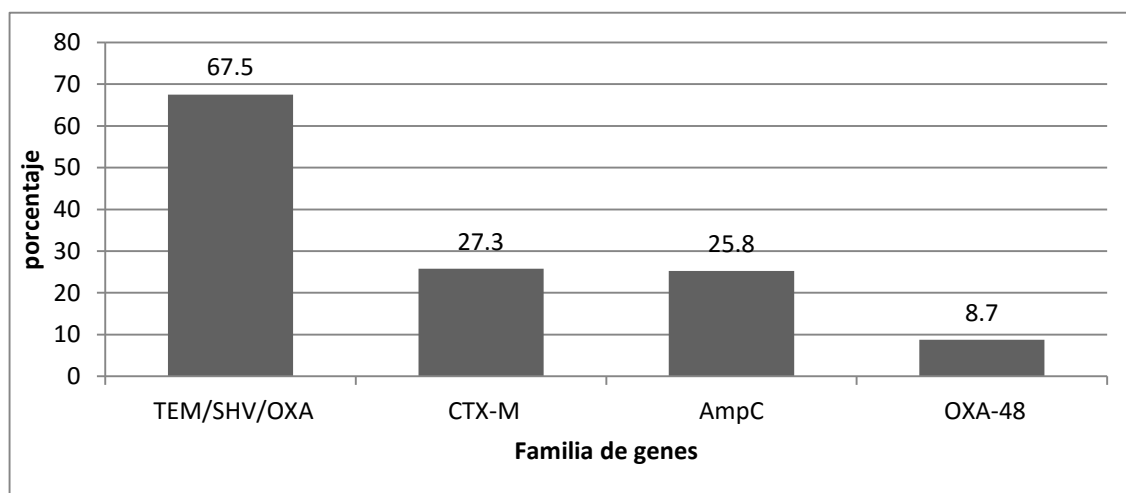


Figura 3. Porcentaje de las familias de genes que codifican para betalactamasas en *E. coli*.

7.7 Asociación de los grupos filogenéticos y los genes BLEE en *E. coli*

La tabla 9 muestra la distribución de los genes que codifican para betalactamasas en los grupos filogenéticos de *E. coli*. El grupo que presentó la mayor frecuencia de genes fue el filogrupo B2 con el 57.9% (n=143), dentro del cual los genotipos más frecuentes fueron *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-like} y *bla*_{CTX-M grupo 1} con 60.8% (n=31), 58.8% (n=30) y 66% (n=29), respectivamente. No se detectaron genes en el grupo clade.

En la tabla 10 se aprecia que la frecuencia más alta de asociación de los genes que codifican para betalactamasas se encontró en el filogrupo B2 con el 53.3% (n=24) para 2 genes, el 52.9% (n=9) para 3 genes y 100% (n=6) en la asociación de cuatro genes.

		Filogrupo						
		A	B1	B2	C	D	F	Desconocido
Gen (No., %)	<i>bla</i> _{TEM}	5 (9.8)	3 (5.9)	31 (60.8)	7 (13.7)	2 (3.9)	1 (2)	2 (3.9)
	<i>bla</i> _{SHV}	4 (13.8)	3 (10.3)	14 (48.3)	3 (10.3)	4 (13.8)	1 (3.5)	0
	<i>bla</i> _{OXA-like}	6 (11.8)	4 (7.8)	30 (58.8)	6 (11.8)	4 (7.8)	0	1 (2)
	<i>bla</i> _{CTX-M grupo 1}	2 (4.5)	3 (6.8)	29 (66)	5 (11.4)	2 (4.5)	0	3 (6.8)
	<i>bla</i> _{CTX-M grupo 9}	3 (50)	0	2 (33.3)	0	0	1 (16.7)	0
	<i>bla</i> _{ACC}	0	0	1 (100)	0	0	0	0
	<i>bla</i> _{CIT}	10 (20.8)	4 (8.4)	24 (50)	5 (10.4)	4 (8.4)	0	1 (2)
	<i>bla</i> _{OXA-48}	1 (5.9)	1 (5.9)	12 (70.5)	2 (11.8)	1 (5.9)	0	0
Total	31 (12.6)	18 (7.3)	143 (57.9)	28 (11.3)	17 (6.9)	3 (1.2)	7 (2.8)	

Tabla 9. Porcentaje de genes BLEE en los filogrupos de *E. coli*

Es importante mencionar que se encontraron cepas pertenecientes a los filogrupos A (n=8), B1 (n=7), C (n=1), D (n=7) y F (n=1) que no presentaron ningún gen de betalactamasas. La asociación de dos genes de betalactamasas fue la más frecuente entre los grupos filogenéticos de *E.coli* con el 66.17% (n=68).

