



Universidad de los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Postgrado en Microbiología Clínica
Mérida, Venezuela

**GENOTIPIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS FILOGENÉTICOS Y
FACTORES DE VIRULENCIA EN *Escherichia coli* UROPATÓGENA
PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXPANDIDO.**

DONACION

Lcda. Ysheth Millán Gómez

Tutora: Lcda. Beatriz Millán-Mendoza MSc.

Abril, 2013

SERBIULA
Tullio Febres Cordero



Universidad de los Andes

Facultad de Farmacia y Bioanálisis

Postgrado en Microbiología Clínica

Mérida, Venezuela

**GENOTIPIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS FILOGENÉTICOS Y
FACTORES DE VIRULENCIA EN *Escherichia coli* UROPATÓGENA
PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXPANDIDO.**

**Tesis presentada como requisito parcial para optar al grado de Magister
Scientiae en Microbiología mención Clínica.**

Lcda. Ysheth Millán Gómez

Tutora: Lcda. Beatriz Millán-Mendoza MSc.

Abril, 2013

RESUMEN

Genotipificación y distribución de los grupos filogenéticos y factores de virulencia en *Escherichia coli* uropatógena productoras de β -lactamasas de espectro expandido.

Lcda. Ysheth Millán Gómez

Tutora: Lcda. Beatriz Millán-Mendoza MSc.

Escherichia coli es el agente causal del 80% de las infecciones del tracto urinario (ITU), su capacidad patogénica se debe a la presencia de distintos genes de virulencia. Filogenéticamente *E. coli* se clasifica en cuatro grupos A, B1, B2 y D que se obtienen amplificando mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN TspE4.C2. En este trabajo con el objetivo de caracterizar sus grupos filogenéticos y determinar la presencia de factores de virulencia que codifican para la fimbria tipo 1 (*fimH*), fimbria P (*papAH*), la capsula II (*KpsMt II*), sistemas de captación de hierro (*fyuA*), islas de patogenicidad (*PAI*) y proteínas que intervienen en la infectividad (*usp*) se analizaron 30 cepas de *E. coli* uropatógenas (ECUP) productoras de β -lactamasas de espectro expandido aisladas de pacientes con ITU adquiridas en la comunidad. Se diseñó una PCR múltiple para detectar los genes de virulencia *KpsMt II*, *PAI* y *fimH*, mientras que los genes *papAH*, *usp* y *fyuA* fueron amplificados mediante PCRs simples. Las cepas ECUP analizadas, pertenecían indistintamente al grupo filogenético (GF) A y B2 y en menor proporción al grupo D. Los genes de virulencia con mayor prevalencia fueron los genes *fyuA* y *fimH* y el menos frecuente fue el *papAH*. El gen *fyuA* se detectó en los tres GF y hubo diferencias importantes en la prevalencia de los genes *usp* y *KpsMTII* en las cepas de los GF A y B2. Las 29 cepas ECUP que contenían genes *bla_{CTX-M}* se distribuyeron invariablemente en diferentes GF y patrones genotípicos.

DEDICATORIA

Al amor de mi vida, mi esposo! Este triunfo también es tuyo, eres mi apoyo!

A mi futura hija, Lucia Isabela, esto es para ti!

A mi hermosa familia (papi, mami, hermanos y sobrinos), ustedes son parte fundamental en mi vida, sus enseñanzas y alegrías me ayudan a seguir adelante cada día.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme culminar esta meta, su tiempo es perfecto.

A la Lcda. Beatriz Millán-Mendoza MSc por guiarme durante el desarrollo de este trabajo, por sus conocimientos y por ser más que tutora compañera y amiga.

A la Dr. María del Carmen Araque por abrirme las puertas en su laboratorio y darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, gracias por sus orientaciones, fueron muy valiosas.

A la ilustre Universidad de los Andes y mis profesores del postgrado de Microbiología, sus enseñanzas fueron fundamentales para alcanzar este éxito.

Al Laboratorio de Salud Pública del estado Mérida, por ceder parte de las cepas utilizadas en este trabajo de investigación

A mi querido esposo por su amor incondicional, su apoyo en todo momento, por tenerme paciencia en los momentos difíciles. Sin ti no hubiera sido posible!...Te amo!

A mis hermanas Jessica y Paola por ayudarme cuando más lo necesité, gracias por su apoyo, las amo!

A mis compañeras de postgrado por los momentos compartidos, cada una tiene un lugar especial en mi corazón.

A mis compañeros de laboratorio, Indira, David y Fanny por esos momentos de apoyo durante la fase experimental, gracias por sus palabras de aliento, fue grato trabajar con ustedes.

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de los Andes (CDCHT-ULA) por el financiamiento para este proyecto, asignado bajo el código: FA-523-1203EM.

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas.....	x
Índice de figuras.....	xi
Introducción.....	1
Capítulo 1: El problema	
1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Formulación del problema.....	6
1.3 Delimitación del problema.....	7
1.4 Objetivos	
1.4.1 Objetivo general.....	7
1.4.2 Objetivos específicos.....	7
Capítulo 2: Marco teórico	
2.1 Bases teóricas.....	9
2.1.1 Características generales.....	9
2.1.2 Estructura antigénica.....	9
2.1.3 Reservorio.....	11
2.1.4 Patotipos de <i>Escherichia coli</i>	11
2.1.5 Clasificación filogenética.....	13
2.1.6 Factores de virulencia.....	15
2.1.7 Mecanismos de resistencia de <i>Escherichia coli</i> a los antibióticos	
β-lactámicos.....	29
2.1.7.1 Antibióticos β-lactámicos.....	29

2.1.7.2 Mecanismos de resistencia.....	31
2.1.7.3 β -lactamasas.....	34
2.1.7.3.1 β -lactamasas de espectro expandido (BLEE).....	35
2.1.8 Técnicas moleculares.....	39
2.1.8.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	39
2.2 Antecedentes de la hipótesis.....	42
2.3 Hipótesis.....	45
Capítulo 3: Marco metodológico	
3.1 Tipo de estudio.....	46
3.2 Cepas bacterianas.....	46
3.3 Reactivación y reidentificación de las cepas.....	46
3.4 Extracción del ADN genómico.....	47
3.5 Pruebas moleculares.....	47
3.5.1 Determinación de los grupos filogenéticos.....	48
3.5.2 Determinación de los genes de virulencia.....	48
3.6 Visualización de los amplicones.....	49
Capítulo 4: Resultados	
4.1 Reactivación y reidentificación de las cepas.....	53
4.2 Determinación de los grupos filogenéticos mediante la amplificación por PCR de los genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y el fragmento de ADN TspE4.C2.....	53
4.3 Determinación molecular de los genes de virulencia <i>fyuA</i> , <i>fimH</i> , <i>PAI</i> , <i>papAH</i> , <i>usp</i> y <i>KpsMTII</i>	55

4.4 Distribución de los genes de virulencia en los grupos filogenéticos de las cepas ECUP analizadas.....	58
4.5 Perfil de genes de virulencia.....	59
Capítulo 5: Discusión.....	62
Conclusiones.....	68
Recomendaciones.....	70
Referencias bibliográficas.....	71

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tipos de adhesinas de ExPEC.....	17
Tabla 2: Mecanismos evasores de las defensas del hospedero de ExPEC.....	22
Tabla 3: Sistemas de captación de hierro de las ExPEC	24
Tabla 4: Tipos de toxinas secretadas por ExPEC	27
Tabla 5: Clasificación funcional de las β -lactamasas según Bush–Jacoby–Medeiros.....	36
Tabla 6: Cepas utilizadas como control positivo.....	48
Tabla 7: Características de los oligonucleótidos empleados para amplificar los genes de virulencia y los genes utilizados en la agrupación filogenética de ECUP	50
Tabla 8: Condiciones utilizadas en la amplificación por PCR.....	51
Tabla 9: Distribución de los genes de virulencia en los grupos filogenéticos de cepas ECUP.....	58
Tabla 10: Distribución de los perfiles de genes de virulencia en las cepas ECUP.....	60
Tabla 11: Relación de la distribución de los patrones genotípicos, grupos filogenéticos y perfil de BLEE en cepas ECUP.....	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de la pared celular de las bacterias gramnegativas.....	10
Figura 2: Patotipos de <i>E.coli</i>	12
Figura 3: Agrupación filogenética de <i>E. coli</i> de acuerdo a los resultados de la amplificación de los genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y TspE4.C2.....	14
Figura 4: Estructura del operón <i>pap</i>	17
Figura 5: Estructura de la fimbria P.....	18
Figura 6: Estructura del operón <i>fimH</i>	19
Figura 7: Estructura de la fimbria tipo 1.....	20
Figura 8: Organización de los genes del locus <i>ybt</i>	24
Figura 9: Estructura general de una IP.....	29
Figura 10: Estructura de los antibióticos β -lactámicos.....	31
Figura 11: Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos.....	33
Figura 12: Clasificación molecular de las enzimas β -lactamasas según Ambler.....	34
Figura 13: Diagrama metodológico.....	52
Figura 14: Cepas ECUP representantes de los grupos filogenéticos determinados por PCR múltiple.....	54
Figura 15: Distribución de los grupos filogenéticos en cepas ECUP.....	54

Figura 16: PCRs simples y múltiples para determinar genes de virulencia en cepas ECUP..... 56

Figura 17: Distribución del número de genes de virulencia en cepas ECUP..... 57

Figura 18: Distribución de la frecuencia de los diferentes genes de virulencia estudiados en cepas ECUP..... 57

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es un microorganismo gramnegativo, frecuentemente asociado a infecciones extraintestinales como bacteriemia, sepsis adquirida en la comunidad, meningitis neonatal e infecciones del tracto urinario (ITU), también se ha aislado de infecciones intraabdominales, neumonías intrahospitalarias, celulitis e infecciones de heridas. Estas infecciones producen un impacto médico y económico importante ya que aumentan la morbimortalidad y los costos en servicios de salud de la población (Soto,2006; Pitout,2012).

