



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE MAGISTER EN ANÁLISIS BIOLÓGICO Y
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Caracterización fenotípica y detección de factores de virulencia de *Escherichia coli* BLEE positivo aisladas de muestras provenientes de mujeres adultas con infección del tracto urinario del Hospital Manuel Ygnacio Monteros durante el período marzo-agosto 2017

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTORA: Rivera Quizhpe, Rita Jhomar, Bq.F.

DIRECTORA: Baculima Peña, Daysi Eliana, Mgtr.

CENTRO UNIVERSITARIO LOJA

2018



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2018

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister

Daysi Eliana Baculima Peña

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

Que el presente trabajo de titulación: “Caracterización fenotípica y detección de factores de virulencia de *Escherichia coli* BLEE positivo aisladas de muestras provenientes de mujeres adultas con infección del tracto urinario del Hospital Manuel Ygnacio Monteros durante el período marzo-agosto 2017”, realizado por Rivera Quizhpe Rita Jhomar, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, octubre de 2018.

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Rivera Quizhpe Rita Jhomar declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “Caracterización fenotípica y detección de factores de virulencia de *Escherichia coli* BLEE positivo aisladas de muestras provenientes de mujeres adultas con infección del tracto urinario del Hospital Manuel Ygnacio Monteros durante el período marzo-agosto 2017”, de la Maestría en Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio, siendo Mgtr. Daysi Eliana Baculima Peña directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f)
Autor: Rivera Quizhpe Rita Jhomar
Cédula: 1104439805

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación realizado con mucho esfuerzo, sacrificio y constancia, lo dedico con infinito amor a Dios, por darme la vida y fortaleza en mis tiempos de debilidad.

A mis queridos padres Vismar y Rita, por ser mi pilar fundamental, quienes con amor han edificado mi vida, por estar presente no solo en esta etapa de formación académica, sino en todo momento, ofreciéndome y buscando lo mejor para mi persona, pues ellos son el espejo en el cual me quiero reflejar. Sus virtudes, valores y gran corazón me llevan a admirarlos y amarlos cada día más.

Rita Jhomar

AGRADECIMIENTO

Dios nos ofrece el más maravilloso regalo que es la vida. La educación nos regala la llave del éxito para el futuro y el final de una etapa de formación académica es el inicio de nuevas oportunidades, es por ello que agradezco en primer lugar a Dios, por inspirar mi espíritu para la culminación de este trabajo de investigación.

Mi más sincero e infinito agradecimiento a mis queridos padres, por su comprensión, paciencia, apoyo moral y económico, por sus ejemplos de constancia y perseverancia que los caracteriza y que me han infundado siempre, pero más que nada por su amor incondicional, a ustedes les debo todo.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, por ofrecerme una educación con estándares y criterios de calidad de alto nivel.

A mi directora de tesis Mgtr. Eliana Baculima, por sus valiosos conocimientos impartidos y tiempo brindado en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Rita Jhomar

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	5
1.1 Infección de vías urinarias	6
1.1.1. Concepto.	6
1.1.2. Epidemiología.....	6
1.1.3. Etiología.....	7
1.1.3.1. <i>Escherichia coli</i> uropatógena.....	8
1.1.3.1.1. <i>Patogenia</i>	8
1.1.4. Vías de infección.	9
1.1.4.1. <i>Vía ascendente</i>	9
1.1.4.2. <i>Vía hematológica</i>	9
1.1.5. Factores de riesgo.....	9
1.1.6. Factores de virulencia.	10
1.1.6.1. <i>Adhesinas</i>	12
1.1.6.2. <i>Sideróforos</i>	13
1.1.6.3. <i>Antígenos capsulares</i>	14
1.1.6.4. <i>Toxinas</i>	14
1.1.6.5. <i>Miscellaneous</i>	14
CAPITULO II. OBJETIVOS DEL PROYECTO	16
2.1 Objetivo general del proyecto	17
2.2 Objetivos específicos del proyecto	17

CAPITULO III. MÉTODOS	18
3.1 Tipo de estudio	19
3.2 Recolección de la muestra.....	19
3.3 Confirmación de cepas de <i>Escherichia coli</i>	19
3.2.1. Siembra en medios diferenciales	19
3.2.2. Pruebas bioquímicas.....	20
3.4 Confirmación de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	20
3.5 Conservación de cepas.....	20
3.6 Extracción de ADN.....	20
3.7 Amplificación de regiones genómicas	20
3.8 Análisis estadístico.....	23
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1 Caracterización fenotípica de <i>Escherichia coli</i>	25
4.2 Confirmación de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	27
4.3 Amplificación de genes de virulencia.....	32
4.3.1. Adhesinas.....	32
4.3.2. Sideróforos	34
4.3.3. Cápsula.....	35
4.3.4. Toxinas	37
4.3.5. Miscellaneous.....	38
CONCLUSIONES	41
RECOMENDACIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Principales factores de riesgo asociados a ITU, en mujeres..... 10
- Figura 2.** Principales factores de virulencia de *Escherichia coli* uropatógena..... 11
- Figura 3.** Sistema de adquisición de hierro de *Escherichia coli* uropatógena. 13
- Figura 4. (A) Colonias de *Escherichia coli* en agar EMB.** Se observa el color característico verde metálico. **(B) Colonias de *Escherichia coli* en agar CLED.** Se observan colonias y medio de color amarillo, debido a que *Escherichia coli* fermenta lactosa, por lo tanto, reduce el pH y modifica el color del medio..... 25
- Figura 5. Prueba de sinergia de doble disco positivo para BLEE.** Se observa el efecto sinérgico (distorsión de los halos de inhibición) como indica la flecha, entre los discos CTX, CAZ, ATM, FEP con el disco de AMC. 27
- Figura 6. Representación gráfica en gel de agarosa al 2% de la amplificación de genes *iha*, *papA*, *pap*, *sfaS* en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo. (A) Se observa MP: marcador de peso molecular de 100 pb, B: blanco, CP: Control positivo para *iha* (amplicón de 827 pb), *papA* (amplicón de 720 pb), *pap* (amplicón de 337 pb) y *sfaS* (amplicón de 240 pb), 23, 1, 2: muestras positivas 3: muestra negativa. (B) Amplificación de genes *gafD*, *tsh*, *afa*, *papEF* en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo. Se observa MP: marcador de peso molecular de 100 pb, B: blanco, CP: Control positivo para *gafD* (amplicón de 952 pb), *tsh* (amplicón de 640 pb), *afa* (amplicón de 793 pb) y *papEF* (amplicón de 336 pb), 1: muestra negativa, 2,3,4: muestras positivas..... 32**
- Figura 7. Representación gráfica en gel de agarosa al 2% de la amplificación de genes *fyuA*, *iron*, *iutA* en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo.** Se observa MP: marcador de peso molecular de 100 pb, B: blanco, CP: Control positivo para *fyuA* (amplicón de 880 pb), *iron* (amplicón de 667 pb), *iutA* (amplicón de 302 pb), 12, 13, 28, 30, 1, 2: muestras positivas..... 34
- Figura 8. Representación gráfica en gel de agarosa al 2% de la amplificación de genes *kpsMTII*, *kpsMTIII*, en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo.** Se observa MP: marcador de peso molecular de 100 pb, B: blanco, CP: Control positivo para *kpsMTII* (amplicón de 270 pb) y *kpsMTIII* (amplicón de 392 pb), 1-2: muestras positivas, 3-4: muestras negativas.36
- Figura 9. Representación gráfica en gel de agarosa al 2% de la amplificación del gen *sat* en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo.** Se observa MP: marcador de peso molecular de 100 pb, CP: Control positivo para *sat* (amplicón de 387 pb), 1, 2, 3, 5, 23: muestras positivas para *sat*, 4-22, muestras negativas para *sat*, B: blanco..... 37
- Figura 10. Representación gráfica en gel de agarosa al 2% de la amplificación de genes de *cvaC*, *usp*, *iss*, *traT*, *ibeA* en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo.** Se observa MP: marcador de peso molecular de 100 pb, B: blanco, CP: Control positivo para *cvaC* (amplicón de 677 pb), *usp* (amplicón de 440 pb), *iss* (amplicón de 323 pb), *traT* (amplicón de 290 pb), *ibeA* (amplicón de 170 pb), 28-3-30-23-5: muestras positivas, 1: muestra negativa. 39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes que codifican factores de virulencia presentes en ExPEC.....	11
Tabla 2. Primers empleados para la determinación de los factores de virulencia de <i>Escherichia coli</i> uropatógena.	21
Tabla 3. Condiciones para PCR.....	22
Tabla 4. Caracterización fenotípica de cepas de <i>Escherichia coli</i>	25
Tabla 5. Confirmación de β -lactamasas de espectro extendido.	27
Tabla 6. Porcentaje de cepas de <i>Escherichia coli</i> BLEE positivo con respecto al servicio de salud.....	29
Tabla 7. Frecuencia y porcentaje de cepas de <i>Escherichia coli</i> BLEE positivo según el grupo etario de la población en estudio.....	30
Tabla 8. Frecuencia y porcentaje de genes de virulencia-adhesinas-presentes en cepas de <i>Escherichia coli</i> BLEE positivo.	32
Tabla 9. Frecuencia y porcentaje de genes de virulencia-sideróforos-presentes en cepas de <i>Escherichia coli</i> BLEE positivo.	34
Tabla 10. Frecuencia y porcentaje de genes de virulencia-cápsula-presentes en cepas de <i>Escherichia coli</i> BLEE positivo.	35
Tabla 11. Frecuencia y porcentaje de genes de virulencia-toxinas-presentes en cepas de <i>Escherichia coli</i> BLEE positivo.	37
Tabla 12. Frecuencia y porcentaje de genes de virulencia-miscellaneous-presentes en cepas de <i>Escherichia coli</i> BLEE positivo.	38

ABREVIATURAS

ITU	Infección del tracto urinario
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patógena extraintestinal
IBC	Comunidades Bacterianas Intracelulares
QIR	Reservorios Intracelulares Quiescentes
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
BLEE	Betalactamasa de espectro extendido
CLSI	Clinical and Laboratory Standart Institute
AMC	Amoxicilina con ácido clavulánico
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidime
CTX	Cefotaxime
FEP	Cefepime
LPS	Lipopolisacárido
TAE	Tris-acetato-EDTA
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMB	Agar azul de metileno (Eosin methylene blue)
TSA	Agar Soya Trypticasa

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene como finalidad detectar los genes que codifican los factores de virulencia de *Escherichia coli* BLEE positivo causante de infecciones del tracto urinario en mujeres que acudan al Hospital "Manuel Ygnacio Monteros" durante el período marzo-agosto 2017. Se recolectó un total de 44 cepas, de las cuales 42 (95,45%) correspondieron a *Escherichia coli* cuya identificación se realizó mediante pruebas bioquímicas y siembra en medios CLED (Cysteine Lactose Electrolyte Deficient) y EMB (Eosin Methylene Blue). Posteriormente se confirmó la producción de betalactamasas mediante la prueba de sinergia de doble disco, encontrándose 39 (92,86%) cepas productoras de BLEE. Finalmente se realizó la amplificación de genes de virulencia mediante PCR simple, siendo los más prevalentes en; adhesinas: *papEF* (71,79%), sideróforos: *iutA* (89,74%), cápsula: *kpsMTII* (82,05%), toxinas: *sat* (94,87%), miscellaneous: *ompT* (87,18%). Los resultados indican que la combinación de varios genes implicados en codificar factores de virulencia de *Escherichia coli* se encuentran determinando la patogenicidad de la misma.

PALABRAS CLAVE: *Escherichia coli*, BLEE, ITU, genes, factores de virulencia

ABSTRACT

The following investigation work has as objective to detect the genes that encode the virulence factors of *Escherichia coli* ESBL positive cause of urinary tract infections in women who go to the Hospital "Manuel Ygnacio Monteros" during the period March-August 2017. It was recollected a total of 44 strains, of which 42 (95.45%) corresponded to *Escherichia coli* whose identification was carried out through biochemical tests and sowing in CLED (Cysteine Lactose Electrolyte Deficient) and EMB (Eosin Methylene Blue) media. Subsequently, the production of beta-lactamases was confirmed by the synergy test of double disc, finding 39 (92.86%) ESBL-producing strains. Finally, the amplification of virulence genes was carried out by means of simple PCR, being the most prevalent in; adhesins: *papEF* (71.79%), siderophores: *iutA* (89.74%), capsule: *kpsMTII* (82.05%), toxins: *sat* (94.87%), miscellaneous: *ompT* (87.18%). The results indicate that the combination of several genes involved in coding virulence factors of *Escherichia coli* are determining the pathogenicity of it.

KEYWORDS: *Escherichia coli*, ESBL, UTI, genes, virulence factors.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones del tracto urinario (ITU) constituyen una patología muy habitual en mujeres, no embarazadas, sin comorbilidades, con función renal normal, inmunocompetentes y sin daño anatómico de la vía urinaria (Iannacone & Montoya, 2016), no obstante, en algunos pacientes la infección suele ser asintomática, recurrente o presentar complicaciones graves como pielonefritis (Forbes, Daniel, & Daniel, 2009). Así mismo, se conoce que son la principal causa tanto de infecciones nosocomiales como de infecciones adquiridas en la comunidad (Rendón, Reyes, Rosas, & Rodríguez, 2012). De manera que entre un 70 % a 95 % de las ITU son de inicio comunitario y alrededor del 50 % son de origen nosocomial (Millán, Hernández, Millán, & Araque, 2014).

Se estima que alrededor del 40% de las mujeres y el 12% de los hombres experimentan al menos una infección del tracto urinario durante su vida y cerca del 25% de las mujeres afectadas padecen infecciones recurrentes (Gao et al., 2017), mientras que en el caso de los hombres la incidencia en adultos con un promedio de edad de 50 años es menor al 1%, incrementándose después debido al aumento en el tamaño de la próstata (Iannacone & Montoya, 2016).

Las bacterias que comúnmente causan infecciones del tracto urinario son gram negativas como *Klebsiella spp*, *Proteus spp*, *Enterobacter spp* y *Escherichia coli*, así como también gram positivas (Calderón et al., 2013). Sin embargo, se considera que en este tipo de infecciones son responsables aquellos microorganismos de la microbiota del colon, predominando *Escherichia coli* (Díaz, Acosta, Pérez, & Hernández, 2017), a su vez, en condiciones normales, *Escherichia coli* establece una relación simbiótica con el huésped y cumple un papel importante promoviendo la estabilidad de la microbiota intestinal normal, por el contrario, para producir infecciones debe adaptarse al ambiente del huésped ya sea vejiga, riñón y torrente sanguíneo (Miranda et al., 2015), mientras que los factores de virulencia desempeñan un rol importante en la patogenicidad de la misma, además de los genes relacionados con los sistemas de adquisición de hierro, adhesinas, proteínas y toxinas, es decir esta amplia gama de factores de virulencia contribuyen a la colonización e invasión del huésped, así como también la formación de biofilm, daño tisular, activación de la respuesta inflamatoria y la evasión de la respuesta inmune (Paniagua et al., 2017).