7.7.1 Análisis estadístico

De acuerdo con los resultados obtenidos con la prueba de χ^2 , no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia de aparición de los diferentes genes de betalactamasas y los distintos filogrupos de *Escherichia coli*. El nivel de confianza utilizado fue del 95% con $\alpha \leq 0.05$.

Cantidad de genes	Genes	Grupo filogenético (No. de cepas)					
		A	B1	B2	C	D	F
0	-	8	7	17	1	7	1
1	<i>bla</i> _{CIT}	5	2	5	0	2	0
	<i>bla</i> _{CTX-M grupo 1}	0	1	5	0	0	0
	<i>bla</i> _{SHV}	0	2	7	1	3	0
	<i>bla</i> _{OXA-48}	0	1	1	1	0	0
	<i>bla</i> _{TEM}	1	1	18	3	1	1
	<i>bla</i> _{OXA-like}	2	0	8	2	2	0
2	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-like}	0	1	2	0	0	0
	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CIT}	2	1	2	2	0	0
	<i>bla</i> _{OXA-like} , <i>bla</i> _{CIT}	2	1	2	1	1	0
	<i>bla</i> _{OXA-like} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 1}	0	1	9	1	1	0
	<i>bla</i> _{CTX-M grupo 1} , <i>bla</i> _{OXA-48}	0	0	1	0	0	0
	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-48}	0	0	2	1	0	0
	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CIT}	0	0	3	1	0	0
	<i>bla</i> _{CTX-M grupo 1} , <i>bla</i> _{CIT}	0	0	1	0	0	0
	<i>bla</i> _{OXA-like} , <i>bla</i> _{OXA-48}	0	0	1	0	0	0
	<i>bla</i> _{CTX-M grupo 1} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 9}	0	0	1	0	0	0
	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 9}	0	0	0	0	0	1
	<i>bla</i> _{CIT} , <i>bla</i> _{OXA-48}	0	0	0	0	1	0
	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 1}	1	0	0	0	0	0
	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 9}	2	0	0	0	0	0

Tabla 10. Perfil de genes que codifican para betalactamasas de amplio espectro en los grupos filogenéticos de *E. coli*.

Cantidad de genes	Genes	Grupo filogenético (No. de cepas)					
		A	B1	B2	C	D	F
3	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-like} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 1}	0	1	0	1	0	0
	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 1} , <i>bla</i> _{OXA-48}	0	0	1	0	0	0
	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 1} , <i>bla</i> _{CIT}	0	0	2	0	0	0
	<i>bla</i> _{CTX-M grupo 1} , <i>bla</i> _{ACC} , <i>bla</i> _{CIT}	0	0	1	0	0	0
	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-like} , <i>bla</i> _{CIT}	1	0	2	0	0	0
	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{OXA-like} , <i>bla</i> _{CIT}	0	0	0	0	1	0
	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{OXA-like} , <i>bla</i> _{OXA-48}	1	0	0	0	0	0
	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 1} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 9}	1	0	0	0	0	0
	<i>bla</i> _{OXA-like} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 1} , <i>bla</i> _{CIT}	0	0	1	2	0	0
	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 1} , <i>bla</i> _{CIT}	0	0	1	0	0	0
<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 1} , <i>bla</i> _{OXA-48}	0	0	1	0	0	0	
4	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-like} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 1} , <i>bla</i> _{OXA-48}	0	0	1	0	0	0
	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{OXA-like} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 1} , <i>bla</i> _{OXA-48}	0	0	1	0	0	0
	<i>bla</i> _{OXA-like} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 1} , <i>bla</i> _{CIT} , <i>bla</i> _{OXA-48}	0	0	2	0	0	0
	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{OXA-like} , <i>bla</i> _{CIT} , <i>bla</i> _{OXA-48}	0	0	1	0	0	0
	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 1} , <i>bla</i> _{CTX-M grupo 9} , <i>bla</i> _{CIT}	0	0	1	0	0	0

Tabla 10.(Continuación) Perfil de genes que codifican para betalactamasas de amplio espectro en los grupos filogenéticos de *E. coli*.