Las infecciones del tracto urinario son las segundas infecciones bacterianas más frecuentes en la población (Moreno y col.,2006), siendo *E. coli* el agente causal del 80% de estas infecciones (Tiba y col.,2008; Starcic-Erjavec y col.,2008). Las ITU son más comunes en mujeres que en hombres debido básicamente a diferencias en la estructura anatómica del tracto genitourinario (Dhakal y col.,2008). Se ha reportado que aproximadamente el 80% de las mujeres mayores de 18 años sufren al menos una infección urinaria al año, de las cuales 60% presentan reinfección y 20% recidivas, ocasionando un alto porcentaje de morbilidad en el género femenino (Montiel y col.,2011). En los hombres la frecuencia de las ITU empiezan a aumentar después de los 50 años, asociándose principalmente a hiperplasias u otros trastornos prostáticos (Pitout,2012).

Estas cepas uropatógenas son un grupo genéticamente heterogéneo, ya que han desarrollado una variedad de factores de virulencia y estrategias que facilitan la colonización, invasión y persistencia dentro del tracto urinario (Tiba y col.,2008; Wiles y col.,2008).

Las diferencias entre las *E. coli* patógenas y comensales se relacionan con los factores de virulencia que esta posea y con sus antecedentes filogenéticos (Moreno y col.,2006), por lo tanto el comportamiento de estos patógenos se puede predecir por el grupo filogenético al cual pertenecen y por el perfil de los factores de virulencia del patógeno (Johnson y Stell,2000).

Por otro lado, las enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro expandido (BLEE) de tipo SHV y TEM, han sido reconocidas desde la década de 1980 como una importante causa de las infecciones nosocomiales. Sin embargo, a finales de los años 1990 y 2000 este grupo de bacterias, principalmente *E. coli* aisladas tanto en la comunidad como en ambientes hospitalarios, producen nuevos tipos de BLEE, como las CTX-M. Este hecho ha ocasionado cambios en las conductas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones causadas por dicho microorganismo (Pitout y col.,2005).

En Venezuela, no existen estudios reportados sobre el contenido y perfil de genes de virulencia distribuidos en cepas ECUP que producen BLEE. En este contexto, en el presente trabajo se evaluó la presencia de factores de virulencia en diferentes grupos filogenéticos de ECUP productoras de BLEE.

CAPÍTULO 1: EL PROBLEMA

1.1 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

E. coli es un bacilo gramnegativo, aerobio y/o anaerobio facultativo, fermentador de la lactosa y oxidasa negativo (Winn y col.,2008; Murray y col.,2009), su reservorio principal es el tracto intestinal de los humanos y animales (Tlba y col.,2008; Wiles y col.,2008; Winn y col., 2008; Murray y col.,2009; Xia y col.,2011; Pitout.,2012). Sin embargo, tiene la habilidad de sobrevivir en el medio ambiente, por lo que con frecuencia se aísla de aguas y alimentos contaminados con materia fecal (Wiles y col.,2008; Vincent y col.,2010; Xia y col., 2011).

E. coli es el patógeno aislado con mayor frecuencia de las infecciones del tracto urinario (ITU) tanto a nivel hospitalario como en la comunidad (Edmody y col.,2003; Takahashi y col.,2006; Ruppé y col.,2009; Pitout,2012). En Estados Unidos las ITU se presentan en el 80% de las mujeres mayores de 18 años, de las cuales un 60% presentan reinfección y 20% recidivas ocasionando un alto porcentaje de morbilidad en el género femenino. Por otra parte, el 15% de los antibióticos prescritos clínicamente son dirigidos para el tratamiento de estas infecciones. Venezuela no escapa de una situación similar, siendo las ITU el motivo más frecuente de consulta en la asistencia primaria en salud. Sin embargo, datos exactos sobre la distribución de ITU y la repercusión de estas infecciones en la calidad de vida de la población no se han publicado (Montiel y col.,2011).

El origen de las ITU por *E. coli* comúnmente es la flora normal del tracto intestinal del propio paciente. Sin embargo, no todos los clones de *E. coli* presentes en el

intestino grueso tienen capacidad de iniciar y mantener el proceso infeccioso en el tracto urinario, ya que esto depende de varios factores, entre ellos: las condiciones predisponentes del paciente y los factores de virulencia que posea la bacteria. Estos factores le permiten a *E. coli* colonizar selectivamente el uroepitelio mucoso, producir una reacción inflamatoria y eventualmente ascender desde las vías urinarias inferiores a las cavidades renales superiores (Edmody y col.,2003; Wiles y col., 2008; Bien y col.,2012; Pitout,2012).

Algunos de los factores de virulencia asociados a ECUP, incluyen: adhesinas de las fimbrias P (*pap*) o tipo 1 (*fimH*); sideróforos como la yersiniabactina (*fyuA*); grupos capsulares como el grupo II (*KpsMT II*) y proteínas uro-específicas (*usp*) (Kuhnert y col.,2000; Nakano y col.,2001; Edmody y col.,2003; Tiba y col.,2008; Wiles y col.,2008; Pitout,2012). Los genes que codifican estos factores de virulencia están frecuentemente localizados en grandes bloques genéticos llamados islas de patogenicidad (IP) que se insertan en el cromosoma bacteriano, las cuales también pueden contener genes relacionados con resistencia a los antibióticos (Kuhnert y col.,2000; Pitout, 2012).

Los aislados de *E. coli* se clasifican en cuatro principales grupos filogenéticos: A; B1; B2 y D (Herzer y col.,1990), actualmente esta clasificación se fundamenta en la detección por PCR múltiple de los genes *chuA* (279 pb), *yjaA* (211 pb) y el fragmento de ADN TspE4.C2 (152 pb) (Clermont y col.,2000). Se ha observado que la mayoría de las cepas comensales pertenecen al grupo A y B1, mientras que las cepas causantes de infecciones extraintestinales, incluyendo las ECUP están en los grupos filogenéticos B2 y en menor proporción en el grupo D (Clermont y

col.,2000; Xia y col.,2011; Pitout,2012). Sin embargo, en algunas ocasiones las cepas del grupo A y B1 han sido responsable de infecciones extraintestinales (Moreno y col.,2006).

De igual manera las cepas de los grupos B2 y D presentan más agrupaciones de genes de virulencia que las cepas de los grupos A y B1 (Soto,2006). Moreno y col. en el 2006, reportan que en promedio las cepas del grupo B2 presentaron 8,8 factores de virulencia, las cepas del grupo D 5,3; mientras que las cepas de los grupos A y B1 solo 3,5 factores de virulencia.

Se ha demostrado que las cepas ECUP comparten propiedades similares en términos de filogenia y de algunos factores de virulencia. Takahashi y col. en el 2006, reportaron que el 95% de las cepas ECUP hospitalarias estudiadas, contenían el gen *fimH* y el 82% el gen *fyuA*. Sin embargo, Graham y col. (2001), encontraron que el gen *pap* estuvo presente en el 30% de las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con bacteriuria y en el 60% de las ECUP provenientes de pacientes con cistitis, ambas adquiridas en la comunidad.

Por otra parte, uno de los mecanismos de resistencia de mayor importancia presentes en *E. coli*, es la producción de β -lactamasas de espectro expandido (BLEE), las cuales son capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos, ocasionando una reducción de las posibilidades terapéuticas y por consiguiente, el aumento de la morbimortalidad en pacientes con infecciones por dicha bacteria (Cortés y col.,2006; Ruppé y col.,2009; Pitout,2012). Este panorama se ve agravado por el hecho de que las cepas de *E. coli* productoras de BLEE, a pesar de estar tradicionalmente asociadas a infecciones hospitalarias, en los

últimos años se han aislado con mayor frecuencia en ITU adquiridas en la comunidad (ITU-com) (Ruppé y col.,2009).

Debido a que el comportamiento de estos patógenos se puede predecir tanto por el perfil de los factores de virulencia, como por los antecedentes filogenéticos y marcadores de resistencia de la bacteria, es importante conocer la distribución de dichas características en los diferentes patotipos de *E. coli* y en poblaciones de estudio definidas, permitiendo así intervenir en la prevención de las infecciones extraintestinales ocasionadas por *E. coli* (Johnson y Stell,2000).

La situación sobre la distribución de los grupos filogenéticos y de los genes de virulencia en las cepas ECUP que circulan en nuestra comunidad no se conoce, por lo tanto en este estudio se presenta la caracterización molecular de los grupos filogenéticos y genes de virulencia de una colección de cepas ECUP productoras de BLEE, aisladas de pacientes de la comunidad con infecciones del tracto urinario.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuáles son los grupos filogenéticos y su asociación con los genes de virulencia presentes en una colección de cepas de *E. coli* uropatógenas productoras de BLEE, aisladas de pacientes con infecciones urinarias adquiridas en la comunidad en el área urbana de Mérida?

1.3 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Los grupos filogenéticos y los genes de virulencia se estudiaron en una colección de 30 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, aisladas durante los años 2009-2011 provenientes de pacientes con infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad, que residen en el área urbana de Mérida, Venezuela.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo general:

Caracterizar genéticamente los grupos filogenéticos y los factores de virulencia de una colección de cepas de *E. coli* uropatógenas productoras de β -lactamasa de espectro expandido, aisladas de pacientes que residen en el área urbana de Mérida, Venezuela.

1.4.2 Objetivos específicos:

1.- Determinar los grupos filogenéticos mediante la técnica de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN TspE4.C2, en una colección de cepas de *E. coli* uropatógenas productoras de BLEE, aisladas de pacientes que residen en el área urbana de Mérida, Venezuela.

2.- Detectar molecularmente mediante la amplificación por PCR de los genes de virulencia *fimH*, *papAH*, *KpsMT II*, *usp*, *fyuA* y *PAI* en la colección de cepas anteriormente descritas.

3.- Asociar los grupos filogenéticos con los genes de virulencia, encontrados en dicha colección.