De hecho, se considera que las ITU son una de las infecciones bacterianas más comunes, y representan aproximadamente 150 millones de casos al año en todo el mundo, constituyendo un problema de salud pública (Mann, Mediat, Duggin, Harry, & Bottomley, 2017), lo que

implica altos costos sociales en términos de hospitalización y gastos médicos que pueden llegar hasta USD \$ 6 mil millones en tratamiento cada año (Terlizzi, Gribaudo, & Maffei, 2017). Sin embargo, el tratamiento de las ITU causada por *Escherichia coli* se ha convertido en un desafío clínico serio debido a la presencia cada vez más frecuente de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Blanco et al., 2016) y a la alta frecuencia de infecciones urinarias recurrentes (Soman & Yuxuan, 2015).

A pesar de la importancia de este problema son escasas las publicaciones que describen las bases genéticas que sustentan el potencial virulento de *Escherichia coli* productora de BLEE que circulan en la población de nuestra provincia, así como también no se dispone en la actualidad de datos consolidados que describan la respuesta que, desde los sistemas y políticas de salud se ha dado a esta situación.

Teniendo en cuenta que las cepas de *Escherichia coli* uropatógena poseen una plétora de factores de virulencia que contribuyen a su capacidad de causar enfermedad, es importante identificar y determinar los genes responsables de los factores de virulencia clínicamente relevantes para desarrollar estrategias terapéuticas y profilácticas novedosas que nos permita la reducción de morbilidad y costos en salud asociados con ITU (Sargurunathan Subashchandrabose & Mobley, 2015).

En la presente investigación se realizó la caracterización fenotípica de *Escherichia coli* a través de la siembra en medios diferenciales y pruebas bioquímicas basadas en características metabólicas, así también, la prueba de sinergia de doble disco permitió la confirmación de BLEE y posteriormente se realizó la amplificación de regiones genómicas mediante PCR simple.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Infección de vías urinarias

1.1.1. Concepto.

Las infecciones del tracto urinario (ITU), hacen referencia a toda invasión microbiana del aparato urinario que sobrepasa la capacidad de defensa del individuo afectado (Vallejos, López, Enríquez, & Ramírez, 2010), es decir implica la coexistencia de una serie de microorganismos con número suficiente para causar o no síntomas clínicos (Rendón et al., 2012), sin embargo, la gravedad de la infección varía según el equilibrio entre la cepa bacteriana infectante y las defensas antibacterianas del huésped (Köves & Wullt, 2016).

1.1.2. Epidemiología.

Las ITU, incluidas la cistitis y la pielonefritis, se consideran el segundo tipo más común de infecciones en humanos. Representan entre 150 y 250 millones de casos en todo el mundo por año (Tabasi, Asadi, Habibi, Yekaninejad, & Bouzari, 2015)

No obstante, constituyen una patología muy habitual en mujeres, no embarazadas, sin comorbilidades, con función renal normal, inmunocompetentes y sin daño anatómico de la vía urinaria (Iannacone & Montoya, 2016). Así mismo, se conoce que son la principal causa de infecciones nosocomiales e infecciones adquiridas en la comunidad (Rendón et al., 2012).

Se estima que la tasa de ocurrencia a nivel mundial oscila entre 0,3 y 7,8% en la primera infancia; en la edad escolar se ubica entre el 1 y el 3% para aumentar en la adolescencia con el inicio de la actividad sexual. La presencia de bacteriuria en la edad preescolar y escolar origina un mayor riesgo de presentar una infección del tracto urinario (ITU) en la edad adulta: (Rondón, Rondón, & Orence, 2011) alrededor del 40% de las mujeres y el 12% de los hombres experimentan al menos una infección del tracto urinario durante su vida y cerca del 25% de las mujeres afectadas padecen infecciones recurrentes (Gao et al., 2017), siendo el pico más alto de incidencia entre los 18 y 39 años, mientras que en el caso de los hombres la incidencia en adultos con un promedio de edad de 50 años es menor al 1%, incrementándose después debido al aumento en el tamaño de la próstata (Iannacone & Montoya, 2016). Sin embargo, el tratamiento de las ITU se ha convertido en un desafío clínico serio debido a la creciente incidencia de patógenos resistentes a múltiples fármacos y la alta frecuencia de infecciones urinarias recurrentes (Soman & Yuxuan, 2015).

En Ecuador, según el INEC en el 2016 se reportó que, entre las principales causas de morbilidad ambulatoria, las infecciones del tracto urinario registran el 3,45%, mientras que en

la Zona 7 el 12,21% y específicamente en Loja el 7,76% (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2016).

1.1.3. Etiología.

Las bacterias que comúnmente causan infecciones del tracto urinario están clasificadas como gram negativas: "*Klebsiella spp*, *Proteus spp*, *Enterobacter spp* y *Escherichia coli*" y en menor grado aquellas bacterias catalogadas como gram positivas "*Staphylococcus saprophyticus* y *Streptococcus agalactiae*" (Calderón et al., 2013). No obstante, se considera que en este tipo de infecciones son responsables aquellos microorganismos propios de la microbiota del colon, predominando *Escherichia coli* (Díaz et al., 2017), siendo responsable de casi el 80% de las infecciones agudas no complicadas adquiridas en la comunidad (Robinson, Giarenis, & Cardozo, 2015).

Escherichia coli (*E. coli*) es un bacilo gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* que coloniza el tracto gastrointestinal del recién nacido a las pocas horas de vida y, desde ese momento, huésped y microorganismo obtienen mutuo beneficio (Lösch, Griboglio, Rivas, & Merino, 2015). Sin embargo, las cepas de *E. coli* pueden clasificarse en cuatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) tomando en cuenta características como: sitio de infección, patogenicidad y resistencia a los antimicrobianos (Pasquali et al., 2015). Así, las cepas comensales pertenecientes a los grupos A y B1 son consideradas de bajo poder virulento, constituyen la microbiota fecal y conviven en forma pacífica con el huésped (Pigrau, 2013), mientras que las cepas pertenecientes a los grupos B2 y D, son consideradas patógenas extraintestinales ExPEC que poseen genes que codifican factores de virulencia (Millán et al., 2014) y son los responsables de promover las etapas de: colonización, adherencia, invasión y la evasión de los mecanismos de defensa del huésped, perteneciendo *Escherichia coli* uropatógena al grupo B2, con potencial patogénico en el aparato urinario (Calderón et al., 2013).

Sin embargo, el manejo de las infecciones del tracto urinario (ITU) causadas por *Escherichia coli*, se ha complicado por la presencia cada vez más frecuente de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Pitout, 2012), las cuales son enzimas capaces de hidrolizar o inactivar: penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, oximino-cefalosporinas y aztreonam (Blanco et al., 2016), constituyendo el principal mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en bacilos gramnegativos, sobre todo de *Escherichia coli* (Álvarez, 2010).

No obstante, las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son mediadas por plásmidos, confiriéndoles así una gran capacidad de diseminación entre diferentes especies. A su vez,

las cepas productoras de BLEE pueden presentar resistencia a otros fármacos como los aminoglucósidos, tetraciclinas y trimetoprim/sulfametoxazol como resultado de la co-expresión de otros genes de resistencia (Escalante, Síme, & Díaz, 2013).

A escala mundial, las cepas productoras de BLEE, están ampliamente diseminadas tanto en los hospitales como en la comunidad (Álvarez, 2010) y existen varios factores asociados a la presencia de ITU, tales como: uso irracional de antibióticos de amplio espectro, infecciones recurrentes, hospitalización reciente, nutrición artificial, uso de catéter y hemodiálisis, disminuyendo así las opciones terapéuticas para las infecciones del tracto urinario (ITU) causadas por *Escherichia coli* (Blanco et al., 2016).

Así mismo, en una investigación realizada en Loja por Rivera (2014), identificó que el bacilo gramnegativo implicado con mayor frecuencia en los procesos infecciosos fue *Escherichia coli*, siendo el principal mecanismo de resistencia bacteriana las β -lactamasas de espectro extendido BLEE (71,1%), seguido de carbapenemasas (20%) y β -lactamasas tipo AmpC (15%).

1.1.3.1. *Escherichia coli* uropatógena.

Escherichia coli extraintestinal (ExPEC) abarca un grupo variado de *Escherichia coli* capaz de causar enfermedad principalmente fuera del tracto gastrointestinal, siendo el patotipo primario *Escherichia coli* uropatógena (UPEC). Los UPEC pueden vivir y sobrevivir en el tracto gastrointestinal pero causan enfermedades cuando ingresan al tracto urinario (Poolman, 2017).

1.1.3.1.1. Patogenia.

En condiciones normales, la orina y vías urinarias son estériles, mientras que la uretra distal está colonizada por la microbiota, incluyendo: *Corynebacterias*, *Streptococos*, *Estafilococos*, *Lactobacilos*, etc., pudiendo en ocasiones y de forma transitoria, albergar a otros bacilos Gram negativos (Miranda et al., 2015). Si existe alteración, los uropatógenos que provienen de la microbiota pueden colonizar el área periuretral, ya sea por el uso de antibióticos o por una deficiencia estrogénica posmenopáusica (Sheerin, 2015) y para producir infecciones necesitan adaptarse al ambiente del huésped ya sea vejiga, riñón y torrente sanguíneo (Miranda et al., 2015), por lo tanto el nivel de infección en el tracto urinario depende del tamaño del inóculo, resistencia del huésped y los factores de virulencia (Rondón et al., 2011), que desempeñan un rol importante en la patogenicidad de la misma y contribuyen a la colonización e invasión del huésped, formación de biofilms, daño tisular, activación de la respuesta inflamatoria y la evasión de la respuesta inmune (Paniagua et al., 2017).

1.1.4. Vías de infección.

Los microorganismos potencialmente patógenos, alcanzan el tracto urinario por alguna de las siguientes vías:

1.1.4.1. Vía ascendente.

Es la principal vía de infección, responsable del 95% de los casos (Rondón et al., 2011), en su mayoría causadas por microorganismos patógenos que desde el intestino colonizan la mucosa periuretral (Pigrau, 2013) usando sus adherencias fimbriales hasta llegar a la vejiga y en algunos casos hasta el riñón (Sheerin, 2015) uniéndose a las células epiteliales superficiales en una forma tipo 1 dependiente del pilis (McLellan & Hunstad, 2016). Esta adhesión ayuda al patógeno a competir de manera efectiva con la microbiota propia del huésped y supera otros factores que pueden inhibir que el patógeno se establezca (Curtiss, Meththananda, & Duckett, 2017). Posteriormente se produce la formación de biopelículas y comunidades bacterianas intracelulares (IBC) donde se forman reservorios intracelulares quiescentes (QIR) y residen en el uroepitelio subyacente. Luego, se produce la colonización renal y daño tisular del huésped aumentando el riesgo de bacteriemia/septicemia (Terlizzi et al., 2017).

1.1.4.2. Vía hematógena.

Es la vía de infección menos frecuente, resultando de una bacteriemia prolongada, asociada con una fuente profunda de infección, como la endocarditis. (Walsh & Collyns, 2017). En recién nacidos o en pacientes portadores de sepsis, la infección puede llegar al riñón por vía hematógena y representa el 3% de todos los casos, siendo los principales gérmenes causantes *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Candida* (Rondón et al., 2011).

1.1.5. Factores de riesgo.

La mayoría de las infecciones urinarias ocurren en personas sin anomalías en el tracto urinario, es decir infecciones no complicadas, mientras que las infecciones complicadas implican alteraciones anatómicas o funcionales, constituyéndose en factores predisponentes de infección (Pigrau, 2013). No obstante, la edad, sexo, actividad sexual y falta de higiene, conjuntamente con otros factores anatómicos, metabólicos y genéticos favorecen la infección (Fig. 1) (Walsh & Collyns, 2017).

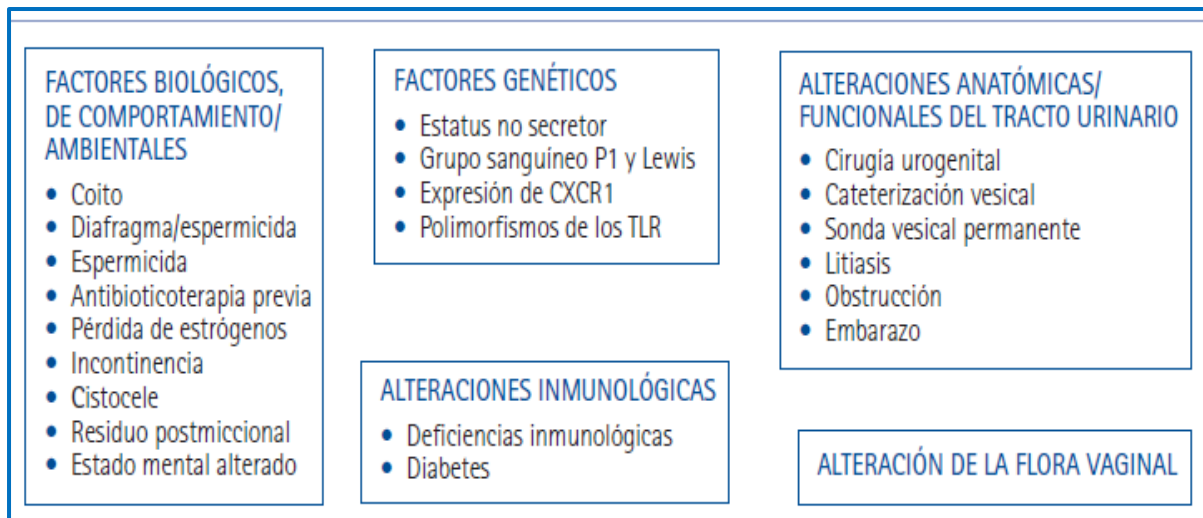


Figura 1. Principales factores de riesgo asociados a ITU, en mujeres.

Fuente: (Pigrau, 2013).

Elaborado por: Autor

1.1.6. Factores de virulencia.

Los factores de virulencia son propiedades que permiten a un microorganismo establecerse sobre un huésped o dentro de él e incrementar su potencial virulento, proporcionando así una medida cuantitativa de la patogenicidad (Rondón et al., 2011) y se mide por el número de microorganismos necesarios para causar una enfermedad. A su vez, estos mecanismos de patogenicidad emergen al superar las defensas del huésped, siendo capaz así el microorganismo de producir daño, a cualquier nivel, en el hospedero susceptible (Cárdenas, Gándara, & Pérez, 2014).