7. DISCUSIÓN

8.1 Pacientes estudiados

Para el desarrollo de este estudio se analizaron molecularmente 194 cepas de *E. coli* previamente aisladas de pacientes (157 mujeres y 37 hombres; Figura 1) atendidos en la Unidad Médico Familiar (UMF) No.64 del IMSS, en la Clínica No.72 del IMSS y en el laboratorio de Análisis Clínicos de la FES Iztacala, UNAM, por presentar signos y síntomas de infección en vías urinarias. Las ITUs son los padecimientos más frecuentes que afectan principalmente a mujeres debido a la proximidad del espacio periuretral al ano y porque la uretra es más corta que la masculina, lo que facilita el acceso de las bacterias fecales a la vejiga (Kaper *et al.*,2004;Foxman,2002). A nivel mundial, como en nuestro país, las ITUs se han convertido en un verdadero problema de salud, en donde la frecuencia de las infecciones recurrentes en mujeres se encuentra entre el 20-25%, debido principalmente a la actividad sexual (>9 veces/mes) (Neild, 2003; Spurbeck y Mobley, 2013)

En este estudio el 56% (n=86) de los pacientes con ITUs se encontró en el rango de edad comprendido entre los 41-60 años, seguido por el de 61-86 años con el 26% (n=40) (Figura 2). Se ha descrito que la transmisión de las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC) ocurre principalmente por la actividad sexual en adultos jóvenes, mientras que las enfermedades crónicas, el síndrome metabólico, la diabetes y el tratamiento con antibióticos en los adultos mayores son factores que pueden desencadenar padecimientos más severos como cistitis y/o pielonefritis(Foxman,2002; Ronald, 2002).

8.2 Identificación de *E. coli* en las infecciones urinarias de los pacientes

En este trabajo las cepas de *E. coli* (n= 194) fueron identificadas mediante la amplificación del gen 16S *rRNA* por PCR convencional (Fotografía 1). La amplificación del gen 16S *rRNA* es uno de los métodos de biología molecular más precisos para identificar microorganismos (Janda *et al.*,2007).

Se ha descrito que *E. coli* es el principal agente causal de las ITUs, con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad (Alabsi *et al.*, 2014). Las ITUs adquiridas en la comunidad son altamente frecuentes y usualmente difíciles de erradicar porque las cepas patógenas de *E. coli* se han seleccionado como resistentes a los antibióticos (Bashir *et al.*, 2011). En México durante el periodo comprendido entre los años de 2003-2008 se reportó un total de 3, 076,468 casos de infecciones del tracto urinario, de los cuales 2, 294,451 (74.5 %) correspondió a mujeres y 749,755 (23%) a hombres. Las enfermedades urinarias ocuparon el tercer lugar de las 20 principales causas de morbilidad (Secretaría de Salud, 2009).

La invasión exitosa del tracto urinario por UPEC va a depender del número de factores de virulencia que posean las cepas bacterianas, así como del tamaño del inóculo y de la evasión bacteriana a la respuesta inmune del hospedero (Sobel, 1997). La patogenicidad de las cepas UPEC se relaciona directamente con la expresión de los múltiples factores de virulencia que posean las cepas, sin embargo no existe un número compartido de factores de virulencia debido a que la mayoría de las cepas UPEC provienen de clonas distintas. Las adhesinas específicas incluyendo *pap* (pilus associated with pyelonephritis), *afal* (afimbrial adhesin I) y *fim* (type-1 fimbriae), entre otras, son importantes para el inicio de la colonización. Posteriormente muchas toxinas son secretadas, al igual que las hemolisinas y el factor necrotizante citotóxico (*cnfl*). Estos y otros factores de virulencia se encuentran presentes en las cepas UPEC (Kaper *et al.*, 2004).

8.3 Grupos filogenéticos en *E. coli*

El análisis filogenético tradicional diferencia a todas las cepas de *E. coli* uropatógena en 4 grupos filogenéticos principales; A, B1, B2, D (tabla 7). En este trabajo el 51.5% de las cepas perteneció al grupo filogenético B2 (n=100; fotografía 2), el 13.4% al filogrupo A (n=26; fotografía 3) y el 9.8% a los filogrupos B1 y D (n=19; fotografía 2), en cada caso. Estos resultados son similares a los descritos por Molina *et al.*, (2011) en un grupo de 119 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes de la Ciudad de México, en donde la frecuencia más alta fue para el

filogrupo B2 (36%; n=43), seguida por el filogrupo A (28.7%; n=34), D (27.8%;n=32) y B1(8.4%;n=10). En otro estudio realizado por Kudinha *et al.*, (2013) en Australia, en cepas de *E. coli* se encontró una elevada prevalencia para los grupos B2 (75%,n=104) y D (13%, n=26), mientras que Chakraborty *et al.*, (2014) encontró en cepas de *E. coli* que el grupo D presentó una frecuencia del 36% (n=108) y B2 del 34.6% (n=104). Estos estudios realizados en otras partes del mundo reflejan que las cepas extraintestinales de *E.coli* pertenecen principalmente a estos dos grupos filogenéticos (B2 y D). Las cepas extraintestinales poseen factores de virulencia que les permiten invadir, colonizar e inducir enfermedad en sitios fuera del sistema gastrointestinal (Ferjani *et al.*, 2012).