4.- Establecer el perfil de genes de virulencia y grupos filogenéticos distribuidos en cepas ECUP productoras de BLEE.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1- Bases teóricas

2.1.1.-CARACTERÍSTICAS GENERALES

E. coli fue descrita por primera vez en 1885 por Theodor Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente se le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor (Kuhnert y col.,2000).

Taxonómicamente *E. coli* pertenece al Dominio: *Bacteria*, Phylum: *Proteobacteria*, Clase: *Gammaproteobacteria*, Orden: *Enterobacteriales*, Familia: *Enterobacteriaceae*, Género: *Escherichia* (ITIS,2012; NCBI-Taxo,2012).

E. coli es un bacilo gramnegativo, capaz de crecer en medios simples, es aerobio y/o anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos, en algunos casos inmóvil, posee fimbrias o pili, algunas cepas producen microcápsulas y otras producen macrocápsulas, no forma esporas, son catalasa positiva, oxidasa negativa, produce indol a partir de triptófano, descarboxila la lisina, produce ácido y gas a partir de glucosa, lactosa y manitol, reduce el nitrato a nitrito y son negativas a la reacción de Voges-Proskauer, ureasa, fenilalanina desaminasa y citrato (Winn y col.,2008; Murray y col.,2009).

2.1.2.-ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

La pared celular de *E. coli* es delgada y compleja, consta de una membrana externa, el espacio periplásmico y una fina capa interna de peptidoglicano (Figura 1) (Kuhnert y col.,2000; Marín y Gudial,2003; Winn y col.,2008; Murray y col.,2009). La

membrana externa está compuesta por una doble capa de fosfolípidos y una de lipopolisacaridos. Estos últimos a su vez están formados por dos elementos importantes: El lípido "A" conocido como endotoxina y el polisacárido "O" conocido como antígeno somático "O", el cual junto con el antígeno flagelar "H" en las cepas móviles y el antígeno capsular "K" en las cepas que la producen, son los tres elementos que establecen la estructura antigénica de *E. coli* y su clasificación serotípica, la cual en ocasiones puede asociarse a un cuadro clínico en particular (Kuhnert y col.,2000; Wiles y col.,2008; Winn y col.,2008; Murray y col.,2009).

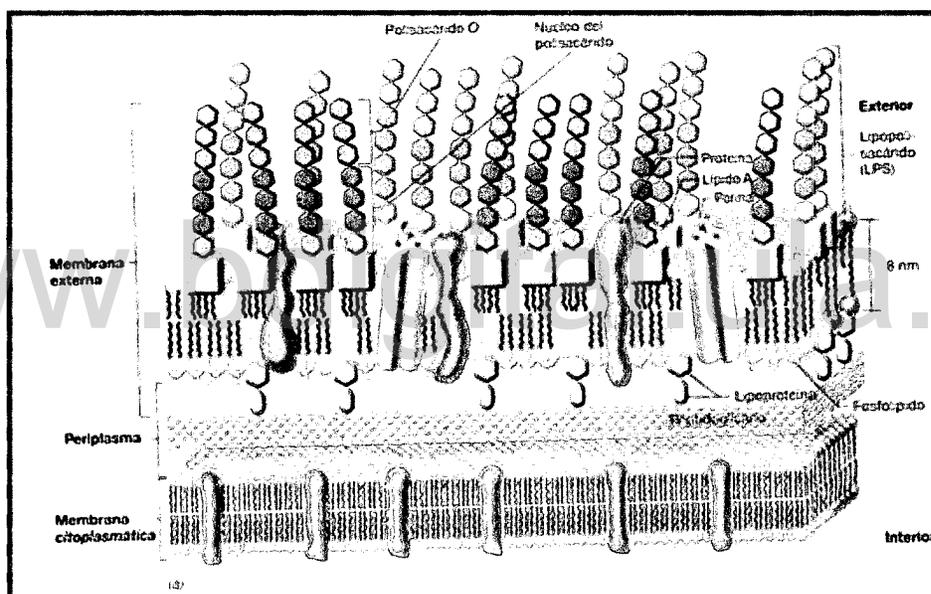


Figura 1: Estructura de la pared celular de las bacterias gramnegativas. Tomado de: Sánchez, M. (2011).

La aglutinación con antisueros específicos, es la técnica utilizada para la clasificación antigénica. Basado en esto, en la actualidad se han descrito más de 176 variantes del antígeno O, 75 del antígeno H y 102 del K. Se ha reportado que los antígenos O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25 y O75 son los más

frecuentes entre las ECUP, mientras que los antígenos específicos K y H no tienen un patrón definido de su distribución (Takahashi y col.,2006; Wiles y col.,2008).

2.1.3.-RESERVORIO

El principal reservorio de *E. coli* es el tracto intestinal de los seres humanos, a partir de allí expresan diversos factores de virulencia para colonizar e infectar el tracto urinario en forma ascendente (Tiba y col.,2008; Wiles y col.,2008; Winn y col.,2008; Murray y col.,2009; Xia y col.,2011; Pitout,2012). Estas cepas, tienen la habilidad de sobrevivir en el medio ambiente, por lo tanto se aíslan con frecuencia de aguas y alimentos contaminados con materia fecal (Vincent y col.,2010; Xia y col.,2011).

2.1.4.-PATOTIPOS DE *Escherichia coli*

Los aislados de *E. coli* incluyen cepas no patógenas comensales y cepas altamente patógenas capaces de producir diferentes enfermedades como por ejemplo ITU, infecciones intestinales, neumonías nosocomiales, peritonitis, bacteremias, celulitis, meningitis neonatal, entre otras (Kuhnert y col.,2000; Moreno y col.,2006; Soto,2006; Wiles y col.,2008; Xia y col.,2011; Pitout, 2012). Además existen cepas biológicas de contención derivadas del aislado de *E. coli* K12 que son incapaces de colonizar o sobrevivir en el medio ambiente y son utilizadas en los procesos industriales y de investigación en los laboratorios (Kuhnert y col.,2000; Wiles y col.,2008) (Figura 2).

Las cepas consideradas patógenas se han clasificado en dos grandes categorías: los agentes patógenos entéricos causantes de diversos cuadros diarreicos en humanos conocidas como *E. coli* diarreogénicas y las cepas extraintestinales

conocidas como ExPEC (Extraintestinal pathogenic *E. coli*), que causan infecciones del tracto urinario, sepsis y meningitis (Kuhnert y col.,2000; Soto,2006; Wiles y col.,2008; Xia y col.,2011; Pitout,2012).

A su vez, las cepas patógenas entéricas de *E. coli* se han clasificado de manera general en seis patotipos: *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) (Kuhnert y col.,2000).

En cuanto a las cepas de ExPEC se conocen diferentes patotipos de acuerdo al síndrome específico que causan, entre ellas las *E. coli* asociadas a meningitis neonatal (ECMN), las *E. coli* asociadas a sepsis (ECSEP) y las *E. coli* uropatógenas (ECUP). Estas cepas comparten muchos factores de virulencia, además algunos clones pueden causar varios tipos de infección (Kuhnert y col.,2000; Nakano y col.,2001).

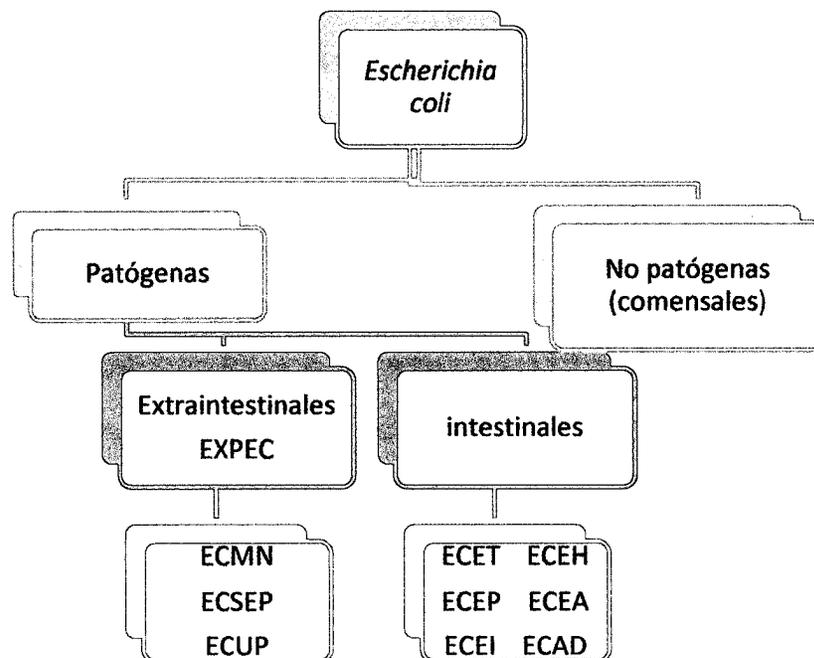


Figura 2: Patotipos de *E. coli*.

Entre los cuadros clínicos que producen las ECUP están: bacteriuria asintomática, cistitis y pielonefritis severa; además son responsables del 70-95% de las ITU adquiridas en la comunidad y el 50% de las ITU nosocomiales (Wiles y col.,2008; Tiba y col.,2008; Pitout,2012).

2.1.5.-CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA:

El análisis filogenético de las especies bacterianas consiste en establecer su historia evolutiva a través de relaciones de similitud detectadas por pruebas moleculares como la electroforesis de campos pulsantes. La clasificación filogenética de *E. coli* se estableció mediante la detección de las variaciones alélicas de los genes que codifican la enzima transcriptasa reversa utilizando la técnica de electroforesis enzimática multilocus, lo cual reveló que existen cuatro grupos principales: A; B1; B2 y D (Herzer y col.,1990).

Sin embargo, hoy en día la caracterización de esos cuatro grupos filogenéticos se hace mediante el método propuesto por Clermont y col. en el 2000, el cual consiste en agrupar las cepas de acuerdo a los resultados obtenidos en la amplificación por PCR de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN TspE4.C2. El gen *chuA* le confiere a la bacteria la capacidad de transportar el grupo Hem de la hemoglobina de los glóbulos rojos del hospedero (Torres y Payne,1997), el gen *yjaA* fue identificado en el genoma del aislado no patógeno de *E. coli* K12 cuya función se desconoce (Blattner y col.,1997) y el TspE4.C2 es un fragmento de ADN anónimo de *E. coli* (Bonacorsi y col.,2000).