Escherichia coli uropatógena coloniza la vejiga utilizando una gran variedad de factores de virulencia, cuyos genes relacionados con los sistemas de adquisición de hierro (*iroN*, *iutA*, *fyuA*), adhesinas (*fim*, *afa*, *sfa*, *iha*, *tsh*, *papC* y *papA*, *papEF*), proteínas (*kpsMT*, *ompT*, *iss*) y toxinas (*hlyA*, *sat*, *astA*, *vat*, *usp*) desempeñan un papel crítico en la patogénesis de las infecciones del tracto urinario (ITU) (Tabla 1) (Fig. 2) (Paniagua et al., 2017), permitiéndoles así: invadir, colonizar y sobrevivir en el tracto urogenital (Gao et al., 2017). Dichos genes se encuentran en el cromosoma bacteriano agrupados en fragmentos de ADN denominados “islas de patogenicidad” (PAIs), con un tamaño entre 20-200 kb, un contenido G+C y un *codón* distinto al resto del ADN de la bacteria (Pigrau, 2013). Además, las islas de patogenicidad (PAIs) contienen las secuencias de movilidad que se transfieren horizontalmente entre las células bacterianas (Safi et al., 2015).

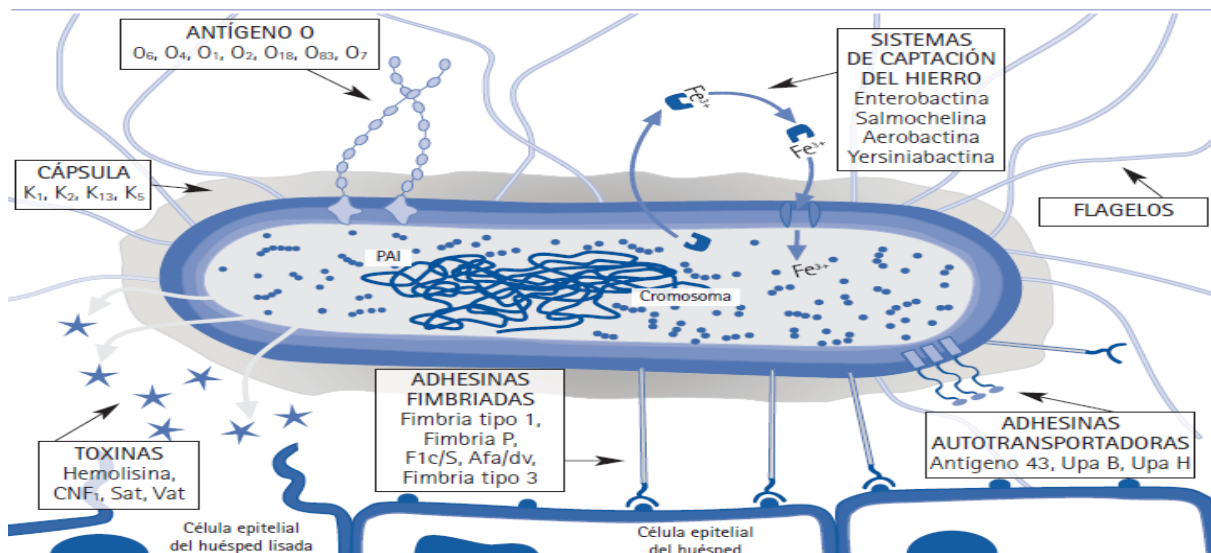


Figura 2. Principales factores de virulencia de *Escherichia coli* uropatógena.

Fuente: (Pigrau, 2013).

Elaborado por: Autor

Tabla 1. Genes que codifican factores de virulencia presentes en ExPEC.

GENES DE VIRULENCIA	
GEN	DESCRIPCIÓN
ADHESINAS	
<i>fimH</i>	Fimbria tipo 1
<i>iha</i>	Genes homólogos adherencia-hierro
<i>papC</i>	Pili asociado con pielonefritis
<i>sfa/foc</i>	Fimbria S/F1
SIDEROFOROS	
<i>fyuA</i>	Receptor yersiniabactin
<i>ireA</i>	Presunto receptor catecolato sideróforo
<i>iroN</i>	Receptor salmochelin
<i>iucD</i>	Síntesis aerobactina
TOXINAS	
<i>hlyA</i>	Hemolisina A
<i>sat</i>	Toxina secretora autotransportadora
<i>vat</i>	Toxina vacuolada autotransportadora

MISCELLANEOUS

<i>iss</i>	Serina proteasa autotransportadora
<i>traT</i>	Proteína de membrana asociada a la resistencia
<i>ompT</i>	Proteína de membrana
<i>usp</i>	Proteína uropatogénica específica

Fuente: Modificado de (Maciel et al., 2017)

Elaborado por: Autor

1.1.6.1. *Adhesinas.*

Una vez que la bacteria penetra en el organismo del huésped, se debe adherir a las células de un tejido y, para ello, cuenta con medios para fijarse en la puerta de entrada (Cárdenas et al., 2014). Siendo su mecanismo común la adhesión de las bacterias a moléculas específicas en la superficie celular del epitelio urotelial seguido por la invasión de éste (Wurgaft, 2010): por lo tanto, la adhesión entre la bacteria y la superficie del tejido del huésped se logra mediante adhesinas o ligandos que se unen específicamente a receptores complementarios de ciertos tejidos del huésped (Cárdenas et al., 2014).

No obstante, la adherencia al epitelio urinario es una etapa crítica en el establecimiento de la infección, ya que permite a los uropatógenos resistir las fuerzas hidrodinámicas del flujo de orina y desencadenar en el huésped y en la bacteria la señal que resulta en inflamación y colonización respectivamente (Pigrau, 2013), mientras que, sin este mecanismo, las bacterias uropatógenas que son electronegativas al igual que el uroepitelio, no podrían adherirse a las células del huésped (Rondón et al., 2011). Así mismo, UPEC utiliza flagelos y mecanismos de adherencia (fimbrias) para moverse y colonizar el tracto urinario respectivamente y evadir los mecanismos de defensa del huésped (Poolman, 2017).

Las fimbrias o pilis están constituidas por unidades de proteínas de forma helicoidal, existen 2 tipos de pilis; los pilis tipo I que se encuentra en *Escherichia coli* tanto patógena y no patógena cumpliendo un papel importante en la ITU, mientras que los pilis tipo II, son los inductores más potentes de inflamación y causan la mayor parte de las pielonefritis agudas (Rondón et al., 2011). Además, los uropatógenos pueden tener de 10 a 200 adhesinas, siendo la fibrilina la proteína estructural de las fimbrias y codificada por el operon (*pap*) (Miranda et al., 2015). Usualmente, los genes *pap A, B, C, D, E, F, G, H, I*, codifican las diferentes proteínas *pap*, siendo la adhesina *papG* fundamental en la patogenia de la infección urinaria alta (Rondón et al., 2011), ya que se une a los glicolípidos ubicados en las células del riñón (Poolman, 2017). Además, se asocia a pielonefritis aguda y presentan tres

variantes moleculares (I, II y III), las mismas que son codificadas por sus correspondientes alelos, sin embargo, la variante II se considera de gran importancia en la producción de pielonefritis (Najafi, 2017).

1.1.6.2. Sideróforos.

Un compuesto muy importante para el crecimiento de las bacterias es el hierro, no obstante, la concentración del mismo en el tracto urinario es baja, por tanto algunas bacterias secretan proteínas llamadas sideróforos con la finalidad de obtener hierro libre (Cárdenas et al., 2014). Los sideróforos son quelantes de hierro férrico de alta afinidad y de bajo peso molecular que participan en la eliminación de hierro férrico y desempeñan un papel importante en la unión del hierro libre para promover la colonización intracelular de UPEC dentro de las células epiteliales urinarias y vesicales (Mann et al., 2017).

Escherichia coli uropatógena (UPEC) expresa: catecolatos enterobactina, salmochelin, hidroxamato aerobactina y yersiniabactina. Sin embargo, las salmolecinas son sideróforos superiores en presencia de albúmina sérica, resultando importante en la patogénesis de ciertas infecciones por *E. coli* y *Salmonella*. Mientras que la aerobactina es un sideróforo hidroxamato producido por la mayoría de las cepas de *E. coli* patógenas, es sintetizado por los productos génicos codificados por *iuc*-ABCD y absorbido por la proteína receptora codificada por *iutA* (Gao et al., 2012). Así mismo, los receptores sideróforos requieren un sistema de adquisición de hierro de alta afinidad como el complejo Citoplasmático *TonB*, que permite la unión y quelación del hierro en la superficie celular para promover su absorción. Sin embargo, las células uroepiteliales, regulan positivamente los genes del receptor de transferrina y de la lipocalina para prevenir la eliminación de hierro bacteriano (Fig. 3) (Terlizzi et al., 2017).

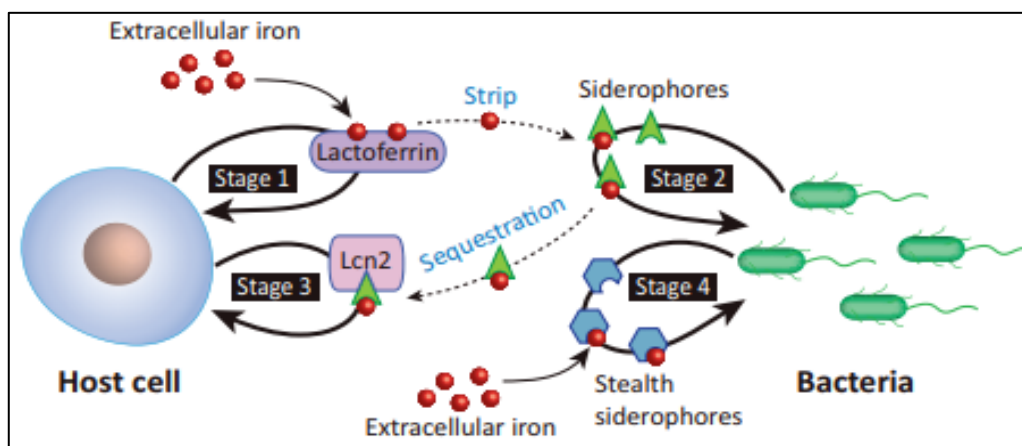


Figura 3. Sistema de adquisición de hierro de *Escherichia coli* uropatógena.

Fuente: (Wilson, Bogdan, Miyazawa, Hashimoto, & Tsuji, 2016)

Elaborado por: Autor

1.1.6.3. Antígenos capsulares.

Algunas bacterias pueden causar daño directo en la superficie de los tejidos, mientras que otros patógenos deben penetrar en el organismo, cuyo proceso es realizado por cápsulas. La cápsula es una red de polímeros compuestas de polisacáridos que forman una capa homogénea alrededor de la bacteria (Cárdenas et al., 2014), cuya función es la protección de UPEC de la respuesta inflamatoria del huésped (Sarkar, Ulett, Totsika, Phan, & Schembri, 2014).

Existen, más de 180 serotipos diferentes del lipopolisacárido bacteriano (LPS), que consiste en una región central de lípidos A conservada y una región de antígeno O variable, los mismos que median la resistencia de UPEC al suero humano. Así mismo, la cápsula de polisacárido de *E. coli* también es muy variable, con más de 80 tipos de cápsulas diferentes descritos y se clasifican genéticamente en cuatro grupos principales. Las cápsulas del grupo 2 compuestas de diferentes antígenos K (por ejemplo, K1, K2, K5 y K100) son comúnmente expresadas por muchas cepas de UPEC y fuertemente asociados a ITU. Los genes implicados en la biosíntesis de las cápsulas del grupo 2 se organizan en tres regiones distintas, Las regiones I (*kpsFEDUCS*) y III (*kpsMT*) se conservan en todos los grupos de genes de la cápsula del grupo 2 y codifican un complejo transmembrana implicado en la exportación y el ensamblaje de los polisacáridos capsulares (Goh et al., 2017).

1.1.6.4. Toxinas.

UPEC expresa toxinas que desempeñan diferentes roles patogénicos durante la infección, las mismas se clasifican en tres tipos: alfa-hemolisina, factor necrosante citotóxico tipo 1 (CNF1) y la toxina autotransportadora secretada (*sat*) (Miranda et al., 2015).

La α -hemolisina está asociada con daño renal y cicatrización, induce oscilaciones de Ca^{2+} en células epiteliales tubulares renales, lo que potencialmente mejora la ascensión y colonización de uréteres y parénquima renal al alterar el flujo normal de orina (Terlizzi et al., 2017). De igual manera, la "toxina formadora de poros" (*hlyA*), se encuentra entre los genes altamente expresados durante el crecimiento de UPEC dentro de las células de la vejiga, igualmente ingresa a la membrana celular del huésped, causando lisis celular, facilitando así la liberación de hierro y nutrientes que son esenciales para el crecimiento bacteriano (Sargurunathan Subashchandrabose & Mobley, 2015). Mientras que la toxina (*sat*) se caracteriza por sus efectos citopáticos en el riñón y la vejiga; esta toxina puede producir vacuolización en el citoplasma de las células uroepiteliales (Miranda et al., 2015).

1.1.6.5. Miscellaneous.

Así mismo, pueden contribuir a la infectividad de *Escherichia coli* otros genes como la proteína específica uropatógena (*usp*) (Siqueira et al., 2009) y la proteína de membrana (*ompT*) cuyos estudios sugieren que participa en la protección contra péptidos catiónicos antimicrobianos secretados en el tracto urinario (Chang et al., 2010). Además, los genes de virulencia implicados en el aumento de la resistencia frente a los antimicrobianos están: la proteína externa de membrana (*traT*), proteína externa de membrana involucrada en la supervivencia al suero (*iss*) y plásmido (*cvaC*); los cuales en conjunto confieren a *Escherichia coli* un aumento en su resistencia frente a los antimicrobianos (Pitout, 2012).

Sin embargo, los factores de virulencia, han experimentado un proceso evolutivo dependiente de la relación patógeno-huésped. A la vez muchos de los avances en el conocimiento de la patogenicidad bacteriana se han debido al desarrollo molecular, farmacológico, bioquímico y genético. No obstante, cuando se ignoran los factores de virulencia antes descritos y los mecanismos de defensa del hospedero, también se desconocen los mecanismos por los cuales podemos combatir a las bacterias. De igual manera el conocimiento acerca de cómo las bacterias provocan daño ha permitido establecer medidas terapéuticas para combatir las en forma oportuna y eficaz (Cárdenas et al., 2014).