A pesar de que existen pocos estudios que muestren la distribución de los grupos filogenéticos con el nuevo método descrito por Clermont en 2013, la mayor ventaja de esta técnica, es que se identificaron los grupos E, F y la especie críptica de *Escherichia* clade 1 (tabla 7; fotografía 2). El 10.82% (n=21) de las cepas en este estudio fue asignada a alguno de los filogrupos recientemente descritos: E, F y *Escherichia* clade ; Iranpour *et al.*, (2015) reportó resultados similares con un 25% (n=35) de un total de 140 cepas de *E. coli* aisladas en Irán; Dureja *et al.*,(2014) obtuvo el 10.78% (n=11) de un total de 102 cepas aisladas de pacientes sanos en India.

En el 4.7% (n=9) de nuestras cepas no fue posible asignar un grupo filogenético (Tabla 7). Clermont *et al.*, (2013) han descrito que la principal razón por la que no es posible identificar todos los filogrupos en las cepas de *E. coli* es debido a que esta especie presenta una elevada variabilidad genética, ocasionada por la constante ganancia y pérdida de genes; probablemente la fracción de cepas no asignadas en este estudio pertenece a grupos filogenéticos extremadamente raros o que resultaron de la recombinación entre dos filogrupos diferentes.

8.4 Detección de BLEE en las cepas de *E. coli*

La frecuencia de infecciones del tracto urinario causadas por *E. coli* productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) se ha incrementado alrededor del mundo en los últimos años. En este estudio, el 76.8% (n=149) de las cepas UPEC analizadas portaba al menos un gen de betalactamasas (Tabla 10), lo que refleja una elevada prevalencia de cepas productoras de BLEE. Barguigua *et al.*, (2013) señalaron que entre los principales factores que influyen en la rápida diseminación de las cepas productoras de betalactamasas se encuentra el uso excesivo de antibióticos de amplio espectro. Se ha reportado que la transmisión de cepas de *E. coli* de portadores sanos en el interior familiar y de cepas presentes en animales de consumo humano, como el ganado o las aves de corral, además de las mascotas de casa, podrían actuar como reservorios para la transmisión de cepas de *E. coli* portadoras de BLEE dentro de la comunidad (Chong *et al.*,2011).

La mayor parte de las BLEE son derivadas de tres tipos principales de enzimas TEM, SHV y OXA (más de 130 tipos de TEM y 50 tipos de SHV) (Navarro *et al.*, 2011). En este estudio los genotipos identificados con mayor frecuencia en las cepas UPEC fueron *bla*_{TEM} y *bla*_{OXA-1} (26.3%; n=51, en cada caso; Figura 3, Fotografía 4), y *bla*_{SHV} con el 14.9% (n=29; Figura 3, Fotografía 4). Estos resultados son semejantes con los dos estudios realizados en cepas clínicas de *E. coli* provenientes de Líbano, Sana *et al.*, (2011), en donde se detectó el gen *bla*_{OXA-1} en el 45.2% (n=33) de las cepas, *bla*_{TEM} en el 21,9% (n=16) y *bla*_{SHV} en el 4.1% (n=3), mientras que Baroud *et al.*, (2013) detectaron con mayor frecuencia a los tipos *bla*_{TEM} y *bla*_{OXA-1} (80%,n=12; 73.3%, n=11, respectivamente). Por otro lado, la frecuencia del gen *bla*_{SHV} reportada en este estudio es mayor a la encontrada por Al Agamy *et al.*,(2014) y Baroud *et al.*, (2013), en ambos casos no se detectó el tipo SHV. La baja frecuencia de *bla*_{SHV} puede deberse a que los genes *bla*_{SHV} son derivados del cromosoma y se encuentran con mayor frecuencia en *Klebsiella pneumoniae*, sin embargo el gen es adquirido por otras bacterias a través de plásmidos; por otro lado *Escherichia coli* es el principal productor de

enzimas tipo TEM, lo que concuerda con los resultados de este estudio (Chong *et al.*, 2011).