Los criterios utilizados por estos autores para la clasificación filogenética, son: Las cepas de *E. coli* negativas para el gen *chuA* y el fragmento TspE4.C2 se ubican en el grupo filogenético A, las cepas negativas para el gen *chuA* y positivas para el fragmento TspE4.C2 se ubican en el grupo B1, mientras que las que sean positivas para los genes *chuA* y *yjaA* se agrupan en el grupo B2 y las *chuA* positivas pero *yjaA* negativo se clasifican en el D (Clermont y col.,2000) (Figura 3).

Este método de clasificación filogenética, permite establecer una relación entre el grupo filogenético y la virulencia de la cepa, esto debido a que el gen *chuA* se ha detectado en las cepas de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, el gen *yjaA* fue identificado en el genoma del aislado no patógeno de *E. coli* K12 y el fragmento anónimo TspE4.C2 está asociado con las cepas de *E. coli* que causan meningitis neonatal (Clermont y col.,2000).

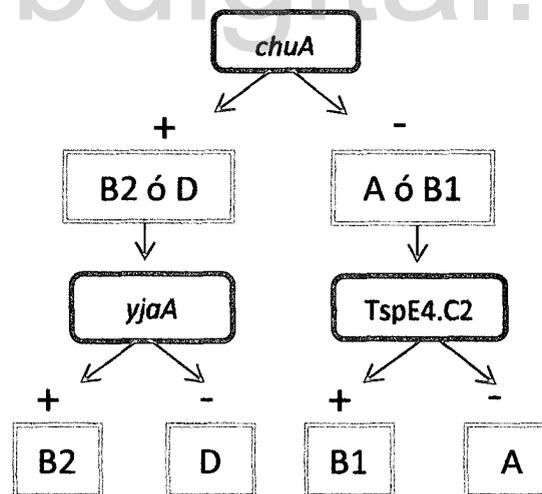


Figura 3: Agrupación filogenética de *E. coli* de acuerdo a los resultados de la amplificación de los genes *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2. Tomado de: Clermont y col.,2000.

Se ha observado que la mayoría de las cepas comensales de *E. coli*, pertenecen al grupo A y B1, mientras que las cepas causantes de infecciones

extraintestinales, incluyendo las ECUP están en los grupos filogenéticos B2 y en menor proporción en el grupo D (Clermont y col.,2000; Xia y col.,2011; Pitout,2012). Sin embargo, esto no es una regla ya que también se han reportado que las cepas del grupo A y B1 producen infecciones extraintestinales (Moreno y col.,2006).

Es bien conocido que la patogenicidad de *E. coli* depende de las condiciones del hospedero y de la cantidad o tipos de factores de virulencia que la bacteria posea (Wiles y col.,2008; Ptout,2012). Soto (2006) refiere que en los diferentes grupos filogenéticos, la variabilidad del poder patogénico se debe a que las cepas de los grupos B2 y D presentan más agrupaciones de genes de virulencia que las cepas de los grupos A y B1, lo cual se confirma con el trabajo de Moreno y col. (2006) quienes reportaron que en promedio las cepas del grupo B2 presentaron 8,8 factores de virulencia, las cepas del grupo D 5,3 mientras que las cepas de los grupos A y B1 solo presentaron 3,5 factores de virulencia.

2.1.6.-FACTORES DE VIRULENCIA

La capacidad de las cepas patógenas de *E. coli* de causar los distintos tipos de enfermedades extraintestinales está dada por la expresión de múltiples factores de virulencia, los cuales se definen como estructuras o productos bacterianos que intervienen en el proceso infeccioso, permitiéndole a la bacteria, adherirse a los tejidos, invadir órganos, evadir la respuesta inmune y producir un estado tóxico en el paciente (Kuhnert y col.,2000; Edmody y col.,2003; Pitout,2012).

Dentro de los factores de virulencia frecuentemente asociados a ECUP se describen:

1.- Factores de virulencia que median la adherencia a las células del hospedero:

1.1.- Adhesinas: Son proteínas estructurales tipo lectinas con afinidad por azúcares, estas proteínas pueden ser de dos tipos fimbriales y no fimbriales (Tabla 1) (Brooks y col.,2008; Murray y col.,2009), en *E. coli* las más estudiadas son las adhesinas de las fimbrias P y las fimbrias tipo 1 (Kuhnert y col.,2000; Edmody y col.,2003; Wiles y col.,2008).

1.1.1- Fimbrias P: También llamadas manosa resistente a hemoaglutinación (MRHA), están codificadas por los genes que se encuentran en el operón *pap*, denominado así por ser un pili asociado a pielonefritis. Este operón contiene el gen *papA* que codifica la subunidad estructural mayor de la fimbria, los genes *papK*, *papE*, *papF*, *papG* que codifican el complejo que forman la adhesina, así como los genes *papH*, *papC*, *papD* y *papJ* que codifican las proteínas que participan en su ensamblaje y los genes reguladores *papI* y *papB* (Figura 4) (Wiles y col.,2008; Pitout,2012).

Estas fimbrias están compuestas por un tallo rígido helicoidal con un diámetro de 6,8 nm y una longitud entre 1-2 µm formado por aproximadamente 4000 copias de la subunidad Pap A que representa la subunidad mayor de la especie, el Pap E tiene la función de adaptador/iniciador para el extremo de la estructura en la que se incorpora la subunidad del Pap F y G, esta última media la adherencia a las células uroepiteliales. Mientras que el Pap C es un poro oligomérico que facilita a la proteína chaperona la traslocación y unión de las subunidades que cruzan la membrana externa. El Pap D es una proteína chaperona periplasmática que facilita la importación de las subunidades que se encuentran en el periplasma y la

Pap H pone fin a la unión fimbrial y ayuda a formar el ancho de la misma (Figura 5) (Mulvey,2002; Edmody y col.,2003).

TABLA 1: Tipos de adhesinas de ExPEC.

Tipos de adhesinas		Genes	Función
Fimbriadas	Fimbrias P (alelos I, II y III)	<i>Pap</i>	Median la adherencia de la bacteria
	Fimbria tipo I	<i>fimH</i>	
	Fimbria F1C	<i>focG</i>	
	Fimbria S	<i>Sfa</i>	
No fimbriadas (adhesinas X)	Adhesinas del antígeno Dr.	<i>Afa/draBC</i>	
	Adhesinas AFA I	<i>afaB/C</i>	
	AFA III.	<i>afaB/C III</i>	
	Adhesina M	<i>bmaE</i>	

Tomado de: Edmody y col.,2003; Soto,2006; Tiba y col.,2008; Wiles y col.,2008; Pitout,2012.

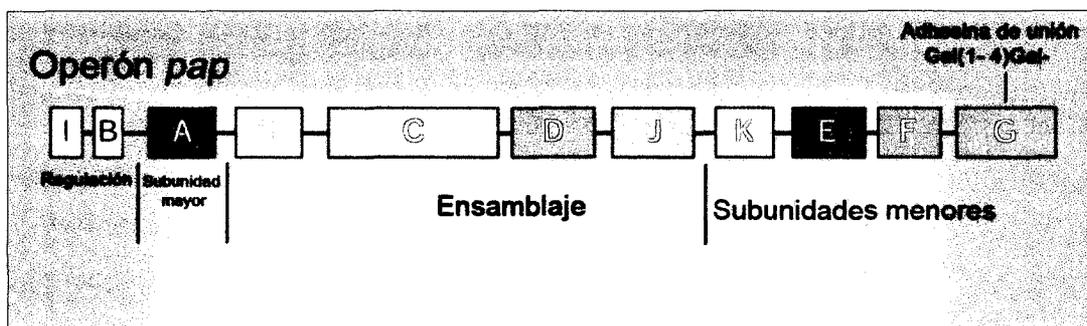


Figura 4: Estructura del operón *pap*. Tomado de: Knight y Bouckaert,2009.

Las fimbrias P son el segundo factor de virulencia más común en UPEC (Bien y col.,2012), siendo identificadas en el 100% de los aislados de urosepsis, 80% de las cepas que causan pielonefritis aguda, 40-50% de las cepas aisladas de cistitis y sólo en el 20% de las cepas que causan bacteriuria asintomática (Edmody y col.,2003; Wullt,2003; Stapleton,2006). Esta marcada asociación con el desarrollo de pielonefritis y urosepsis, se explica por el hecho de que las fimbrias P se unen específicamente con dímeros de galactosa presentes en los glucolípidos epiteliales del riñón (Wiles y col.,2008).