CAPITULO II. OBJETIVOS DEL PROYECTO

2.1 Objetivo general del proyecto

- ✓ Determinar la virulencia mediante PCR en cepas de *Escherichia coli* causantes de infecciones del tracto urinario en mujeres que acudan al Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período marzo-agosto 2017.

2.2 Objetivos específicos del proyecto

- ✓ Determinar los genes que codifican los factores de virulencia de *Escherichia coli* productora de betalactamasas referentes a cápsula, adherencia, sideróforos, toxinas y miscellaneous.
- ✓ Proporcionar información epidemiológica sobre la virulencia de *Escherichia coli* productora de betalactamasas y su relación con la edad y atención hospitalaria.

CAPITULO III. MÉTODOS

3.1 Tipo de estudio

Es una investigación de tipo descriptivo, prospectivo de corte transversal, cuyo propósito es determinar la caracterización fenotípica y detección de factores de virulencia de *Escherichia coli* BLEE positiva en mujeres adultas con infección del tracto urinario, documentado mediante cultivo bacteriológico y amplificación de genes, con vistas a caracterizar genotípicamente sus factores de virulencia.

3.2 Recolección de la muestra

Se recolectaron cepas presuntivas de *Escherichia coli* BLEE positivo, identificadas a través del sistema automatizado Vitek 2-compact y aisladas de muestras de orina de mujeres con infección del tracto urinario del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período marzo-agosto 2017.

Los cultivos recolectados fueron aquellos que cumplieron con los siguientes criterios:

- ✓ Criterios de inclusión:
 - Pacientes mujeres adultas que acudan al Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período marzo-agosto 2017, con infección del tracto urinario.
 - Cultivos cuyas cepas aisladas sean *Escherichia coli* BLEE positivo.

- ✓ Criterios de exclusión:
 - Pacientes niñas y hombres con infección del tracto urinario.
 - Pacientes que no acudieron al Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período marzo-agosto 2017.
 - Cultivos cuyas cepas aisladas no sean de *Escherichia coli* BLEE positivo.

3.3 Confirmación de cepas de *Escherichia coli*

Las cepas presuntivas de *Escherichia coli* recolectadas fueron llevadas al laboratorio de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica Particular de Loja para su posterior confirmación.

3.2.1. Siembra en medios diferenciales

Las cepas recolectadas fueron sembradas en placas de agar EMB y CLED de la casa comercial DIPCO, luego se incubaron a 37°C durante 24 horas, observándose crecimiento de colonias color verde metálico y amarillas respectivamente, característico de *Escherichia coli*.

3.2.2. Pruebas bioquímicas

Posteriormente se realizó la identificación de cepas basándose en las características metabólicas de cada una de ellas, mediante pruebas bioquímicas de la casa comercial HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.

3.4 Confirmación de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Para la confirmación del patrón de resistencia BLEE se realizó la prueba de sinergia de doble disco: las cepas en estudio se inocularon en placas de agar Mueller Hinton usando una turbidez equivalente al tubo N° 0,5 de la escala de Mc Farland a una temperatura de 35 ± 2 °C siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI, 2012). Posteriormente, se utilizaron discos de antibióticos específicos para determinar la resistencia: se colocó un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) (20/10 μ g) en el centro de la placa y alrededor, a 25 mm de distancia, un disco de ceftazidime (CAZ) (30 μ g), cefotaxime (CTX) (30 μ g), cefepime (FEP) (30 μ g) y aztreonam (AZT) (30 μ g) de la casa comercial Bioanalyse.

La producción de BLEE se demostró por la ampliación del halo de inhibición o el efecto sinérgico producido entre el cefotaxime (CTX) (30 μ g), ceftazidime (CAZ) (30 μ g), aztreonam (AZT) (30 μ g) y amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) (20/10 μ g).

3.5 Conservación de cepas

Aquellas cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo fueron sembradas en césped en agar Trypticase Soy Agar (TSA) e incubadas durante 24 horas a 37°C. Luego se conservaron por duplicado en 1 ml de LB Broth Base más glicerol de la marca Invitrogen y posteriormente se almacenaron a -20 °C.

3.6 Extracción de ADN

A partir de las cepas conservadas, se procedió a realizar una resiembra en agar TSA de cada una de las muestras y se incubaron a 37°C durante veinticuatro horas. La extracción de ADN se realizó mediante la técnica de Shock Térmico (Marcano, De Jesús, Hernández, & Torres, 2011), para ello se colocó una asada de cada cepa obtenida de cultivos frescos en 300 μ L de Agua Milli-Q en tubos eppendorf, posteriormente se procedió a colocar en baño maría a 96°C durante 5 minutos, transcurrido este tiempo se centrifugó durante dos minutos a 11000 rpm a temperatura ambiente. Seguidamente, se colocó 200 μ L de sobrenadante en nuevos tubos eppendorf, obteniendo así ADN fresco. Finalmente se cuantificó el ADN obtenido, colocando 2 μ L de cada muestra en el NANODROP 2000/2000c.

3.7 Amplificación de regiones genómicas

Se realizó la amplificación de ADN mediante PCR simple utilizando primers de la marca invitrogen descritos en la tabla 2. Se utilizó GoTaq Flexi DNA Polymerase de la marca Promega y se preparó un Mix con los siguientes parámetros: 11,25µL de H₂O bidestilada, 2µL de Cloruro de Magnesio (25mM), 5µL de Reaction Buffer 5x Green GoTaq, 0,5µL de dNTP (10mM), 0,5µL por cada uno de los primers (Forward y Reverse), 0,25 µL de GoTaq Polymerase (5µ/µL) y 5 µL de ADN trabajando con un volumen final de 25 µL. Inmediatamente se procedió a realizar la amplificación utilizando el termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems) cuyas condiciones fueron iguales y se describen en la Tabla 3, variando únicamente los primers y la temperatura de anillamiento específicos para cada gen.

Así mismo, el cálculo de la temperatura de anillamiento se realizó en función del ADN polimerasa utilizada, los primers y la concentración de los primers (5µM) mediante la aplicación Tm calculator de la página www.thermofisher.com, cuyos resultados se describen en la Tabla 2.

Además, se emplearon cepas control otorgadas por el Laboratorio de Referencia de la Universidad Santiago de Compostela, España; a las cuales se les realizó la misma metodología que las cepas en estudio.

Tabla 2. Primers empleados para la determinación de los factores de virulencia de *Escherichia coli* uropatógena.

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'		Tamaño (pb)	*T°	Autor
ADHESINAS						
pap A	PAP A	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG	F	720	57,4	(Wook, Young, Kuk, Kim, & Seok, 2014)
		CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	R			
pap	PAP-3	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	F	336	57,7	(Wook et al., 2014)
	PAP-4	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	R			
papEF	PapEF	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	F	336	57,7	(Wook et al., 2014)
		AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	R			
sfaS	SFA-S	GTGGATACGACGATTACTGTG	F	240	52	(Safi et al., 2015)
		CCGCCAGCATTCCCTGTATTC	R			
afa	AFA	GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC	F	559	59,8	(Wook et al., 2014)
		CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG	R			
gafD	GAFD	TGTTGGACCGTCTCAGGGCTC	F	952	58,9	(Servin & Servin, 2014)
		CTCCCGAACTCGCTGTTACT	R			
iha	Iha	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	F	827	61,6	(Momtaz et al., 2013)
		TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA	R			
tsh	TSH-03	GGTGGTGCCTGGAGTGG	F	640	53,8	(Servin & Servin, 2014)
	TSH-15	AGTCCAGCGTGATAGTGG	R			
TOXINAS						
sat	SAT	ACTGGCGGACTCATGCTGT	F	387	53,7	

AACCTGTAAGAAGACTGAGC

R

(Servin & Servin, 2014)

SIDERÓFOROS

<i>iron</i>	Ironec	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	F	665	58,6	(Momtaz et al., 2013)
		GACGCCGACATTAAGACGCAG	R			
<i>itutA</i>	aer 851	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	F	302	60,4	(Wook et al., 2014)
	aer-1152	CGTCGGGAACGGGTAGAAATCG	R			
<i>fyuA</i>	FyuA	TGATTAACCCCGCGACGGGAA	F	880	56,8	(Wook et al., 2014)
	FyuA	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	R			

CÁPSULA

<i>kpsMT II</i>	KPSII	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	F	270	54,4	(Wook et al., 2014)
		CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	R			
<i>kpsMT III</i>	KPSMTIII	TCCTCTTGCTACTATTCCCCCT	F	392	56,7	(Wook et al., 2014)
		AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC	R			
<i>ompT</i>	OmpT	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	F	559	55,1	(Momtaz et al., 2013)
		CCCGGGTCATAGTGTTCATC	R			

MISCELLANEOUS

<i>cvaC</i>	CVAC	CACACACAAACGGGAGCTGTT	F	680	57,1	(Safi et al., 2015)
		CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	R			
<i>iss</i>	ISS	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	F	309	58,5	(Momtaz et al., 2013)
		AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	R			
<i>traT</i>	TRAT	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	F	290	60,7	(Servin & Servin, 2014)
		CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	R			
<i>ibeA</i>	IBEA 10	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	F	170	64	(Najafi, 2017)
		TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	R			
<i>usp</i>	USP	ACATTCACGGCAAGCCTCAG	F	440	57,9	(Momtaz et al., 2013)
		AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC	R			

* Temperatura de anillamiento calculada mediante la aplicación Tm calculator de la página www.thermofisher.com

Elaborado por: Autor

Tabla 3. Condiciones para PCR.

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Desnaturalización inicial	95°C	2 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	0.5 minutos	
Anillamiento	T °C específica para cada gen	0.5 minutos	35 ciclos
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	1 minuto	1 ciclo
Mantenimiento	4°C	Indefinido	1 ciclo

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

Posteriormente se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados, utilizando TBE (Tris-borate-EDTA) 10X y Gel Red 3X de la marca Invitrogen. Así mismo, se colocó 1,5 µL de marcador de peso molecular de 100 pb de la marca Invitrogen y 3µL de cada amplicón en los pocillos respectivos del gel. Para la migración de ADN se realizó en un buffer de TAE 1X (Tris-acetato-EDTA) de la marca Promega, siendo las condiciones de migración de 120V durante 30 minutos, incluyendo controles positivos para cada gen. Finalmente, las bandas fueron reveladas mediante trasiluminador de UV (Enduro™ GDSTOUCH Labnet).

3.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se efectuó mediante estadística descriptiva, en Excel donde se realizó gráficas y tablas de datos con frecuencias y porcentajes correspondientes. Además, se realizó la prueba del Chi-Cuadrado (χ^2) de Pearson, utilizando el programa SPSS para Windows.

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización fenotípica de *Escherichia coli*

En la presente investigación se recolectó un total de 44 cepas presuntivas de *Escherichia coli* BLEE positivo identificadas mediante el sistema automatizado Vitek 2 compact, cuyas cepas fueron aisladas de muestras de orina de mujeres adultas con infección del tracto urinario que acudieron al Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período marzo-agosto 2017, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 4. Caracterización fenotípica de cepas de *Escherichia coli*.

CEPAS	f	%
<i>Escherichia coli</i>	42	95,45%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	4,55%
TOTAL	44	100%

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

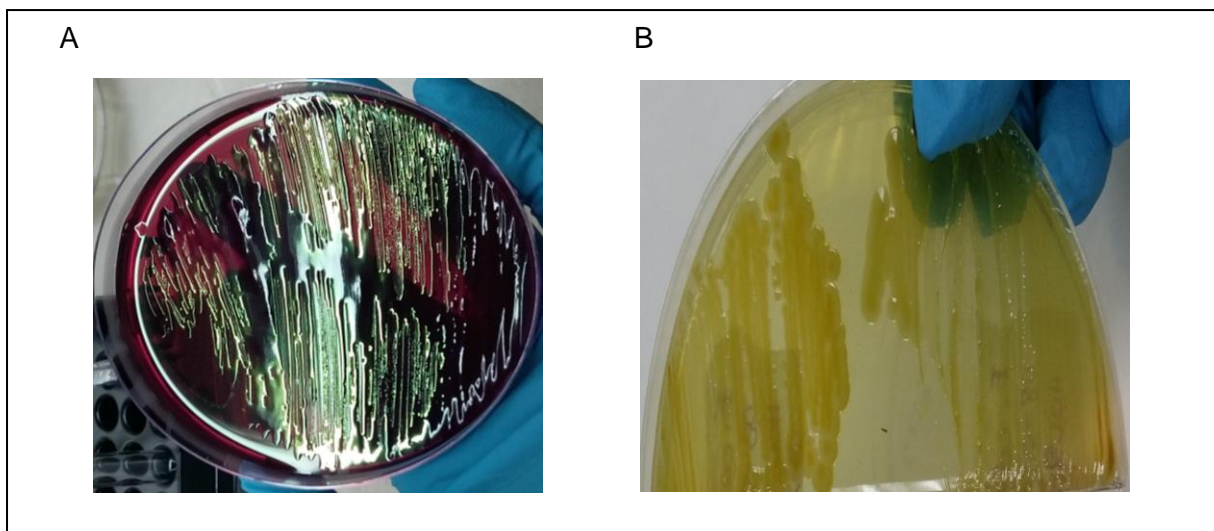


Figura 4. (A) Colonias de *Escherichia coli* en agar EMB. Se observa el color característico verde metálico. (B) Colonias de *Escherichia coli* en agar CLED. Se observan colonias y medio de color amarillo, debido a que *Escherichia coli* fermenta lactosa, por lo tanto, reduce el pH y modifica el color del medio.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

La caracterización de *Escherichia coli* se basó en la observación de las características fenotípicas y metabólicas, luego de la siembra en Agar EMB, CLED y pruebas bioquímicas; tal como se observa en la Figura 4, el color verde metálico y amarillo característico de *Escherichia coli* luego de la siembra en agar EMB y CLED respectivamente.

Así mismo, la tabla 4 nos indica que, del total de cepas recolectadas, el 95,45% (n=42) corresponde a *Escherichia coli*; mientras que el 4,55% (n=2) corresponde a *Klebsiella pneumoniae*. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Hernández et al., (2017), en un estudio realizado sobre infecciones del tracto urinario, en donde reportaron que los microorganismos aislados con mayor frecuencia fueron *Escherichia coli* (88,4%) y *Klebsiella pneumoniae* (4,2%). En Colombia, (Blanco et al., 2016) indicaron que la cepa aislada con mayor frecuencia y la responsable de infecciones del tracto urinario adquirida en la comunidad fue *Escherichia coli* en un 68,5%.