En este estudio se identificaron en las cepas UPEC los genes tipo CTX-M en el 25.8% (n =50, Figura 3), *bla*_{CTX-M} grupo 1 en el 22.7% (n=44, Fotografía 5 y Figura 3) y *bla*_{CTX-M} grupo 9 en el 3% (n=6, Fotografía 5 y Figura 3). Estos resultados son inferiores a los descritos en un estudio de cepas provenientes de hospitales pediátricos de París, en donde el 97.2% (n=35) de las cepas fue portadora del gen tipo CTXM, el 65.7% (n=23) del gen *bla*_{CTX-M} grupo 1 y el 33.3% (n=12) del gen *bla*_{CTX-M} grupo 9 (Morgand *et al.*,2014), mientras que en el estudio realizado en Marruecos por Barguigua *et al.*, (2013) se reportó que el 77.5% (n=38) de las cepas de *E. coli* acarreó el genotipo CTX-M, el 94.7% (n=36) el gen *bla*_{CTX-M} grupo 1, mientras que el gen *bla*_{CTX-M} grupo 9 únicamente se identificó en 2 cepas. Por otro lado los genes *bla*_{CTX-M} grupo 2 y *bla*_{CTX-M} grupo 8/25 no fueron detectados en este estudio, lo cual es parecido a lo reportado por Brisse *et al.*, (2012), en donde la prevalencia del gen *bla*_{CTX-M} grupo 2 fue muy baja (2%, n=3). Las diferencias pueden deberse probablemente a la distribución geográfica, en donde se ha descrito en los últimos años que las enzimas CTX-M del tipo BLEE son más prevalentes en cepas bacterianas de Europa y América del Sur (Pitout, 2008).

Se considera que las cefotaximasas CTX.M plasmídicas derivan de las penicilinasas cromosómicas naturales de *Kluyvera* spp., sin embargo a esta familia de enzimas se les asocia con elementos genéticos móviles altamente eficientes, por lo que el genotipo CTX-M se ha diseminado por todo el mundo asociado a UPEC principalmente (Seral, 2010; Falagas *et al.*, 2009). Además la rápida diseminación de las enzimas tipo CTXM-15 en particular se asocia con la dispersión de una clona particular de *E. coli* ST131; Brisse *et al.*, (2012) señalaron que esta característica de la clona *E. coli* ST131 puede deberse a las habilidades de ST131 para adquirir los elementos genéticos móviles que acarrean los genes *bla*_{CTX-M}.

Las cepas patógenas de *E. coli* que acarrean genes de betalactamasas mediados por el plásmido *AmpC* representan uno de los mayores problemas de salud, debido a que estas bacterias usualmente se han seleccionado como resistentes a

la mayoría de los antibióticos betalactámicos, excepto cefepime, cefpirome y los carbapenémicos (Pérez y Hanson *et al.*, 2002). En este estudio la familia *AmpC* ocupó el tercer lugar en detección en las cepas analizadas (n=49, Figura 3), el gen *bla_{CIT}* se presentó en el 24.7% (n= 48; Fotografía 6) y el gen *bla_{ACC}* se encontró en 1 cepa; estos datos son similares a los resultados obtenidos por Li *et al.*, (2015), quienes detectaron *bla_{CIT}* en el 77% (n=14) de las cepas y *bla_{ACC}* en una de las cepas clínicas aisladas en Irlanda. Por otro lado, las familias de genes FOX, DHA, EBC y MOX no fueron detectadas en las cepas analizadas en este estudio, lo cual concuerda nuevamente con el estudio de Li, *et al.*, (2015). Se ha descrito que los genes que codifican betalactamasas tipo *AmpC* tienen origen cromosómico, derivado de varios miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, además se ha demostrado que cepas hiperproductoras de betalactamasas debido al gen *AmpC* presentan el fenotipo de resistencia específico para los carbapenémicos (Navarro *et al.*, 2011). El gen cromosomal *AmpC* en *Escherichia coli*, generalmente es expresado a niveles bajos sin causar resistencia clínica, porque el promotor es débil y el gen posee un atenuador. Sin embargo, la sobreexpresión del gen *AmpC* puede ocurrir en *E. coli* por la hiperproducción cromosomal o por la adquisición de este gen en un plásmido u otro elemento de transferencia (Pérez y Hanson, 2002).