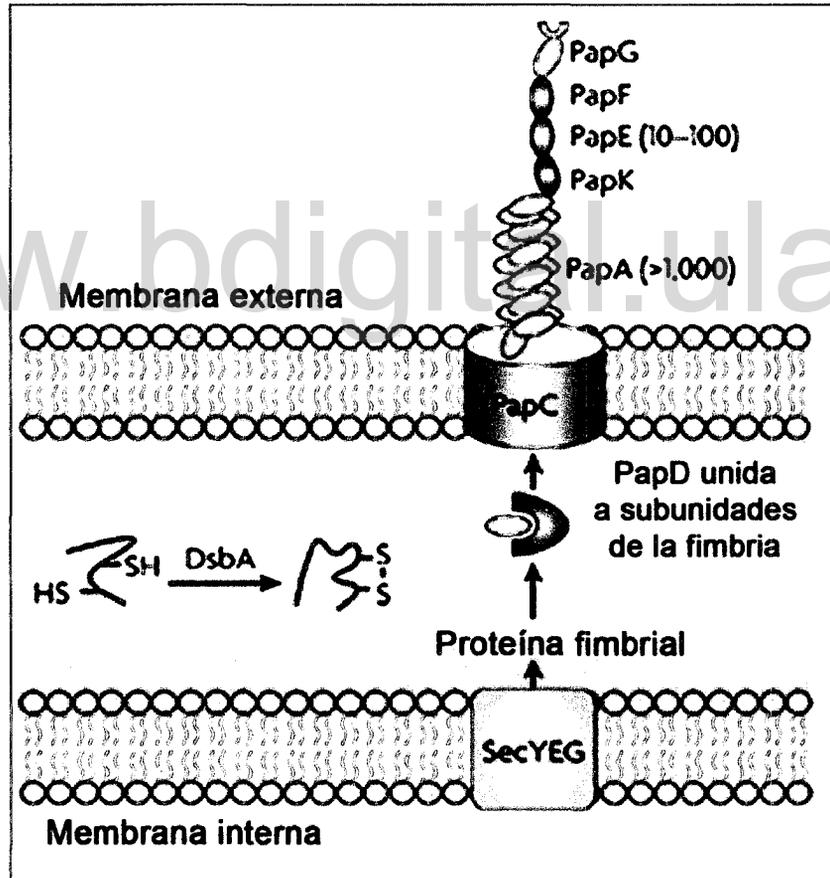


Figura 5: Estructura de la fimbria P. Tomado de: Heras y col.,2009.

los receptores celulares para estas adhesinas son más abundantes en la mucosa vesical que en el uroepitelio alto (Edmody y col.,2003). Es importante acotar que este tipo de fimbrias se encuentran en la mayoría de los aislados de *E. coli* no siendo exclusivas de los aislados patógenos (Kuhnert y col.,2000; Wiles y col.,2008).

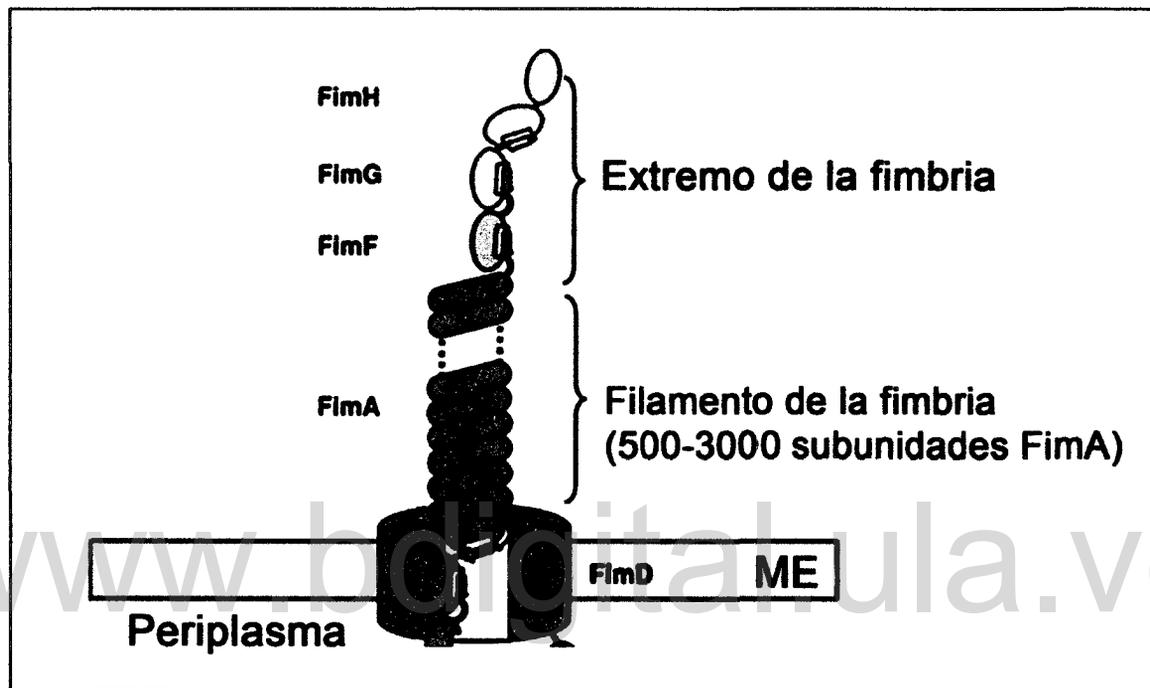


Figura 7: Estructura de la fimbria tipo 1. Tomado de: Nishiyama y col.,2005.

2.- Mecanismos evasores de las defensas del hospedero: En la tabla 2 se describen los diferentes mecanismos relacionados con las cepas ExPEC. De ellos, uno de los más importantes en ECUP es la cápsula:

2.1- Cápsula: Es un polímero extracelular compuesto principalmente por polisacáridos que se localiza por fuera de la pared celular bacteriana (Murray y col.,2009), le confiere a la bacteria una mayor resistencia a la fagocitosis y a la acción bactericida del sistema de complemento. Los diferentes tipos de cápsulas

que existen en las bacterias gramnegativas se deben a la presencia de diversos tipos de antígenos, denominados K, los cuales difieren entre sí por el tipo de oligosacárido que los compone, por la longitud de la cadena y su densidad (Brooks y col.,2008). Basados en criterios físicos, químicos y genéticos los antígenos capsulares K de *E. coli* se clasifican en dos familias: I y II, estas últimas son las que se vinculan a la patogenicidad extraintestinal de *E. coli* (Johnson,1991), siendo el más frecuente en cepas ECUP el antígeno capsular tipo 1 (K1) codificado por los genes *KpsMT II* (Kuhnert y col.,2000; Edmody y col.,2003; Wiles y col.,2008; Pitout,2012).

3.- Sistemas de captación de hierro:

3.1.- Sideróforos: Son moléculas de bajo peso molecular (PM:500-1000 g/mol), secretadas al medio externo para captar el hierro del hospedero e introducirlo en la bacteria por acción de receptores proteínicos específicos de la membrana externa bacteriana (Crossa y Walsh,2002; Brooks y col.,2008; Murray y col.,2009).

Entre los sistemas de captación de hierro expresados por las ECUP están: enterobactina, salmochelina, aerobactina y yersiniabactina (Tabla 3) (Edmody y col.,2003; Wiles y col.,2008; Pitout,2012).

La enterobactina es un sideróforo de tipo catecol, con una constante de disociación del hierro de 10^{52} (Neilands,1995; Pattus y Abdallah,2000; Winkelmann,2002), los genes que codifican la biosíntesis y transporte de este sideróforo son los *ent*, *fepA* y el gen *fes* (Crossa y Walsh,2002; Wiles y col.,2008). A pesar de que la enterobactina tiene una constante de disociación alta para el hierro, puede ser fácilmente neutralizada por mecanismos de defensa del hospedero, es por ello que muchas

cepas extraintestinales de *E. coli* mediante glucosilación de la enterobactina producen un sideróforo que es resistente a dicha neutralización del hospedero, convirtiéndolo en un nuevo sideróforo denominado salmochelinas, codificado por los genes *ironN* (Fischbach y col.,2005; Wiles y col.,2008).

TABLA 2: Mecanismos evasores de las defensas del hospedero de ExPEC.

Mecanismos evasores de las defensas del hospedero		Genes	Función
Cápsula	Grupo capsular 2 (K1/k5)	<i>KpsMT II</i>	Efecto antifagocitario, anticomplemento, resistencia al suero y evasión del sistema inmune
Lipopolisacáridos	O6,O4,O1,O2,O1 8,O83,O7	-	Efectos endotóxicos, antígeno O, inducción de citoquinas, resistencia al suero, inmunoadyuvante.
Proteasa T (Proteínas de membrana externa)		<i>ompT</i>	Receptor y transporte
Resistencia al suero	Proteína TraT	<i>traT</i>	Aumenta la virulencia de la bacteria

Tomado de: Edmody y col.,2003; Soto,2006; Tiba y col.,2008; Wiles y col.,2008; Pitout,2012.

El sideróforo aerobactina es de tipo hidroxamato, con una constante de disociación de hierro aproximadamente de 10^{25} (Neilands,1995; Pattus y Abddlah,2000; Winkelmann,2002), los genes que lo codifican están organizados en el operon *iuc* (Johson,1991).

El sideróforo yersiniabactina es de tipo mixto, el cual contiene un tipo de catecoles denominados fenolados y otros compuestos como el triazol (Drechsel y col.,1995; Chambers y col.,1996). Este sideróforo tiene una constante de disociación (Kd) de hierro de aproximadamente 10^{36} (Crossa y Walsh, 2002) y su receptor específico esta codificado por el gen *fyuA* (Haag y col.,1993).

Debido a su alta afinidad por el hierro (Kd: 10^{36}), la yersiniabactina puede solubilizar el mencionado metal, para ser captado por la bacteria, aun cuando esté unido a las proteínas de transporte del hospedero conocidas como lactoferrina y transferrina (Crossa y Walsh,2002; Wiles y col.,2008).

Los genes que codifican todo el sistema yersiniabactina se encuentran en una isla de patogenicidad identificada inicialmente en especies patógenas de *Yersinia*. Esta isla se ubica específicamente en el locus *ybt*, el cual se organiza en cuatro operones (Figura 8). Al describir la organización del locus *ybt* de izquierda a derecha en la figura 8, se observa que el primer operón contiene genes que codifican ATPasas y permeasas que intervienen en la biosíntesis de este sideróforo, en segundo lugar está el *ybtA* que actúa en la regulación de la transcripción, el siguiente operón codifica las proteínas necesarias para la biosíntesis y el operón *psn* que contiene el gen *fyuA*, el cual codifica el receptor para este sideróforo (Perry y Fetherston,2011).

TABLA 3: Sistemas de captación de hierro de las ExPEC.

Sistemas de captación de hierro (Sideróforos)	Genes	Función
Enterobactina	<i>fepA</i>	Captación de hierro
Aerobactina	<i>iuc</i>	
Yersiniabactina	<i>fyuA</i>	
Salmochelina	<i>ironN</i>	

Tomado de: Edmody y col.,2003; Soto,2006; Tiba y col.,2008; Wiles y col.,2008; Pitout,2012.