No obstante, en los últimos años en Latinoamérica, la presencia de *Escherichia coli* causante de infecciones del tracto urinario ha sido descrita en diferentes estudios, con prevalencias variables que van desde el 1,7% para países como Argentina, Brasil, Chile, México y Venezuela (Qi, Pilla, Yu, & Reed, 2010). Por su parte, en Estados Unidos y Taiwán se han publicado prevalencias entre el 3 y el 8% (Wu, Chen, Hung, & Ko, 2014).

Es así, que los resultados de la presente investigación demuestran que las infecciones del tracto urinario son causadas principalmente por *Escherichia coli*, así como también por otras bacterias Gram-negativas. Además, es importante mencionar que en la actualidad se ha extendido el uso de analizadores automatizados en microbiología clínica como el VITEK, el cual permite facilitar el manejo de elevados volúmenes de pacientes y reducir significativamente el tiempo de respuesta de los aislamientos en estudio (Ornelas et al., 2017). Sin embargo, Romeu et al., (2010), indicaron que la concordancia en la identificación bacteriana en su trabajo de investigación mediante el sistema VITEK fue de 94,5 % en género y especie, encontrándose 5 resultados discordantes de identificación, no obstante estos errores de identificación pueden estar dados porque no existen marcadas diferencias en la identificación bioquímica de los géneros encontrados, sobre todo entre *Escherichia spp* (Hervé, 2015).

Por lo tanto, de acuerdo con los resultados encontrados en el equipo de identificación bacteriana, éstos deben ser corroborados con alguna otra prueba, sobre todo cuando su importancia terapéutica podría ser relevante. Igualmente, Hernández et al., (2017), considera que los errores presentados por el sistema VITEK, pueden deberse a la falta de estandarización del inóculo. Debido a ello, es de suma importancia que las casas comerciales mantengan programas de software actualizados ya que no existe un sistema que pueda lograr el 100% de identificación de los microorganismos.

Si bien es cierto, las infecciones del tracto urinario han sido ampliamente tratadas con antibióticos betalactámicos (García et al., 2014), sin embargo, las bacterias han logrado adaptarse de mejor manera desarrollando mecanismos de resistencia a los antibióticos

(Navarro, Calvo, Cantón, Fernández, & Mirelis, 2011). Es así que, la resistencia de las bacterias gramnegativas de importancia clínica a los antibacterianos se presenta fundamentalmente en *Escherichia coli* (Casellas, 2011), complicando así la terapia al limitar severamente las opciones de tratamiento. (García et al., 2014).

4.2 Confirmación de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

La producción de BLEE se demostró por la ampliación del halo de inhibición o el efecto sinérgico producido entre el cefotaxime (CTX) (30 μ g), ceftazidime (CAZ) (30 μ g), aztreonam (ATM) (30 μ g), cefepime (FEP) (30 μ g) y ácido clavulánico como se observa en la Figura 4, mientras que aquellas cepas que no presentaron dicho efecto sinérgico (distorsión de los halos de inhibición) fueron descartadas, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 5. Confirmación de β -lactamasas de espectro extendido.

BLEE	f	%
Positivo	39	92,86%
Negativo	3	7,14%
TOTAL	42	100%

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

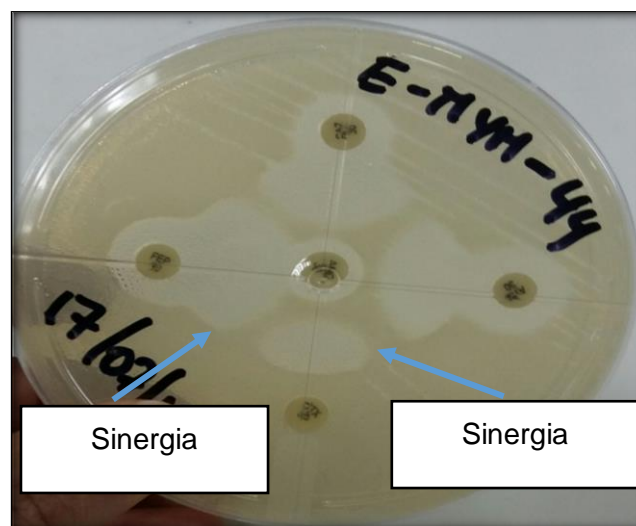


Figura 5. Prueba de sinergia de doble disco positivo para BLEE. Se observa el efecto sinérgico (distorsión de los halos de inhibición) como indica la flecha, entre los discos CTX, CAZ, ATM, FEP con el disco de AMC.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

Se identificó la producción de betalactamasas en *Escherichia coli* en un 92,86% (n=39), mientras que el 7,14% de las cepas no fueron productoras de BLEE (Tabla 5) (Figura 5). Estos resultados concuerdan con los documentados en México por Navarro et al., (2011), en el cual reportaron mayor prevalencia de *Escherichia coli* productora de BLEE (80%). Así mismo, en Perú Adrianzén, Arbizu, Ortiz, & Samalvides, (2013), reportaron que el 81% de cepas de *Escherichia coli* causantes de infecciones del tracto urinario eran productoras de BLEE. Además estudios llevados a cabo en Ecuador, reportaron que el mayor número de cultivos con microorganismos productores de BLEE perteneció a *Escherichia coli* con un 62,5% (Pacheco & León, 2011).

Así mismo, Marcano et al., (2011), en su investigación indicaron que el mecanismo enzimático capaz de hidrolizar betalactámicos de amplio espectro fue el fenotipo BLEE (93,8%), seguido de AmpC reprimido (4,3%) y carbapenemasa (1,9%), en la mayoría de los centros de salud que participaron en la investigación, encontrándose presente estas enzimas en un alto porcentaje en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

Investigaciones en todo el mundo reportan que la producción de betalactamasas es el mecanismo de resistencia bacteriana más importante, confiriendo resistencia principalmente a las enterobacterias frente a los antibióticos betalactámicos de amplio espectro (Acuña, Benadof, Rodríguez, & Herrera, 2011). Cabe destacar que las BLEE se han diseminado peligrosamente en amplias regiones y el éxito de esta diseminación se debe probablemente a que el gen de resistencia (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} entre otros) es frecuentemente transportado en plásmidos auto-transmisibles o móviles, capaces de diseminarse horizontalmente entre e intra especies (Gaitán & Espinal, 2009), es así que, estos plásmidos se dispersan rápido en los ambientes hospitalarios entre las diferentes especies bacterianas. Las BLEE codificadas por estos elementos móviles pueden ser adquiridas por enterobacterias resistentes a múltiples antibióticos como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* (Pérez, Pavas, & Rodríguez, 2011).

No obstante, varios estudios de vigilancia en Europa y América del Norte reportaron que alrededor del 20 al 45% de ExPEC son resistentes a los antibióticos de primera línea, incluidas cefalosporinas, fluoroquinolonas y trimetoprim-sulfametoxazol (Pitout, 2012). Por lo tanto, las opciones terapéuticas para las infecciones del tracto urinario causada por *Escherichia coli* se han reducido progresivamente por la presencia cada vez más frecuente de betalactamasas de espectro extendido (Blanco et al., 2016).

Investigaciones en todo el mundo reconocen que la mayoría de antibióticos suelen estar administrados empíricamente antes de obtener resultados de laboratorio, contribuyendo así

a la aparición de bacterias gramnegativas productoras de BLEE, las mismas que complican la terapia debido a la pérdida de eficacia de los antibióticos. Cabe destacar que el tratamiento antibiótico inadecuado es un predictor de mortalidad en pacientes con bacteriemia de origen urinario (García et al., 2014). Sin duda alguna, las infecciones por microorganismos que tienen este mecanismo de resistencia se han transformado en un problema clínico por asociarse a mayor morbimortalidad, retardo en el inicio de terapia adecuada y altos costos asociados a largas estadias por tratamientos prolongados (Acuña et al., 2011).

Los resultados presentados en este estudio refuerzan la necesidad de hacer un uso racional de antibióticos en especial: betalactámicos, tanto en pacientes hospitalizados como en la comunidad en general, estrategia de la que se esperaría una disminución en el número de bacterias productoras de betalactamasas, considerando que en la actualidad la resistencia a los antibióticos es una de las mayores amenazas para la salud y puede afectar a cualquier persona, sin diferencia de edad ni localización geográfica.

Por otro lado, las cepas de UPEC codifican una serie de factores de virulencia, que permiten a las bacterias colonizar el tracto urinario y persisten frente a la defensa del huésped altamente efectiva. Exhibiendo así un alto grado de diversidad genética debido a la posesión de genes de virulencia especializados, los mismos que se encuentran ubicados en elementos genéticos móviles llamados islas de patogenicidad, pero que además estos factores de virulencia de UPEC son considerados importantes para establecer las infecciones urinarias (Bien, Sokolova, & Bozko, 2012). Son datos interesantes, respaldados desde el punto de vista en que diversos investigadores señalan que las β -lactamasas y los genes de virulencia pueden coexistir en cepas de *Escherichia coli* como resultado de un proceso co-evolutivo gradual (Millán et al., 2014).

Por esta razón, es de vital importancia la investigación de microorganismos que con mayor frecuencia causan estas infecciones en nuestro medio, permitiendo conocer sus patrones de sensibilidad y resistencia microbiana, así como también los genes implicados en los factores de virulencia predominantes, lo cual facilitará la toma de decisiones terapéuticas adecuadas (Subashchandrabose & Mobley, 2015).

Tabla 6. Porcentaje de cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo con respecto al servicio de salud.

Área	f	%
Hospitalización	7	17,95
Consulta externa	32	82,05
TOTAL	39	100

Fuente: Autor
Elaborado por: Autor

De las 39 cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE, el 82,05% correspondieron al área de consulta externa, mientras que el 17,85% a hospitalización (Tabla 6). Estos resultados son consistentes con los documentados por Terlizzi et al., 2017, en el cual indicaron que el 80% de las ITU fueron presentadas en consulta externa. De igual manera, Iannacone & Montoya, 2016, indicaron que del total de cepas investigadas, el 19% fueron de procedencia intrahospitalaria, mientras que las cepas de origen extra hospitalaria superaron en más del 50%.

No obstante, se considera que las ITU constituyen una de las infecciones más frecuentes en atención primaria en salud y en el medio intrahospitalario (Rondón et al., 2011). Por otro lado, investigaciones en todo el mundo han considerado que las ITU son un problema frecuente en adultos en la comunidad, es así que datos reportados indican que un tercio de las visitas a consulta externa lo son por procesos infecciosos, siendo el más frecuente ITU, debido a que este tipo de infecciones son automedicadas, lo que conlleva a un consumo irracional de antibióticos, aumentando por lo tanto el riesgo de padecer infecciones con cepas resistentes (Pigrau, 2013).

Por otro lado, es importante mencionar que aproximadamente el 70-95 % de ITU son de inicio comunitario y alrededor del 50 % son de origen hospitalario (Millán et al., 2014), debido a que en un gran número de pacientes hospitalizados se emplea sondas urinarias, ocasionando la migración de microorganismos patógenos a través del espacio de la sonda y la mucosa de la uretra hasta llegar a la vejiga (Rendón et al., 2012). Sin duda alguna, las ITU se presentan tanto en entornos comunitarios como hospitalarios, siendo en nuestra comunidad más prevalente en consulta externa, pero que además implican tasas significativas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo.

Tabla 7. Frecuencia y porcentaje de cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo según el grupo etario de la población en estudio.

EDAD	f	%
20- 30 años	5	12.5%
31-40 años	7	17.5%
41- 50 años	10	25%
51- 60 años	17	45%
TOTAL	39	100%

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

Del total de cepas recolectadas, se observó que el 45% correspondió a pacientes cuya edad comprende entre los 51-60 años, seguido del 25% en pacientes con edad entre 41-50 años y 17,5% en pacientes con edad entre 31-40 años, mientras que las pacientes con edad comprendida entre 20-30 años presentó menor porcentaje correspondiendo al 12,5% (Tabla 7). La relación entre el área de servicio y el grupo etario no presentó significancia estadística ($p=0,9$).

Son datos interesantes los reportados en la presente investigación y que respaldados desde el punto de vista por diversas investigaciones indican que en pacientes con edad comprendida entre 40-60 años los factores predisponentes para desarrollar ITU comprenden: la cirugía urogenital, la incontinencia urinaria, el cistocele, el residuo postmiccional, ITU en el período premenopáusico y depleción estrogénica, es así que la disminución o ausencia de estrógenos juega claramente un importante papel en la predisposición para desarrollar ITU, ya que aumenta el pH vaginal y altera su ecosistema disminuyendo la población de *Lactobacillus* e incrementando la de *Escherichia coli* (Rondón et al., 2011).

No obstante, Tabasi et al., (2015), en su estudio realizado observaron mayor incidencia de ITU en mujeres con grupo de edad comprendida entre 31-40 años (45,2%), seguido de 51-60 años (29,8%), concluyendo que la incidencia de ITU se correlacionó de gran manera con el nivel socioeconómico, educativo y actividad sexual. Mientras que, Guevara, Machado, & Manrique, 2011, en su investigación encontraron que las ITU afectaron a todos los grupos etarios de la población femenina estudiada.

Sin embargo, diversas investigaciones indican que aproximadamente el 40% de las mujeres desarrollan ITU alguna vez en su vida, siendo más frecuente: en multíparas, en medio socioeconómico bajo y conforme al avance de edad existe mayor predisposición a este tipo de infecciones (Mann et al., 2017).

Cabe destacar que la mayoría de las ITU ocurre en mujeres sin enfermedades de base y sin anomalías funcionales o estructurales del tracto urinario, es así que en el estudio realizado por Pigrau, (2013) se menciona que las mujeres jóvenes que mantienen relaciones sexuales tienen aproximadamente 0,7 episodios de cistitis al año, mientras que las mujeres postmenopáusicas, 0,07 episodios, por lo cual, se calcula que el 50-60% de las mujeres adultas tendrá al menos un episodio de ITU en su vida, siendo el pico de incidencia en mujeres con máxima actividad sexual, de los 18 a los 39 años.

Resultó interesante evidenciar que las edades donde predominan las ITU son variables, esto se debe probablemente a que existen factores de riesgo cambiantes asociados a la infección

no complicada del tracto urinario y que dependen no solo de la edad, sino también de los hábitos de conducta, factores biológicos y ambientales, condiciones fisiológicas y anatómicas del tracto urinario, alteraciones inmunológicas y de ciertos factores genéticos.