El tratamiento médico de las Enterobacterias productoras de OXA-48 like se ha complicado debido a las dificultades para su detección en laboratorio (Lowman *et al.*, 2015). En este estudio la familia de las carbapenemasas clase OXA-48 fue la menos frecuente (8.76%, n=17; Figura 3; Fotografía 7); estos datos son semejantes a los obtenidos por Baroud *et al.*, (2013) y Navarro *et al.*, (2012), quienes reportan porcentajes de 20% (n=3) y 13.6% (n=3), respectivamente, para en la detección del gen *bla_{OXA-48-like}*. Gulmez *et al.*, (2008) describieron que la mayoría de los casos de carbapenemasas tipo OXA son reportados en la especie *Acinetobacter baumannii*, mientras que los reportes de la presencia del gen en *Enterobacteriaceae* son escasos, sin embargo dentro de esta familia, *Klebsiella pneumoniae* es la especie con mayor frecuencia en portar el gen *bla_{OXA-48-like}*. Se ha descrito que la carbapenemasa OXA es codificada por el gen *bla_{OXA-48-like}* que

es parte del transposon *Tn1999* formado de dos copias de la secuencia de inserción *IS1999* (Navarro *et al.*, 2012).

8.5 Asociación de los grupos filogenéticos y los genes BLEE en *E. coli*

En este estudio el 54.9% (n=140; Tabla 9) de los genes detectados en las cepas UPEC se presentó en el filogrupo B2, además este grupo mostró la mayor frecuencia de cada uno de los genes detectados. Los genotipos más frecuentes fueron *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-like} y *bla*_{CTX-M} grupo 1 con 60.8% (n=31), 58.8% (n=30) y 66% (n=29) respectivamente. A pesar de esta tendencia, en los resultados no se encontró relación entre los grupos filogenéticos y la presencia de genes BLEE, lo cual coincide con lo reportado por Chakraborty *et al.*, (2014) para las 300 cepas clínicas de Enterobacterias aisladas en la India. Sin embargo en otro estudio realizado por Branger *et al.*, (2005) en 129 cepas clínicas aisladas de París, se describió una fuerte correlación entre las BLEEs tipo SHV y TEM (en menor proporción) con cepas del filogrupo B2 que tenían múltiples factores de virulencia y eran sensibles a las flouoroquinolonas; así como el tipo CTX-M fue asociado al filogrupo D en cepas que carecían de factores de virulencia pero que presentaban resistencia frente a las flouoroquinolonas.

En este estudio el 66.17% (n=68; Tabla 10) de las cepas analizadas portó al menos dos genes de betalactamasas. Sana *et al.*, (2011) reportaron un porcentaje similar (54.8%; n=40) de prevalencia de dos más genes en las 73 cepas de *Escherichia coli* analizadas. El perfil de dos genes más frecuentemente acarreado por las cepas analizadas en este estudio fue *bla*_{CTX-M-1}+ *bla*_{OXA-1} (n=15). Este patrón ha sido reportado por Sana *et al.*, (2011) y Barguigua *et al.*, (2013) (n=22 y n= 24, respectivamente). Otro patrón reportado por estos autores fue *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} (n=9 y n=24, respectivamente), que fue encontrado en este estudio en 2 de las cepas analizadas. Sin embargo, Millan *et al.*,(2014) reportaron que la procedencia geográfica de las cepas y las características de la población estudiada son elementos a considerar cuando se establecen patrones particulares de distribución filogenética en cepas de *E. coli*.

9. CONCLUSIONES

1. El grupo filogenético B2 fue identificado con más frecuencia entre las cepas de *E. coli* responsables de las infecciones de vías urinarias de los pacientes estudiados.

2. Los genes que codifican para betalactamasas identificados con mayor frecuencia entre las cepas de *E. coli* fueron *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-like}, *bla*_{CIT} y *bla*_{CTX-M} grupo 1, mientras que los menos frecuentes fueron *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{CTX-M} grupo 9 y *bla*_{ACC}.

3. La frecuencia más alta de los genes que codifican para betalactamasas entre las cepas de *E. coli* fue detectada en el filogrupo B2.

4. La mayoría de las cepas de *E. coli* analizadas fue portadora de al menos un gen de betalactamasas. Un grupo de cepas presentó hasta 4 genes, dentro de los cuales la asociación más frecuente fue *bla*_{OXA-like} + *bla*_{CTX-M} grupo 1.

5. La elevada variabilidad filogenética y la amplia distribución de genes que codifican para betalactamasas entre las cepas de *E. coli* analizadas, representa un grave problema médico para la erradicación de las infecciones de vías urinarias, lo que podría incrementar la cronicidad de los episodios y el desarrollo de infecciones más agudas, como cistitis y/o pielonefritis.