La amplia distribución de la yersiniabactina entre las especies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Photorhabdus*, *Salmonella*, *Serratia* y todos los patotipos de *E. coli* se debe a que esta isla está flanqueada por secuencias de inserción IS100 que median una delección frecuente de la misma (Perry y Fetherston,1997; Carniel,2001; Crosa y Walsh,2002; Perry y Fetherston,2011).

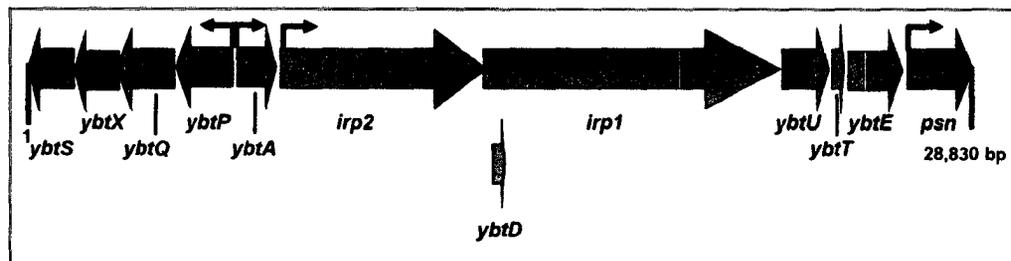


Figura 8: Organización de los genes del locus *ybt*. Tomado de: Perry y Fetherston 2011.

4.- Factores de virulencia que producen efectos citopáticos en las células del hospedero (Tabla 4):

4.1- Toxinas: Son productos protéicos secretados por las bacterias con la finalidad de producir efectos citopáticos en la célula del hospedero contribuyendo en la patogénesis de las ITU. Las cepas de ECUP pueden producir varios tipos de exotoxinas, las más estudiadas son la α -hemolisina, el factor citotóxico necrozante y la toxina autotransportadora Sat (por las siglas de la palabra en inglés “secret autotransporter toxin”) (Brooks y col.,2008; Wiles y col., 2008; Murray y col.,2009).

4.1.1- La α -hemolisina (HlyA): Es una citolisina, dependiente de calcio, de aproximadamente 110 kDa, codificada a nivel cromosómico o plasmídico, por los genes del operón *hlyACABD*. El efecto de esta toxina es dependiente de la cantidad que produzca la bacteria (Hamon y col.,2007). Cuando se producen altos niveles de α -hemolisina, estas se insertan en la membrana de las células del hospedero, generando poros y causando de esta manera lisis celular, mientras que cuando se producen bajas concentraciones de HlyA, se induce una cascada de señales que afectan la sobrevivencia y la respuesta inflamatoria de la célula del hospedero (Edmody y col.,2003; Wiles y col.,2008)

Esta toxina, está codificada aproximadamente en el 50% de los aislados ECUP y su expresión está asociada con una mayor gravedad clínica en pacientes con ITU (Wiles y col.,2008). La importancia de esta toxina radica en que al destruir las células del hospedero, se liberan nutrientes y otros factores, como el hierro, que son fundamentales para el crecimiento bacteriano, sin embargo los niveles a los cuales la toxina produce el efecto anteriormente mencionado no está claro (Bien y col.,2012).

4.1.2- Factor citotóxico necrosante tipo 1 (Fcn): Es una proteína de aproximadamente 113 kDa que esta codificada a nivel cromosómico en aproximadamente un tercio de las cepas de ECUP (Rippere-Lambe y col.,2001). Si bien su función en la patogenicidad de las ITU es poco conocida, se sabe que Fcn cataliza la desaminación de proteínas GTPasas como Rho. Dicha desaminación hace que las GTPasas se activen de forma constitutiva provocando importantes alteraciones celulares que facilitan la difusión y la persistencia de la ECUP en el tracto urinario (Wiles y col.,2008). De igual manera, se ha reportado que promueve la apoptosis de las células epiteliales de la vejiga, estimulando su exfoliación para facilitar el acceso de las bacterias en el tejido subyacente (Edmody y col.,2003; Bien y col.,2012).

4.1.3- Proteína Sat: Es una de las proteínas proteolíticas que pertenecen a una amplia familia de toxinas autotransportadoras con actividad serin-proteasa. Esta se encuentra codificada en genes cromosomales (*sat*) y su función no está totalmente dilucidada. Sin embargo, se ha observado que hidroliza la espectrina, un componente del citoesqueleto (Guyer y col.,2000; Dutta y col.,2002; Guyer y col.,2002; Wiles y col.,2008), el cual genera un efecto citopático en ciertas líneas celulares de vejiga e hígado humano, provocando la vacuolización del citoplasma (Bien y col.,2012). Investigaciones realizadas por Guyer y col. (2002), en un modelo de ITU en ratones, utilizando cepas de *E. coli* CF073 que expresaban la proteína Sat, demostraron que las mismas inducen daño renal, causando disolución de la membrana del glomérulo, pérdida de células del epitelio tubular y vacuolización del tejido del riñón.

TABLA 4: Tipos de toxinas secretadas por ExPEC.

Tipos de toxinas	Genes	Función
α -hemolisina	<i>hlyA</i>	Citotoxicidad, hemólisis
Factor citotóxico necrosante	<i>cnf1</i>	Interferencia en la fagocitosis y apoptosis
Toxina secretada autotransportadora	<i>sat</i>	Citotoxicidad

Tomado de: Edmody y col.,2003; Soto,2006; Tiba y col.,2008; Wiles y col.,2008; Pitout,2012.

5.- Otros factores de virulencia:

5.1.- Proteína uropatógena específica: Es una proteína asociada con las cepas de ECUP (Yamamoto y col.,2001), esta proteína fue descrita por primera vez por Kurazono y col.(2000), en un estudio sobre la determinación de un homólogo del gen de la toxina ZOT de *Vibrio cholerae* en *Escherichia coli* uropatógenas provenientes de pacientes con cistitis en Japón. Estos investigadores obtuvieron un fragmento de ADN de 4167pb que contenía un gen de 1000 pb de longitud y codificaba para una proteína de 346 aminoácidos, este gen lo denominaron *usp* por su relación con las cepas UPEC.

La función de esta proteína en las ITU no está clara, sin embargo, Yamamoto y col. (2001) demostraron que el gen *usp* recombinado en cepas ECUP mejoraba significativamente la infectividad de *E. coli* en el desarrollo de ITU. El mecanismo por el cual la proteína uropatógena específica aumenta la infectividad de las ECUP

aún no es claro, pero si se ha demostrado que la misma puede ser considerada como un determinante de virulencia de ECUP en las ITU (Yamamoto y col.,2001).

Se ha descrito que el gen *usp* se ha detectado con mayor frecuencia en las cepas ECUP que en los aislados fecales de *E. coli* de individuos sanos (Nakano y col.,2001), además existen reportes de que este gen se encuentra en el 96% de las ECUP productoras de pielonefritis y en el 80% de las productoras de cistitis (Tiba y col.,2008).

Es importante referir que los genes que codifican los distintos factores de virulencia (V1,V2,V3,V4) de *E. coli* están frecuentemente localizados en islas de patogenicidad (IP). Estas se definen como bloques genéticos de gran tamaño entre 20-200 Kb, con un contenido importante de G+C y un "Codón usage" distinto al resto del ADN de la bacteria. Las IP se encuentran insertadas en el cromosoma bacteriano adyacentes a genes de ARNt, flanqueadas por repeticiones directas (RD) y contienen elementos móviles, tales como: secuencias de inserción completas o defectuosas (ISc o ISd) e integrasas (*int*) (Figura 9) (Fernández y col.,2004; Schmidt y Hensel.,2004). Estas IP se transmiten verticalmente y/u horizontalmente de una cepa a otra, lo que contribuye a la variabilidad genética interespecie. Además dichos bloques genéticos pueden contener genes relacionados con resistencia a los antibióticos como los genes que codifican para las BLEE (Kuhnert y col.,2000; Pitout, 2012).

En *E. coli* se han descrito siete IP, cada una codifica para distintos factores de virulencia, aunque algunos de ellos pudieran coincidir en más de una IP, también se ha descrito que una cepa de *E. coli* puede contener varias IP (Cañavate y

col.,2010). Entre ellas la IP V que contiene los genes que codifican las fimbrias P (Kuhnert y col.,2000), la IP II_{CFT073}, la cual está asociada con mayor frecuencia a ECUP aisladas de prostatitis que las provenientes de pielonefritis o cistitis (Rasko y col.,2001; Parham y col.,2005).

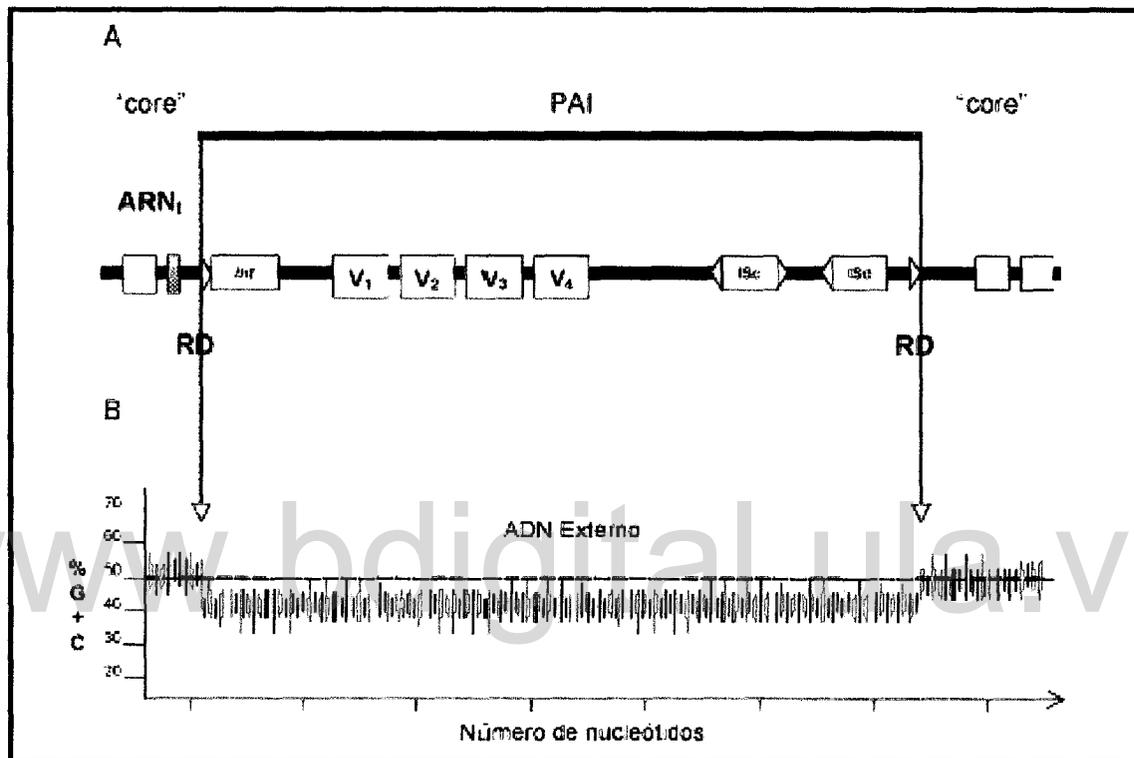


Figura 9: Estructura general de una IP. Tomado de: Fernández y col.,2004.