4.3 Amplificación de genes de virulencia

Una vez establecidas las cepas válidas para el estudio (n=39) 100%, la amplificación de regiones genómicas se realizó en función de los genes de virulencia mediante PCR simple, obteniendo los siguientes resultados:

4.3.1. Adhesinas

Tabla 8. Frecuencia y porcentaje de genes de virulencia-adhesinas-presentes en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo.

GENES DE VIRULENCIA		
Adhesinas		
	f	%
<i>papEf</i>	28	71,79
<i>papA</i>	25	64,10
<i>pap</i>	22	56,41
<i>iha</i>	23	58,97
<i>tsh</i>	10	25,64
<i>afa</i>	6	15,38
<i>gafD</i>	0	0
<i>sfaS</i>	0	0

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

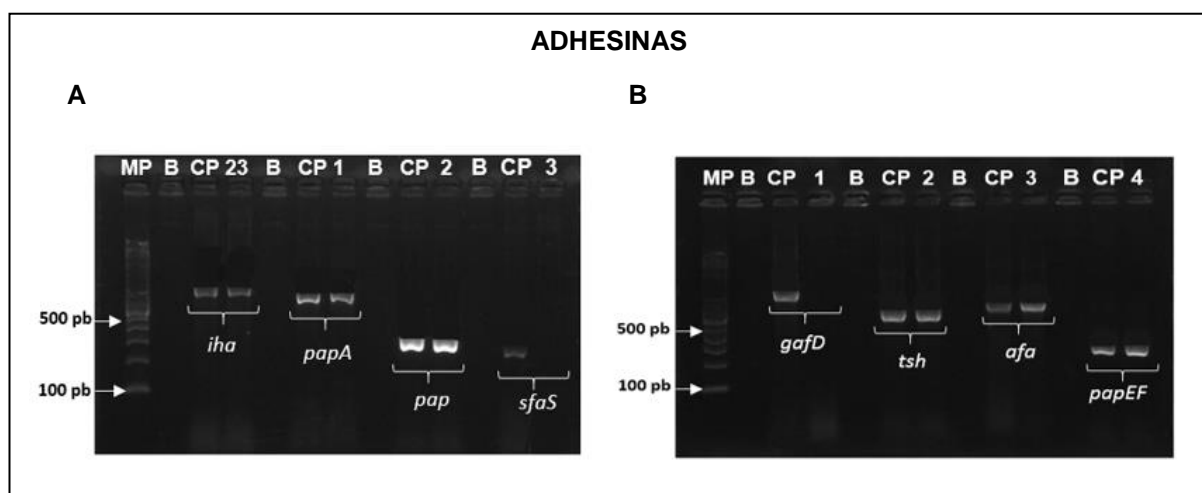


Figura 6. Representación gráfica en gel de agarosa al 2% de la amplificación de genes *iha*, *papA*, *pap*, *sfaS* en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo. (A) Se observa MP: marcador de peso molecular de 100 pb, B: blanco, CP: Control positivo para *iha* (amplificación de 827 pb), *papA* (amplificación de 720 pb), *pap* (amplificación de 337 pb) y *sfaS* (amplificación de 240 pb), 23, 1, 2: muestras positivas 3:

muestra negativa. (B) Amplificación de genes *gafD*, *tsh*, *afa*, *papEF* en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo. Se observa MP: marcador de peso molecular de 100 pb, B: blanco, CP: Control positivo para *gafD* (amplicón de 952 pb), *tsh* (amplicón de 640 pb), *afa* (amplicón de 793 pb) y *papEF* (amplicón de 336 pb), **1: muestra negativa, 2,3,4: muestras positivas.**

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

En la presente investigación se identificó que, de las 39 cepas en estudio, 28 fueron positivas para *papEF* correspondiendo al 71,79%, seguido de *papA* (64,10%), *pap* (56,41%), *iha* (58,97%), *tsh* (25,64%), *afa* (15,38%), mientras que ninguna de las cepas en estudio presentó los genes *gafD* y *sfaS* tal como se detalla en la Tabla 8 y Figura 6. Sin embargo, la relación entre las cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo y los genes que codifican adhesinas presentaron valores estadísticamente significantes ($p=0,01$), mientras que la relación entre genes, área de servicio y grupo etario no presentaron valores estadísticos significativos ($p=0,11$).

Wook et al., (2014), similar a los resultados presentados en este trabajo, también reportaron que el gen de adhesión amplificado con mayor frecuencia fue *papEF* (46%). Sin embargo, en el estudio realizado por Paniagua et al., (2017), reportaron que los genes de adhesión con mayor prevalencia fueron *iha* (64.9%), *fim* (61.3%) y *pap* (24.7%). Por otra parte, Tarchouna, Ferjani, Ben, & Boukadida, (2013) en su estudio mostraron que los genes *pap* y *sfa* estaban presentes en el 41% y 34% de los aislamientos respectivamente, mientras que el gen *afa* se mostró en el 20%. Así mismo, Najafi, (2017), en su investigación demostró que el gen más frecuentemente amplificado fue *papC* correspondiendo al 38.6%, seguido de *afa* (10.7%), *papG* (9.3%) y *sfa/foc* (0.7%).

Además, estudios en todo el mundo han hecho referencia sobre el papel importante que cumplen los genes de adhesión especialmente *pap* en la fisiopatología de pielonefritis causada por *Escherichia coli* (Tarchouna et al., 2013). Sin embargo, pese a ello la frecuencia de *papEF* en cepas aisladas de infecciones del tracto urinario está de acuerdo con datos previamente reportados en otras investigaciones, concordando con los resultados obtenidos en la presente investigación. Por otra parte, en nuestro estudio también se obtuvo un porcentaje significativo del gen de adhesión *iha*, el mismo que ha sido reportado con una alta prevalencia entre las cepas UPEC, presentando el nuevo fenotipo de funcionamiento tanto en adhesión como absorción de hierro, así como también la capacidad que tiene de colonizar vejiga y riñones (Chahales & Thanassi, 2015). Era de esperar esta variación significativa de resultados al compararlos con otros estudios, debido al alto grado de diversidad genética que presenta *Escherichia coli*, pero que además estudios llevados a cabo por Sarkar et al., (2014) indican que esta gran variedad se debe a la posesión de genes de virulencia especializados,

los mismos que se encuentran ubicados en elementos genéticos móviles o en islas de patogenicidad. Así mismo, Millán et al., (2014), concluyen de su estudio que las cepas de UPEC poseen una variedad de determinantes de patogenicidad que hacen posible la colonización e invasión del tracto urinario, siendo los sistemas adhesivos fimbriales los factores de virulencia más comunes y preceden a la expresión de otros productos bacterianos tales como toxinas, sistemas de adquisición de hierro y mecanismos de prevención de defensa del huésped (Paniagua et al., 2017) contribuyendo a la supervivencia de UPEC en un nicho determinado.

4.3.2. Sideróforos

Tabla 9. Frecuencia y porcentaje de genes de virulencia-sideróforos-presentes en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo.

GENES DE VIRULENCIA		
Sideróforos		
	n	%
<i>iutA</i>	35	89,74
<i>fyuA</i>	31	79,49
<i>iroN</i>	15	38,46

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

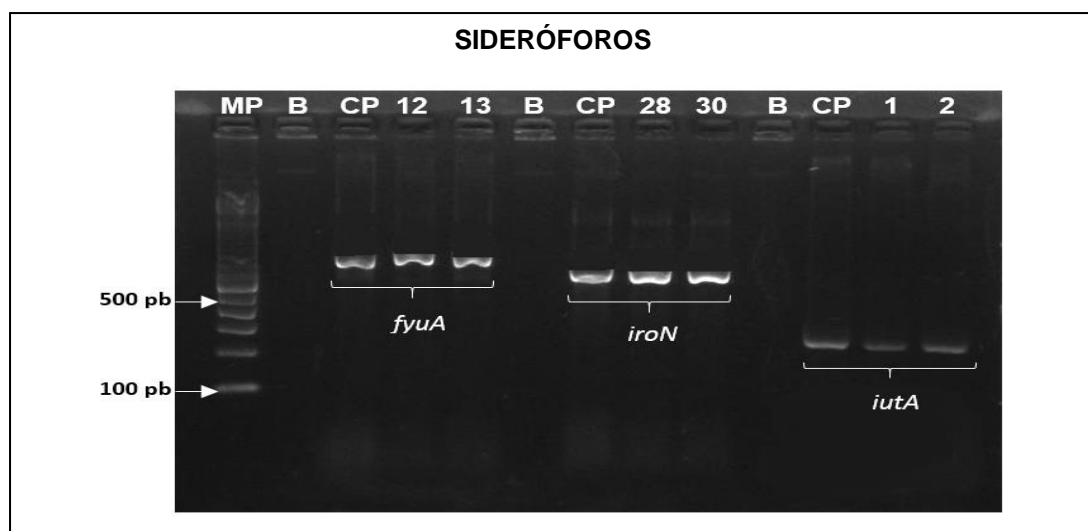


Figura 7. Representación gráfica en gel de agarosa al 2% de la amplificación de genes *fyuA*, *iroN*, *iutA* en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo. Se observa MP: marcador de peso molecular de 100 pb, B: blanco, CP: Control positivo para *fyuA* (amplicón de 880 pb), *iroN* (amplicón de 667 pb), *iutA* (amplicón de 302 pb), 12, 13, 28, 30, 1, 2: muestras positivas.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

Se realizó la amplificación de tres genes responsables de la absorción de hierro (Figura 6), de los cuales el más frecuentemente detectado fue *iutA* correspondiendo al 89,74%, seguido de *fyuA* con el 79,49%, mientras que *iroN* con el 38,46% (Tabla 9) (Figura 7). No obstante, la relación entre las cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo y los genes que codifican sideróforos, son estadísticamente significantes ($p=0,01$).

Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Landagraf et al., (2012), quienes reportaron en su estudio que el gen amplificado con mayor frecuencia fue *iutA*, detectándose en 14 de 37 cepas de UPEC. Miranda et al., (2015) similar a los resultados presentados en este trabajo, también reportaron a *iutA* como el gen de virulencia más comúnmente amplificado. Sin embargo, Lara et al., (2017), detectaron con mayor frecuencia el gen *fyuA* en UPEC. Así mismo, Millán et al., (2014) en su estudio identificaron el gen *fyuA* en un 76,86%.

No obstante, resulta interesante la diferencia de los datos porcentuales reportados en nuestro estudio entre el gen *iutA* y *fyuA* con respecto a otros estudios, siendo estos datos respaldados por otras investigaciones realizadas en todo el mundo y que consideran que los receptores sideróforos *fyuA* (74%) y/o *iutA* (56%) desempeñan un papel importante en la captación de hierro, contribuyendo así a la virulencia y colonización del tracto urinario (Safi et al., 2015).

Debido a que la orina contiene muy poco hierro, las bacterias expresan diferentes sideróforos que eliminan el hierro del medio ambiente para superar la limitación de hierro en el huésped, creando así un sistema efectivo de absorción de hierro (Köves & Wullt, 2016). Es así, que la alta frecuencia de los genes *iutA* y *fyuA* en nuestro estudio se debe a que éstos son factores claves e importantes para mantener una ventaja de supervivencia de UPEC en el tracto urinario.

4.3.3. Cápsula

Tabla 10. Frecuencia y porcentaje de genes de virulencia-cápsula-presentes en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo.

GENES DE VIRULENCIA		
Cápsula		
	n	%
<i>KpsMT II</i>	32	82,05
<i>kpsMT III</i>	0	0

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

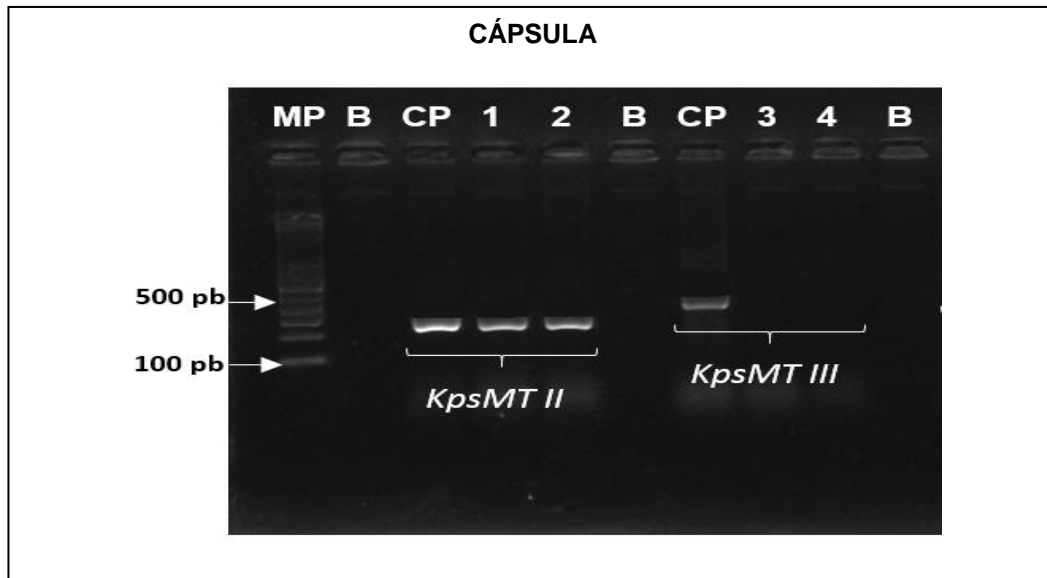


Figura 8. Representación gráfica en gel de agarosa al 2% de la amplificación de genes *kpsMTII*, *kpsMTIII*, en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo. Se observa MP: marcador de peso molecular de 100 pb, B: blanco, CP: Control positivo para *kpsMTII* (amplificación de 270 pb) y *kpsMTIII* (amplificación de 392 pb), 1-2: muestras positivas, 3-4: muestras negativas.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

En el presente estudio se identificó con mayor prevalencia el gen *KpsMT II* con el 82,05%, sin embargo, no se observó amplificación del gen *KpsMT III* en ninguna de las cepas de *Escherichia coli* aisladas en nuestra población (Tabla 10) (Figura 8). La relación entre las cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo y los genes que codifican cápsulas, son estadísticamente significantes ($p=0,01$), mientras que la relación entre genes, área de servicio y grupo etario no presentaron valores estadísticos significativos ($p=0,11$).

Nuestros resultados concuerdan con Yun, Kim, Park, Kim, & Lim, (2014), quienes reportaron que el gen detectado con mayor frecuencia en cepas de UPEC fue *kpsMTII* (81,6%). De igual manera, Paniagua et al., (2017), en su estudio realizado en México indicaron que el 92% de las cepas aisladas de *Escherichia coli* uropatógena fueron positivas para *kpsMT II*.