10. LITERATURA CITADA

1. Ahmed N, Dobrindt U, Hacker J, Hasnain S. 2008. Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. *Nat Rev Microbiol.* 6:387-394.
2. Al-Agamy M, Shibl A, Hafez M, Al-Ahdal M, Memish Z, Khubnani H. 2014. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Riyadh: emergence of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 13:1-7.
3. Alabsi M, Ghazal A, Sabry S, Alasaly M. 2014. Association of some virulence genes with antibiotic resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection patients in Alexandria, Egypt: A hospital-based study. *J Glob Antimicrob Resist.* 2:83-86.
4. Barguigua A, El Otmani F, Talmi M, Zerouali K, Timinouni M. 2013. Prevalence and types of extended spectrum β -lactamases among urinary *Escherichia coli* isolates in Moroccan community. *Microb Pathog.* 61:16-22.
5. Baroud M, Dandache I, Araj G, Wakim R, Kanj Z, Kanafani Z, Khairallah M, Sabra A, Shehab M, Dbaibo G, Matar G. 2013. Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases *Int J Antimicrob Agents.* 41:75-79.
6. Bashir S, Sarwar Y, Ali A, Mohsin M, Azeem M, Tariq A, Haque A. 2011. Multiple drug resistance patterns in various phylogenetic groups of urophatogenic *E.coli* isolated from Faisalabad region of Pakistan. *Brazilian J Microbiol.* 42:1278-1283.
7. Bonnet R. 2004. Growing group of Extended- Spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 1-14.
8. Bradford P. 2001. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev.* 14: 933-951.

9. Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, Gouriou S, Picard B, Denamur E. 2005. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis.* 11: 54-61.
10. Brisse S, Diancourt L, Laouénan C, Vigan M, Caro V, Arlet G, Driex L, Leflon V, Mentré F, Jarlier V, Nicolas M, Coli β study group. 2012. Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes. *J Clin Microbiol.* 50: 297-81.
11. Bush K, Jacoby G. 2010. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agent Chemother.* 54: 969-76.
12. Chakraborty A, Adhikari P, Shenoy S, Saralaya V. 2015. Clinical significance and phylogenetic background of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolates from extra-intestinal infections. *J Infect Pub Health.* 8: 248-253.
13. Chaudhuri R, Henderson I. 2012. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect Genet Evol.* 12:214-226.
14. Chong Y, Ito Y, Kamimura T. 2011. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Genet Evol.* 11:1499-1504.
15. Clermont O, Christenson J, Denamur E, Gordon D. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 5:58-65.
16. Croxen M, Finlay B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 8:26-38.
17. Dallenne C, Da Costa A, Dominique D, Favier C, Arlet G. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 65:490-495.
18. Dureja C, Mahajan S, Raychaudhuri S. 2014. Phylogenetic Distribution and Prevalence of Genes Encoding Class I Integrons and CTX-M-15 Extended-Spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Healthy Humans in Chandigarh, India. *PLOS one.* 9:1-6.

19. Duttaroy B, Mehta S. 2005. Extended spectrum β -lactamases (ESBL) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Indian J Pathol Microbiol.* 48:45-48.
20. Emödy L, Kerényi M, Nagy G. 2003. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents.* 22:S29- S33.
21. Engleberg C, Terence D. 2012. Mecanismos de las enfermedades microbianas. Ed. Elsevier. 575.
22. Falagas M, Karageorgopoulos D. 2009. Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect.* 73:345-354.
23. Ferjani S, Saidani M, Ennigrou S, Hsairi M, Ben S. 2012. Virulence determinants, phylogenetic groups and fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from cystitis and pyelonephritis. *Pathol Biol.* 60:270-274.
24. Foxman B. 2002. Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med.* 113:5S-13S.
25. Gordon D, Clermont O, Tolley H, Denamur E. 2008. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol.* 10:2481-2496.
26. Greenwood D, Slack R, Peutherer J, Barer M. 2007. Medical microbiology: A guide to microbial infections. Ed. Elsevier. 275-283.
27. Gülmez D, Woodford N, Palepou M, Mushtaq S, Metan G, Yakupogullari Y, Kocagoz S, Uzun O, Hascelik G, Livermore D. 2008. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents.* 31:523-526.
28. Iranpour D, Hassanpour M, Ansari H, Tajbakhsh S, Khamisipour G, Najafi A. 2015. Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. *Biomed Research Int.* 15:1-7.