2.1.7.-MECANISMOS DE RESISTENCIA DE *Escherichia coli* A LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

2.1.7.1- ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Los antibióticos β -lactámicos se definen como sustancias químicas bactericidas, las cuales en su estructura contienen un anillo β -lactámico. En función de los

radicales que se unen a este anillo se distinguen varios sub-grupos, entre ellos: las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemos (Figura 10) (Marín y Gudiol,2003; Guzmán y col.,2004; Calvo y Martínez,2009).

Las bacterias gramnegativas poseen una pared celular delgada y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas y una fina capa interna de peptidoglicano (Figura 1) (Kuhnert y col.,2000; Marín y Gudiol,2003; Winn y col.,2008; Murray y col.,2009). Este último es un polímero constituido por largas cadenas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina, los cuales se sintetizan en el citoplasma de la bacteria y son transportados a través de la membrana citoplasmática al espacio periplásmico donde las proteínas fijadoras de penicilina (PBP del inglés Penicillin Binding Protein) con actividad transpeptidasas y carboxipeptidasas, se encargan de entrelazarlos y formar un polímero tridimensional estable (Cordiés y col.,1998; Marín y Gudiol,2003; Winn y col.,2008; Murray y col.,2009).

El mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos consiste precisamente en bloquear las PBP para inhibir la unión o transpeptidación de los componentes del

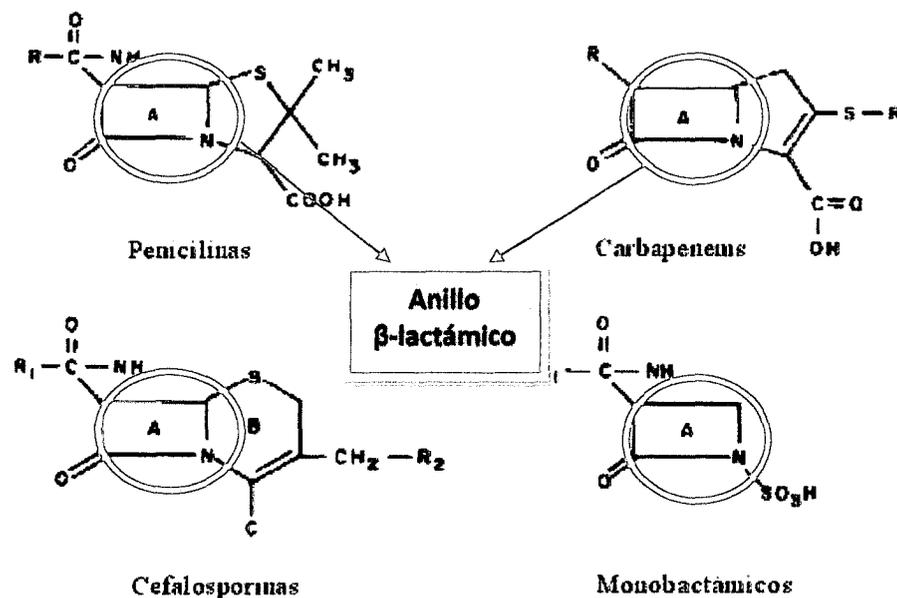


Figura 10: Estructura de los antibióticos β -lactámicos. Tomado de: Guzmán y col., 2004.

peptidoglicano, de este modo se producen paredes celulares defectuosas provocando la lisis y muerte de la bacteria (Cordiés y col., 1998; Marín y Gudíol, 2003; Calvo y Martínez, 2009).

2.1.7.2-MECANISMOS DE RESISTENCIA

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos son estrategias a través de las cuales las bacterias pueden disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos para resistir el ataque de los mismos y poder persistir en el hospedero (Cordiés y col., 1998; Marín y Gudíol, 2003).

Estos mecanismos pueden ser intrínsecos y adquiridos. Se conoce como resistencia intrínseca a la resistencia natural específica de una especie aún sin haber estado expuesta a los antibióticos; mientras que la resistencia adquirida, está mediada por la adquisición de información genética nueva, a través de

mutaciones en el genoma bacteriano, adquisición de plásmidos, transposones e integrones (Cordiés y col.,1998; Marín y Gudiol,2003; Winn y col.,2008).

Los mecanismos de resistencia se resumen en cuatro categorías (figura 11)

1.- **Modificación enzimática del antibiótico:** Las bacterias expresan enzimas capaces de hidrolizar o modificar la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad. En las bacterias gramnegativas estas enzimas se encuentran en el espacio periplásmico. Entre otras se pueden mencionar las β -lactamasas que inactivan los antibióticos β -lactámicos (Figura 11) (Cordiés y col.,1998; Marín y Gudiol,2003; Tafur y col.,2008; Rosenblatt-Farrell,2009).

2.- **Bombas de expulsión:** Son proteínas de transporte, ubicadas en la membrana externa de la bacteria, las cuales toman el antibiótico del espacio periplásmico y lo expulsan al exterior, para evitar que llegue a su sitio de acción (Figura 11) (Cordiés y col.,1998; Marín y Gudiol,2003; Tafur y col.,2008; Rosenblatt-Farrell,2009).

3.- **Cambios en la permeabilidad de la membrana externa:** La membrana externa de los bacilos gramnegativos posee canales proteicos denominados porinas los cuales son utilizados por los antibióticos β -lactámicos para ingresar al espacio periplásmico y alcanzar su sitio de acción, la alteración en la conformación de dichas porinas impide la entrada del antibiótico evitando que este cumpla su función (Figura 11) (Cordiés y col.,1998; Marín y Gudiol,2003; Tafur y col.,2008; Rosenblatt-Farrell,2009).

4.- **Alteraciones del sitio de acción:** Este mecanismo consiste en generar cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos, por ejemplo modificación

de las PBP, para evitar que los antibióticos β -lactámicos se unan a ella (Figura 11) (Cordiés y col.,1998; Marín y Gudiol,2003; Tafur y col.,2008; Rosenblatt-Farrell,2009).

El tratamiento de las infecciones producidas por ECUP se ha complicado por el aumento de la resistencia antimicrobiana, a los antibióticos de primera elección para estas infecciones, los cuales incluyen cefalosporinas, fluoroquinolonas y trimetoprim sulfametoxazol, lo que aumenta la morbilidad y mortalidad (Caicedo y col.,2009). Hasta los años 90 estos antimicrobianos eran efectivos en el tratamiento de las infecciones producidas por esta bacteria, sin embargo, a partir del año 2000 la resistencia antimicrobiana se ha incrementado mundialmente (Pitout, 2012).

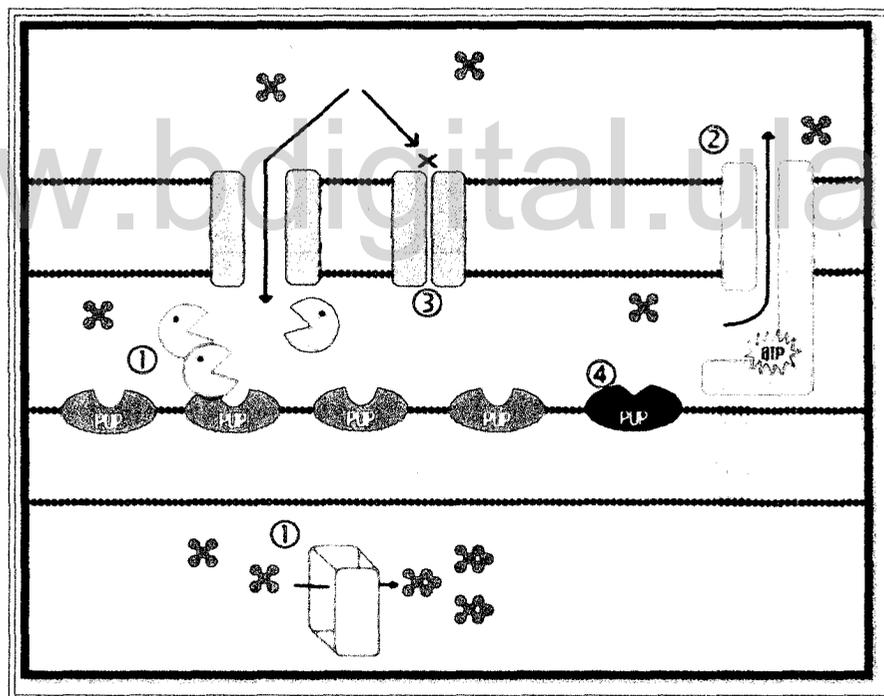


Figura 11: Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos: 1. Enzimas modificadoras. 2. Bombas de expulsión. 3. Cierre de porinas. 4. Modificación del sitio blanco del antibiótico. PUP: Proteínas de unión a penicilina. Tomado de: Tafur y col.,2008.