Al respecto, varios investigadores han mencionado que el gen que codifica la cápsula, *kpsMT II*, es comúnmente prevalente en cepas de UPEC asociadas con pielonefritis que en cepas asociadas con otras ITU (Da Silva, De Mello Santos, & Silva, 2017)

Se ha determinado que los polisacáridos capsulares pueden ser increíblemente diversos no solo por las diferentes unidades de monosacáridos, sino también por como estas unidades están unidas. En el caso de *Escherichia coli* se han descrito casi 80 variedades del antígeno K de acuerdo a sus propiedades serológicas, de los cuales una pequeña fracción están asociados con infecciones invasivas (Mamani, 2014). No obstante, en términos generales, la

cápsula proporciona protección contra la fagocitosis y la muerte mediada por el complemento contribuyendo así a la virulencia de UPEC (Goh et al., 2017).

Igualmente, los resultados obtenidos en el presente estudio destacan que la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* uropatógena producen el tipo de cápsula del grupo II, y por tanto se considera que estos tipos capsulares son altamente heterogéneos y este mimetismo molecular es parte de la estrategia de evasión inmune de *Escherichia coli*.

4.3.4. Toxinas

Tabla 11. Frecuencia y porcentaje de genes de virulencia-toxinas-presentes en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo.

GENES DE VIRULENCIA		
Toxinas		
<i>sat</i>	n	%
	37	94,87

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

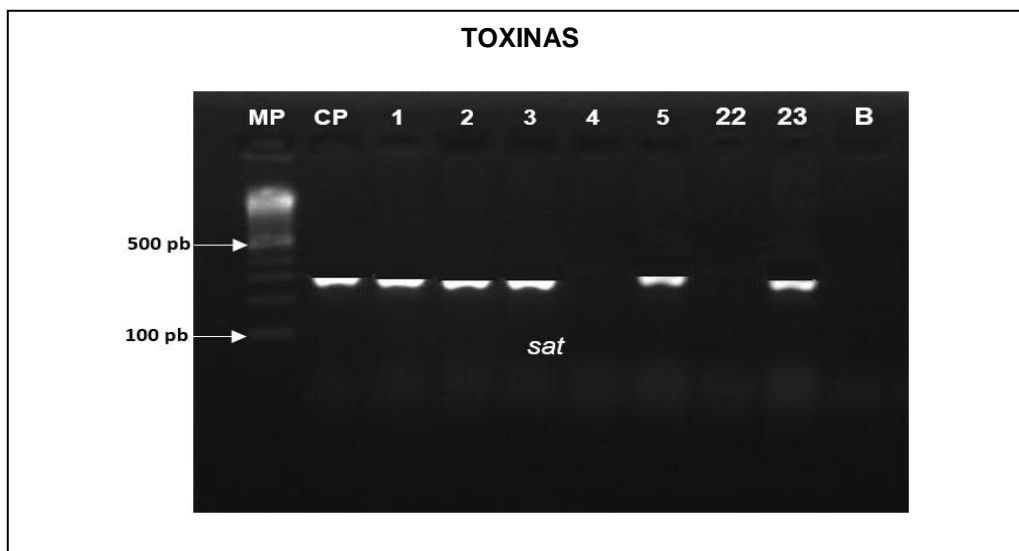


Figura 9. Representación gráfica en gel de agarosa al 2% de la amplificación del gen *sat* en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo. Se observa MP: marcador de peso molecular de 100 pb, CP: Control positivo para *sat* (amplificación de 387 pb), 1, 2, 3, 5, 23: muestras positivas para *sat*, 4-22, muestras negativas para *sat*, B: blanco.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

En el presente estudio se identificó la amplificación del gen *sat* en un gran número de aislados de cepas de *Escherichia coli* (Figura 9), correspondiendo al 94,87% (Tabla 11). El análisis estadístico de la relación entre las cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo y los genes que

codifican toxinas presentaron valores estadístico significativos ($p=0,01$), sin embargo, la relación entre la presencia de genes, edad y área de servicio no presentaron valores estadísticos significativos ($p=0,11$). Resultados mismos que concuerdan con los reportados por Miranda, Ruíz, Molina, & Parra, (2017), quienes indicaron un alto porcentaje de aislamientos del gen *sat* (89,4%) en cepas de *Escherichia coli* uropatógena. Además, Paniagua et al., (2017), según los datos obtenidos en su trabajo concluyeron que, el porcentaje de cepas con genes codificadores de toxina *sat* indica que las cepas aisladas tienen un alto potencial de producir toxinas, concordando con las diferentes frecuencias de prevalencia descritas en otros países.

Es importante recalcar que las toxinas bacterianas promueven la infección al dañar directamente los tejidos del huésped o al deshabilitar el sistema inmune. Muchas cepas de UPEC secretan diferentes toxinas que contribuyen a la supervivencia bacteriana y facilitan las infecciones en el tracto urinario, por lo general *sat* está presente en aproximadamente el 90% de las cepas de UPEC., promoviendo la apoptosis de las células epiteliales de la vejiga y contrarrestando la actividad fagocítica y la quimiotaxis de neutrófilos polimorfonucleares, es así que protege a las bacterias de las defensas del huésped (Köves & Wullt, 2016).

De acuerdo con nuestros resultados, es muy frecuente la prevalencia de *sat* en *Escherichia coli* causante de infecciones del tracto urinario, por ende este hallazgo confirma lo publicado por Bien et al., (2012), quienes hacen referencia que la toxina auto-transportadora secretada (*sat*) es un factor de virulencia muy frecuente en cepas de *Escherichia coli* uropatógena, debido a que el gen *sat* tiene una actividad tóxica contra las líneas celulares de vejiga o de origen renal provocando vacuolización y daño glomerular, por lo tanto, se considera de suma importancia para la patogénesis de las infecciones urinarias.

4.3.5. Miscellaneous

Tabla 12. Frecuencia y porcentaje de genes de virulencia-miscellaneous-presentes en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo.

GENES DE VIRULENCIA		
Miscellaneous		
	n	%
<i>ompT</i>	34	87,18
<i>traT</i>	33	84,62
<i>usp</i>	25	64,10
<i>iss</i>	17	43,59
<i>cvaC</i>	6	15,38
<i>ibeA</i>	0	0

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

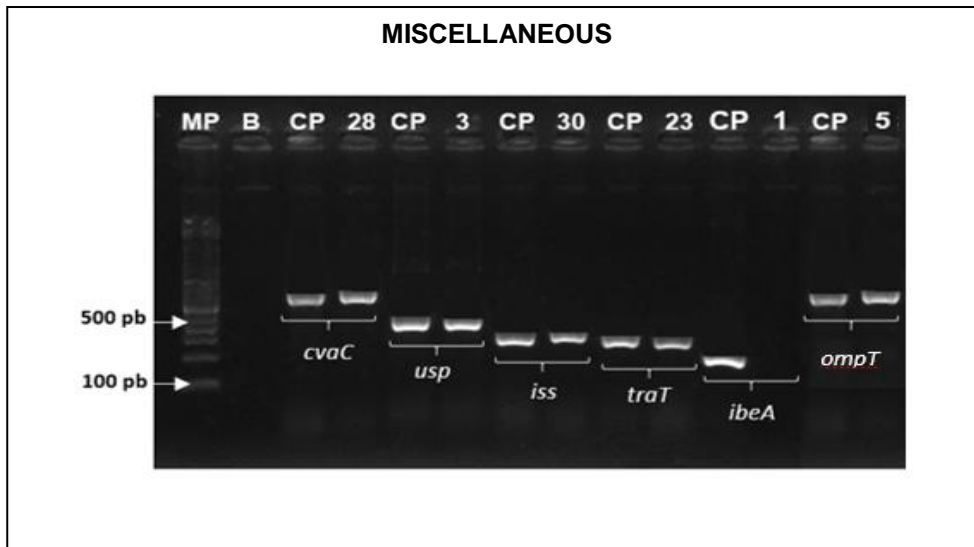


Figura 10. Representación gráfica en gel de agarosa al 2% de la amplificación de genes de *cvaC*, *usp*, *iss*, *traT*, *ibeA* en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo. Se observa MP: marcador de peso molecular de 100 pb, B: blanco, CP: Control positivo para *cvaC* (amplicón de 677 pb), *usp* (amplicón de 440 pb), *iss* (amplicón de 323 pb), *traT* (amplicón de 290 pb), *ibeA* (amplicón de 170 pb), **28-30-23-5: muestras positivas, 1: muestra negativa.**

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

Con respecto a otros genes amplificados en cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo aisladas de muestras de orina se destacó con una alta frecuencia *ompT* en un 87,18%, seguido de *traT* con el 84,62%, *usp* con el 64,10%, *iss* con el 43,59%, finalmente *cvaC* en un 15,38%, mientras que no se observó amplificación del gen *ibeA* en ninguna cepa aislada de nuestra población en estudio (Tabla 12) (Figura 10). La relación entre los genes que codifican el grupo miscellaneous con las cepas de *Escherichia coli* BLEE positivo presentaron valores estadísticos significativos ($p=0,01$).

Resultados similares obtuvieron en su estudio Safi et al., (2015), en donde el gen *ompT* alcanzó una prevalencia del 79%, seguido del gen *usp* y *cvaC* en un 70% y 20% respectivamente. Mientras que, Millán et al., (2014), indicaron que el gen *usp* que codifica la proteína específica uropatógena y que cumple con funciones de bacteriocina, fue encontrado en el 25% de las cepas, por lo que consideran que es probable que su presencia incremente las propiedades virulentas de UPEC. Igualmente, Paniagua et al., (2017), reportaron que entre otros genes de virulencia que se detectaron en cepas de UPEC fue *usp*, el mismo que se ha observado que ocurre con mayor frecuencia en cepas asociadas con pielonefritis. De hecho, se sabe que *usp* se distribuye ampliamente en las cepas de la UPEC y algunos investigadores afirman que podría ser un buen marcador de las mismas.

No obstante, Hui et al., (2010), consideran que *ompT* puede ser la principal, pero no la única, proteasa que confiere resistencia a péptidos catiónicos urinarios al ejercer una degradación de las defensinas en la cara externa de la membrana de *Escherichia coli*, por lo tanto los datos reportados señalan que *ompT* es un componente crucial del arsenal de la bacteria, que actúa como un mecanismo de escape bacteriano del sistema de defensa natural del huésped.

Sin duda alguna, los resultados presentados en este trabajo respaldan los datos publicados en otras investigaciones, en donde señalan que las cepas de *Escherichia coli* que causan infecciones del tracto urinario se han considerado como las bacterias más comunes entre todos los grupos de género y edad en todo el mundo, proporcionando información adicional sobre el papel significativo de los factores de virulencia conocidos y su asociación con las infecciones del tracto urinario.

Resulta interesante evidenciar que los resultados obtenidos en nuestro trabajo, reflejan la heterogeneidad en la distribución de los factores de virulencia y que las cepas de *Escherichia coli* poseen un arsenal de genes que codifican los factores de virulencia determinantes de patogenicidad que hacen posible la colonización e invasión del tracto urinario. Estos determinantes median la presencia de fimbrias, adhesinas, sideróforos, toxinas, formación de cápsula, entre otros. Además, se pudo observar que los factores de virulencia son los predictores más importantes de patogenicidad y que ningún factor de virulencia único puede determinar la condición multifactorial y compleja que tiene el potencial virulento de las cepas de *Escherichia coli* y causar enfermedad específica.

Todavía se requiere de mayores investigaciones, los datos disponibles en nuestra provincia sobre caracterización molecular son limitados, no obstante, es de gran interés ampliar el estudio genético de las cepas de *Escherichia coli* causante de infección del tracto urinario para mejorar nuestro conocimiento sobre determinantes genéticos de virulencia, ayudando a determinar la fisiopatología de estas infecciones para considerar posibles medidas y medios de prevención.

CONCLUSIONES

Posterior al análisis de los resultados obtenidos de la caracterización fenotípica y detección de factores de virulencia de *Escherichia coli* BLEE positivo aisladas de muestras provenientes de mujeres adultas con infección del tracto urinario del Hospital Manuel Ygnacio Monteros durante el período marzo-agosto 2017, se puede concluir lo siguiente:

- ✓ En nuestro medio la prevalencia de infecciones del tracto urinario causada por *Escherichia coli* fue del 95,45% y el 92,86% de estas cepas fueron productoras de β -lactamasas.
- ✓ Se identificó y determinó que las cepas de *Escherichia coli* poseen un arsenal de factores de virulencia, cuyos genes amplificados con mayor frecuencia se encuentran distribuidos de la siguiente manera; adhesinas: *papEF* (71,79%), sideróforos: *iutA* (89,74%), cápsula: *kpsMTII* (82,05%), toxinas: *sat* (94,87%), miscellaneous: *ompT* (87,18%). Por lo tanto, la prevalencia y combinación de varios genes que codifican los factores de virulencia de *Escherichia coli*, sugieren que estas cepas son altamente patógenas y responsables de infecciones del tracto urinario en la población lojana.
- ✓ Las infecciones del tracto urinario causadas por *Escherichia coli* BLEE positivo en nuestra provincia, afecta principalmente a mujeres con una edad comprendida entre los 51 a 60 años con un porcentaje del 45%, siendo el servicio de salud consulta externa el más afectado con una frecuencia del 82,05%.
- ✓ Estos datos proporcionan información científica y veraz, manteniendo actualizado el sistema de vigilancia y control epidemiológico en nuestra ciudad con respecto a las infecciones del tracto urinario. Además, la detección de factores de virulencia es de gran utilidad para profundizar conocimientos acerca de la patogénesis de aislados de *Escherichia coli* uropatógena en nuestro medio, ayudando así en la toma de decisiones en el control, vigilancia y diseño de estrategias de tratamiento de ITU.