29. Janda J, Abbott S. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory pluses, perils and pitfalls. *J Clin Microbiol.* 45:2761-2764.
30. Jawetz M, Melnick J, Adelberg E, Brooks G, Butel J, Ornston L. 2004. *Microbiología Médica*. Ed. El manual moderno. México. 248-261.
31. Kanamaru S, Kurazono H, Nakano M, Terai A, Ogawa O, Yamamoto S. 2006. Subtyping of uropathogenic *Escherichia coli* according to the pathogenicity island encoding uropathogenic-specific protein: comparison with phylogenetic groups. *Int J Urol.* 13:754-60.
32. Kaper J, Nataro J, Mobley H. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2:123-140.
33. Kudinha T, Johnson J, Andrew S, Kong F, Anderson P, Gilbert G. 2013. Distribution of phylogenetic groups, sequence type ST131, and virulence-associated traits among *Escherichia coli* isolates from men with pyelonephritis or cystitis and healthy controls. *Clin Microbiol Infect.* 19:E173-E180.
34. Li Y, Cassidy F, Salmon A, Keating D, Herra C, Schaffer K. 2015. Detection and epidemiology of plasmid-mediated AmpC β -lactamase producing *Escherichia coli* in two Irish tertiary care hospitals. *J Global Antimicrob Resist.* 15:1-5.
35. Lowman W, Schleicher G. 2015. Antimicrobial treatment and outcomes of critically ill patients with OXA-48_{like} carbapenemase-producing Enterobacteriaceae infections. *Diagnostic Microbiol Infect Dis.* 81:138-140.
36. Milkman R. 1973. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. *Science* 82:1024–1026.
37. Millán Y, Hernández E, Millán B, Araque M. 2014. Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Rev Argent Microbiol.* 46:175-181.
38. Molina J, Aparicio G, Ribas R, Gavilanes S, Chávez M, Hernández R, Manjarrez H. 2011. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups

- among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J Infect Dev Ctries.* 5:840-849.
39. Moreno E, Prats G, Planells I, Planes A, Pérez T, Andreu A. 2006. Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 24: 483-489.
 40. Morgand M, Vimont S, Bleibtreu A, Boyd A, Vu H, Zahar J, Denamur E, Arlet G. 2014. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* infections in children: Are community-acquired strains different from nosocomial strains?. *Int J Med Microbiol.* 304:970-975.
 41. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. 2013. Microbiología médica. Ed. Elsevier. España. 166-168;260-269.
 42. Navarro C, Mora M, Romero M, Moreno F, Rico A, Ruiz G, Gómez R, Arribas J, Mingorance J, Paño J. 2012. Bacteraemia due to OXA-48-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a major clinical challenge. *Clin Microbiol Infect.* 19: E72-E79.
 43. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández F, Mirelis B. 2011. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 29:524-534.
 44. Neild G. 2003. Urinary tract infection. *Medicine.* 31: 85-90.
 45. Ochman H, Selander K, 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol.* 157:690–693.
 46. Oelschlaeger T, Dobrindt U, Hacker J. 2002. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *Int J Antimicrob Agents.* 19:517-521.
 47. Olson P, Justice S, Hunstad D. 2015. *Escherichia coli* in urinary tract infections. En Sussman M. (comp.), Molecular medical microbiology.1373-1387.
 48. Pérez J, Hanson N. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 40:2153-2162.

49. Pitout J, Laupland K. 2008. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 8:159-66.
50. Prats G. 2012. Microbiología y parasitología médicas. Ed. Medica Panamericana. España. 181-189.
51. Puerta A, Mateos F. 2010. Enterobacterias. *Medicine.* 10: 3426-31.
52. Ronald A. 2002. The etiology of urinary tract infection: Traditional and emerging pathogens. *Am J Med.* 113:14S-19S.
53. Rupp M, Fey P. 2003. Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing Enterobacteriaceae: Considerations for Diagnosis, Prevention and Drug Treatment. *Drugs.* 63: 353-365.
54. Sana T, Rami K, Racha B, Fouad K, Marcel A, Hassan M, Sani H, Monzer H. 2011. Detection of genes TEM, OXA, SHV and CTX-M in 73 clinical isolates of *Escherichia coli* producers of extended spectrum beta-lactamases and determination of their susceptibility to antibiotics. *Arab J Antimicrob Agents.* 1:1-6.
55. Secretaría de Salud. 2001. Panorama Epidemiológico de las infecciones de vías urinarias en México 2003-2008. *Epidemiología.* 51:1-28.
56. Seral C, Pardos M, Castillo, F. 2010. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 28:12-18.
57. Sobel J. 1997. Pathogenesis of urinary tract infection. *Infect Dis Clin.* 11:531-549.
58. Spurbeck R, Mobley H. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli*. En Donnenberg M. (ed.), *Escherichia coli* : Pathotypes and principles of pathogenesis. 275-304.
59. Tenailon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. 2010. The population genetics of comensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 8:207-217.
60. Ulett G, Totsika M, Schaale K, Carey A, Sweet M, Schembri M. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr Opin Microbiol.* 16:100-107.

61. Wiles T, Kulesus R, Mulvey M. 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*. 85:11-19.