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar investigaciones en zonas rurales y urbanas de nuestra provincia incluyendo casos y controles o estudios prospectivos para evaluar los factores de riesgo que conllevan a la adquisición de este tipo de infecciones. Además, generar datos que ayuden a identificar las vías que pueden utilizarse para desarrollar nuevas terapias que permitan reducir la prevalencia de infecciones del tracto urinario (ITU), cuya causa principal es *Escherichia coli*.
- ✓ Ante la variedad de factores que afectan la elección de antibióticos para infecciones del tracto urinario (ITU), es importante diseñar y efectuar medidas de control y vigilancia epidemiológica periódica de tal manera que contribuya a instaurar estrategias de tratamiento adecuado con el fin de reducir índices de resistencia bacteriana emergente.
- ✓ Implementar técnicas moleculares en la práctica clínica, con el fin de asegurar diagnósticos precisos y de calidad. Sin embargo, es importante informar y educar al equipo médico y a los futuros profesionales de salud sobre este tipo de técnicas, indicando sus ventajas y limitaciones, de manera que permita fomentar el desarrollo de equipos multidisciplinarios que en el futuro puedan diseñar, implementar, estandarizar, controlar e interpretar estas herramientas diagnósticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, M., Benadof, D., Rodríguez, P., & Herrera, P. (2011). Antibióticos y expresión de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en agentes bacterémicos. *Revista Chilena de Pediatría*, 82(3), 198–203. <https://doi.org/10.4067/S0370-41062011000300004>
- Adrianzén, D., Arbizu, A., Ortiz, J., & Samalvides, F. (2013). Mortalidad por bacteriemia causada por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. Productoras de betalactamasas de espectro extendido: cohorte retrospectiva en un hospital de Lima, Perú.
- Álvarez, D. (2010). Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias Identification of extended spectrum β -lactamases in enterobacterias. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 99(44), 516–524. Retrieved from <http://scielo.sld.cu>
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International Journal of Nephrology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/681473>
- Blanco, V., Maya, J., Correa, A., Perenguez, M., Muñoz, J., Mota, G., ... Villegas, M. (2016). Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(9), 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.11.017>
- Calderón, E., Casanova, G., Galindo, A., Gutiérrez, P., Landa, S., Moreno, S., ... Valdez, R. (2013). Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. *Boletín Médico Del ...*, 70(1), 3–10. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S166511462013000100003&script=sci_arttext
- Cárdenas, M., Gándara, J., & Pérez, M. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos*, 94, 35–43.
- Casellas, J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 30(6), 519–528. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892011001200004>
- Chahales, P., & Thanassi, D. (2015). Structure, Function, and Assembly of Adhesive

- Organelles by Uropathogenic Bacteria. *Microbiology Spectrum*, 3(5), 1–39. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0018-2013>
- Chang, H., Yan, G., Qui, H., Liang, P., Shu Chi, W., Hong, C., & Sheng He, H. (2010). Escherichia coli outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides. *Microbiology and Immunology*, 54(8), 452–459. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00238.x>
- Curtiss, N., Meththananda, I., & Duckett, J. (2017). Urinary tract infection in obstetrics and gynaecology. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 27(9), 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.ogrm.2017.06.006>
- Da Silva, C., De Mello Santos, A., & Silva, R. (2017). Uropathogenic Escherichia coli pathogenicity islands and other ExPEC virulence genes may contribute to the genome variability of enteroinvasive E. coli, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0979-5>
- Díaz, M., Acosta, B., Pérez, R., & Hernández, E. (2017). Infección del tracto urinario causada por Enterobacteriaceae y su relación con reflujo vésico-ureteral en recién nacidos. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 74(1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.bmhix.2016.10.011>
- Escalante, J., Síme, A., & Díaz, C. (2013). Características clínicas y epidemiológicas en pacientes con infección intrahospitalaria por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Epidemiología*, 17(1), 1–6.
- Forbes, B., Daniel, S., & Daniel, W. (2009). *Diagnóstico Microbiológico*. (E. M. Panamericana, Ed.) (12th ed.).
- Gaitán, S., & Espinal, P. (2009). Caracterización molecular de Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae productores de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 26(29), 239–246. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182009000400006>
- Gao, Q., Wang, X., Xu, H., Xu, Y., Ling, J., Zhang, D., ... Liu, X. (2012). Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic Escherichia coli: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. *BMC Microbiology*, 12(1), 143. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-143>
- Gao, Q., Zhang, D., Ye, Z., Zhu, X., Yang, W., Dong, L., ... Liu, X. (2017). Virulence traits and pathogenicity of uropathogenic Escherichia coli isolates with common and uncommon O

serotypes. *Microbial Pathogenesis*, 104, 217–224.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.027>

García, A., Gimbernat, H., Redondo, C., Arana, D., Cacho, J., & Angulo, J. (2014). Extended-spectrum beta-lactamases in urinary tract infections caused by Enterobacteria: Understanding and guidelines for action. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*, 38(10), 678–684. <https://doi.org/10.1016/j.acuroe.2014.10.008>

Goh, K., Phan, M., Forde, B., Chong, T., Yin, W.-F., Chan, K., ... Schembri, M. (2017). Genome-Wide Discovery of Genes Required for Capsule Production by Uropathogenic *Escherichia coli*. *MBio*, 8(5), e01558-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01558-17>

Guevara, A., Machado, S., & Manrique, E. (2011). Infecciones urinarias adquiridas en la comunidad: Epidemiología, resistencia a los antimicrobianos y opciones terapéuticas. *Kasmera*, 39(2), 87–97.

Hernández, M., López, L., Colín, C., Cerón, G., Ortega, S., Vanegas, S., ... Franco, R. (2017). Original article Comparison of the MicroScan WalkAway and VITEK 2 Compact systems for the identification and susceptibility of clinical Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Revista de Investigación En Discapacidad*, 6(3), 105–114.

Hernández, R., Guillén, E., Bretón, J., Giner, L., Casado, B., Fújková, J., ... Nogueira, J. M. (2017). Infección urinaria febril adquirida en la comunidad por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en niños hospitalizados. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(5), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.01.012>

Hervé, B. (2015). Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico: susceptibilidad new technologies in microbiology: automatization and some applications in microbial identification and susceptibility tests summary. *Revista Clínica Las Condes*, 26(6), 753–763. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.11.004>

Hui, C., Guo, Y., He, Q.-, Peng, L., Wu, S., Cao, H., & Huang, S. (2010). *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides, (July 2009), 452–459. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00238.x>

Iannacone, J., & Montoya, C. (2016). Niveles de Virulencia de cepas de *Escherichia coli* beta-hemolíticas uropatógenas en infecciones intra y extrahospitalarias. *Scintia*, XVII(18), 197–208.

- Köves, B., & Wullt, B. (2016). The Roles of the Host and the Pathogens in Urinary Tract Infections. *European Urology, Supplements*, 15(4), 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.eursup.2016.04.005>
- Landagraf, T., Berlese, A., Freitas, F., Lima, M., Martínez, R., & Panunto, A. (2012). El receptor de aerobactina lutA, una proteína aislada en columna de agarosa, no es esencial para la infección por *Escherichia coli* uropatógena. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 20(2), 07.
- Lara, F., Nery, D., De Oliveira, P., Araujo, M., Carvalho, F., Messias, L., ... Pereira, A. (2017). Virulence markers and phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains with hybrid EAEC/UPEC genotypes recovered from sporadic cases of extraintestinal infections. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00146>
- Lösch, L., Griboglio, M., Rivas, M., & Merino, L. A. (2015). Detección de genes de virulencia del patotipo enteroagregativo en cepas de *Escherichia coli* aisladas de fuentes de agua subterránea de la provincia del Chaco, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.004>
- Maciel, J., Matter, L., Trindade, M., Camillo, G., Lovato, M., de Ávila Botton, S., & Castagna de Vargas, A. (2017). Virulence factors and antimicrobial susceptibility profile of extraintestinal *Escherichia coli* isolated from an avian colisepticemia outbreak. *Microbial Pathogenesis*, 103, 119–122. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.020>
- Mamani, R. (2014). Caracterización Molecular de Cepas de *Escherichia coli* del Grupo Clonal O25b : H4-B2-ST131 y de otros Clones Causantes de Infecciones Extraintestinales en Seres Humanos . Genes de Virulencia y de Resistencia .
- Mann, R., Mediati, D., Duggin, I., Harry, E., & Bottomley, A. (2017). Metabolic Adaptations of Uropathogenic *E. coli* in the Urinary Tract. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(June). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00241>
- Marcano, D., De Jesús, A., Hernández, L., & Torres, L. (2011). Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 30(6), 529–34. <https://doi.org/S1020-49892011001200005> [pii]
- McLellan, L. K., & Hunstad, D. A. (2016). Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends in Molecular Medicine*, 22(11), 946–957. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.09.003>

- 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. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(3), 175–181. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70069-0](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70069-0)
- Miranda, L., Ruíz, M., Molina, J., & Parra, I. (2017). Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México, 35(7), 426–433.
- Miranda, L., Ruíz, M., Molina, J., Parra, I., González, E., & Castro, N. (2015). Relationship between virulence factors, resistance to antibiotics and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* in two locations in Mexico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(xx), 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.021>
- Momtaz, H., Karimian, A., Madani, M., Dehkordi, F. S., & Ranjbar, R. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties.
- Najafi, A. (2017). Distribution of pathogenicity island markers and virulence factors in new phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates.
- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández, F., & Mirelis, B. (2011). Detection of resistance phenotypes in gram-negative bacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2(7), 524–34. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>
- Ornelas, O., Carvallo, C., Castillo, L., Ledezma, M., Ríos, M., Salazar, Y., & Torres, L. (2017). Utilidad del Sistema Automatizado Vitek 2® Compact y los Métodos Fenotípicos para la Detección de Carbapenemasas Tipo KPC, (January 2015).
- Pacheco, M., & León, C. (2011). Epidemiología de las infecciones por microorganismos productores de BLEE en el Hospital Vozandes Quito entre los años 2005-2009. *Revista Médica Vozandes*, 22(1), 15–21.
- Paniagua, G., Hernández, T., Monroy, E., Vaca, F., Díaz, C., Uribe, A., & Vaca, S. (2017). Comprehensive expression analysis of pathogenicity genes in uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Microbial Pathogenesis*, 103, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.008>
- Pasquali, F., Lucchi, A., Braggio, S., Giovanardi, D., Franchini, A., Stonfer, M., & Manfreda,

- G. (2015). Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates of animal and environmental origins from an integrated poultry production chain. *Veterinary Microbiology*, 178(3–4), 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.05.007>
- Pérez, N., Pavas, N., & Rodríguez, E. (2011). Resistencia a los antibióticos en *Escherichia coli* con beta-lactamasas de espectro extendido en un hospital de la Orinoquia colombiana. *Infectio*, 15(3), 147–154. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70078-9](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70078-9)
- Pigrau, C. (2013). *Infección del tracto urinario*. (SALVAT, Ed.). Madrid.
- Pitout, J. (2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 3(JAN), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00009>
- Poolman, J. T. (2017). *Escherichia coli*. *International Encyclopedia of Public Health, Second Edition* (Second Ed., Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00504-X>
- Qi, C., Pilla, V., Yu, J., & Reed, K. (2010). Changing prevalence of *Escherichia coli* with CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in outpatient urinary *E. coli* between 2003 and 2008. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67(1), 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.12.011>
- Rendón, M., Reyes, A., Rosas, J., & Rodríguez, F. (2012). Infecciones de vías urinarias. Patrón de resistencia in vitro de *E. coli* y *E. coli* ESBL a quinolonas, trimetoprima-sulfametoxazoly nitrofurantoína. *Medicina Interna de Mexico*, 28(5), 434–439.
- Rivera, R. (2014). *La Universidad Católica de Loja*.
- Robinson, D., Giarenis, I., & Cardozo, L. (2015). The management of urinary tract infections in octogenarian women. *Maturitas*, 81(3), 343–347. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.04.014>
- Romeu, B., Salazar, P., Navarro, A., Lugo, D., Hernández, U., Rojas, N., & Eslava, C. (2010). Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas . Utility of VITEK system for bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing isolat. *Revista de Ciencias Biológicas CENIC*, 41, 1–9.
- Rondón, M., Rondón, A., & Orence, O. (2011). *Infección del tracto urinario*. (U. de Venezuela,

Ed.) (Primera). Venezuela.

- Safi, M., Achour, W., Baaboura, R., El Fatmi, R., Ben othmen, T., & Ben Hassen, A. (2015). Distribution of virulence associated traits among urine *Escherichia coli* isolates from patients in onco-hematology. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.12.017>
- Sarkar, S., Ulett, G., Totsika, M., Phan, M., & Schembri, M. (2014). Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094786>
- Servin, A. L., & Servin, A. L. (2014). Pathogenesis of Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa / Dr Adhesins (Afa / Dr DAEC): Current Insights and Future Challenges Pathogenesis of Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa / Dr Adhesins (Afa / Dr DAEC): Curr. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-14>
- Sheerin, N. S. (2015). Urinary tract infection. *Medicine*, 43(8), 435–439. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2015.05.007>
- Siqueira, A., Ribeiro, M., Leite, D., Tiba, M., Moura, C., Lopes, M., ... Silva, A. (2009). Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Research in Veterinary Science*, 86(2), 206–210. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.07.018>
- Soman, A., & Yuxuan, M. (2015). The nature of immune responses to urinary tract infections. *Nat Rev Immunol*, 15(10), 655–663. <https://doi.org/10.1016/j.cogdev.2010.08.003.Personal>
- Subashchandrabose, S., & Mobley, H. (2015). Virulence and Fitness Determinant of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.*, 3(4), 1–32. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012.Virulence>
- Subashchandrabose, S., & Mobley, H. (2015). Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum/American Society for Microbiology Press*, 1, 1–20. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012.Correspondence>
- Tabasi, M., Asadi, M., Habibi, M., Yekaninejad, M., & Bouzari, S. (2015). Phenotypic Assays to Determine Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Isolates and their Correlation with Antibiotic Resistance Pattern. *Osong Public Health and Research*

Perspectives, 6(4), 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2015.08.002>

- Tarchouna, M., Ferjani, A., Ben, W., & Boukadida, J. (2013). Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(6), e450–e453. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.01.025>
- Terlizzi, M., Gribaudo, G., & Maffei, M. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: Virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>
- Vallejos, C., López, M., Enríquez, M., & Ramírez, B. (2010). Prevalencia de infecciones de vías urinarias en embarazadas atendidas en el Hospital Universitario de Puebla. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 30(4), 118–122.
- Walsh, C., & Collyns, T. (2017). The pathophysiology of urinary tract infections. *Surgery (Oxford)*, 35(6), 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.03.007>
- Wilson, B., Bogdan, A., Miyazawa, M., Hashimoto, K., & Tsuji, Y. (2016). Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. *Trends in Molecular Medicine*, 22(12), 1077–1090. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.10.005>
- Wook, K., Young, H., Kuk, H., Kim, W., & Seok, I. (2014). ScienceDirect Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 47(6), 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.07.010>
- Wu, Y., Chen, P., Hung, Y., & Ko, W. (2014). Risk factors and clinical impact of levofloxacin or cefazolin nonsusceptibility or ESBL production among uropathogens in adults with community-onset urinary tract infections. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 47(3), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.09.001>
- Wurgaft, A. (2010). Infecciones del tracto urinario. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(4), 629–633. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70579-4](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70579-4)
- Yun, K., Kim, H., Park, H., Kim, W., & Lim, I. (2014). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 47(6), 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.07.010>