2.1.7.3-β-LACTAMASAS

Son enzimas capaces de hidrolizar el anillo β-lactámico de ese grupo de antibióticos, inactivándolo e impidiendo que se unan a su sitio de acción. Los genes que codifican estas enzimas pueden localizarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos. En las bacterias gramnegativas este es el mecanismo de resistencia a los antimicrobianos más prevalente (Tafur y col.,2008; Rosenblatt-Farrell,2009; Pitout,2012).

Estas enzimas se agrupan en dos esquemas: el de Ambler, el cual se basa en una clasificación molecular, que ubica a las β-lactamasas en cuatro clases según la homología de sus proteínas. Las de clase A, C y D poseen serina en su sitio activo, denominándose enzimas de serina β-lactamasas, mientras que las de clase B contienen zinc y se llaman metalo β-lactamasas (Figura 12) (Ambler,1980).

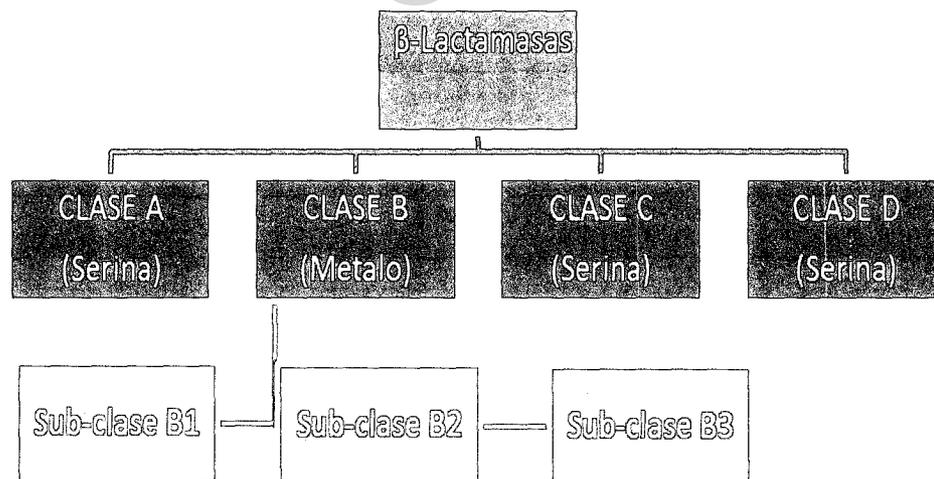


Figura 12: Clasificación molecular de las enzimas β-lactamasas según Ambler.

Tomado de: Ambler (1980).

A su vez Bush-Jacoby-Medeiros realizaron una clasificación funcional, basada en sus propiedades hidrolíticas y las sustancias que la inhiben (Tabla 5) (Bush y col.,1995; Bush y Jacoby,2010).

2.1.7.3.1 β -lactamasas de espectro expandido (BLEE)

Las β -lactamasas de espectro expandido son enzimas que se caracterizan no solo por hidrolizar penicilinas y cefalosporinas de espectro reducido si no que extienden su rango de acción a los monobactámicos y cefalosporinas de tercera y cuarta generación, además estas enzimas son incapaces de hidrolizar cefamicinas y carbapenemos. Otras características importantes de las BLEE es que pertenecen a la clase molecular A y D de Ambler, contienen un sitio activo de serina y son inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam (Bush y col.,1995; Cortes y col.,2006; Harada y col.,2008; Tafur y col.,2008; Bush y Jacoby,2010).

La mayoría de las BLEE han evolucionado mediante la sustitución de aminoácidos en las β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) conocidas como: Temoneira (TEM-1, TEM-2) y variable sulfidril (SHV-1), también existen BLEE no relacionadas con TEM o SHV que proviene de las β -lactamasas cromosómicas de las especies del reino *Kluyvera* llamadas CTX-M y de las β -lactamasas tipo OXA (Oxacilina) (Cortes y col.,2006; Harada y col.,2008; Bush y Jacoby,2010).

Las β -lactamasas tipo TEM son enzimas que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas de primera generación, son las enzimas mediadas por plásmidos más prevalentes en las bacterias gramnegativas (Bush y Jacoby,2010).

Tabla 5: Clasificación funcional de las β -lactamasas según Bush-Jacoby-Medeiros

Grupo Bush-Jacoby (2009)	Grupo Bush-Jacoby Medeiros(1995)	Clases Moleculares	Sustratos distintivos	Inhibidas por AC o TZB	EDTA	Características definitorias
1	1	C	Cefalosporinas	No	No	Hidroliza en forma importante las cefalosporinas y cefamicinas.
1e	NI	C	Cefalosporinas	No	No	Hidrólisis incrementada sobre ceftazidime y otros oxyino- β -lactámicos.
2a	2a	A	Penicilinas	Si	No	Mayor hidrólisis de bencilpenicilinas que cefalosporinas.
2b	2b	A	Penicilinas y Cefalosporinas de primera	Si	No	Similar hidrólisis de bencilpenicilinas y cefalosporinas.
2be	2be	A	Cefalosporinas de espectro expandido, monobactámicos	Si	No	Hidrólisis incrementada sobre los oxymino- β -lactámicos.
2br	2br	A	Penicilinas	No	No	Resistencia a los inhibidores de β -lactamasas.
2ber	NI	A	Cefalosporinas de espectro expandido, monobactámicos	No	No	Hidrólisis incrementada sobre los oxymino- β -lactámicos y resistencia a los inhibidores de β -lactamasa.
2c	2c	A	Carbencilina	Si	No	Hidrólisis incrementada sobre carbencilina.
2ce	NI	A	Carbencilina, cefepima	Si	No	Hidrólisis incrementada sobre carbencilina, cefepima y cefpirona.
2d	2d	D	Cloxacilina	Variable	No	Hidrólisis incrementada sobre cloxacilina y oxacilina.
2de	NI	D	Cefalosporinas de espectro expandido	Variable	No	Hidroliza la cloxacilina, oxacilina y los oxymino β -lactámicos.
2df	NI	D	Carbapenemos	Variable	No	Hidroliza la cloxicilina, oxacilina y carbapenemos.
2e	2e	A	Cefalosporinas de espectro expandido	Si	No	Hidroliza las cefalosporinas, inhibido por el AC pero no por aztreonam.
2f	2f	A	Carbapenemos	Variable	No	Hidrólisis incrementada de carbapenemos, oxymino β -lactámicos y cefamicinas.
3a	3	B(B1)	Carbapenemos	No	Si	Hidrólisis de amplio espectro incluyendo carbapenemos pero no monobactámicos.
3b	3	B(B3) B(B2)	Carbapenemos	No	Si	Hidrólisis preferencial de carbapenemos.

AC: Ácido clavulánico, TZB: Tazobactam, EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético, NI: No incluida
Tomado de: Bush y Jacoby,2010.

Las TEM fueron descritas en 1965 por Datta y Kontomichalou, a partir de una cepa de *E. coli* aislada de un hemocultivo en una paciente llamada Temoneira en Grecia, de allí la designación TEM. La primera enzima derivada de TEM-1 presenta una sustitución de la glutamina por la lisina en la posición 39, la cual se llamó TEM-2, esto solo generó cambios en el punto isoeléctrico de la enzima y no en su perfil de hidrólisis (Harada y col.,2008), ambas enzimas son consideradas BLEA (Bush y Jacoby,2010).

La primera variante de TEM con fenotipo BLEE fue reportada en 1987 por Sirot y col. en aislados de *Klebsiella pneumoniae* y la designaron inicialmente como β -lactamasa CTX-1 debido a su mayor actividad hidrolítica contra cefotaxima. Posteriormente, Sougakoff y col. en 1988 al secuenciar el gen que codifica dicha enzima observaron que se diferenciaba de la TEM-2 en dos aminoácidos: lisina por glutamina en la posición 102 y serina por glicina en la posición 236, por lo cual la denominaron TEM-3. A partir de entonces se ha presentado un rápido incremento en el número y diversidad de las variantes de TEM con espectro extendido, la mayoría de las cuales tiene la misma actividad hidrolítica que la TEM-3 (Cortes y col.,2006; Harada y col.,2008).

Las β -lactamasas tipo SHV son enzimas con un perfil hidrolítico igual al de las TEM-1 y son producidas frecuentemente por *E. coli* y *K. pneumoniae*. A pesar de que los genes que codifican estas enzimas en las cepas de *K. pneumoniae* están ubicados en el cromosoma bacteriano, en las cepas de *E. coli* la producción de SHV-1 es frecuentemente mediada por plásmidos (Cortes y col.,2006; Harada y col.,2008; Tafur y col.,2008). La primera variante SHV-1 con fenotipo BLEE fue

descrita por Knothe y col. en 1983 en Alemania, en aislados de *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *Serratia marcescens* y la designaron como SHV-2 debido a que la secuenciación de los genes que codifican dicha enzima reveló que la diferencia con SHV-1 estaba dada por la sustitución de un aminoácido glicina por una serina en la posición 238 (Knothe y col.,1983).

Dependiendo del tipo de aminoácido que se sustituya y de la posición en que ocurra, la enzima resultante tendrá mayor actividad hidrolítica sobre la cefotaxima o ceftazidima, además existen variantes que pueden resistir la acción de los inhibidores de las β -lactamasas (Cortes y col.,2006; Harada y col.,2008).

Las BLEE tipo CTX-M son enzimas con mayor proximidad genéticamente a las β -lactamasas cromosómicas de las distintas especies de *Kluyvera* que a las enzimas tipo TEM o SHV. Su rango de acción es igual al de las BLEE anteriormente descritas, con la diferencia que tienen mayor actividad hidrolítica frente a cefotaxima y ceftriazona que a la ceftazidima, además son más activas contra cefalosporinas de cuarta generación (Bush y Jacoby,2010; Canton y col.,2012).

Las CTX-M son codificadas por genes ubicados en plásmidos transferibles y la mayoría se encuentran en *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* (Canton y col.,2012). Esta enzima fue descrita en 1989 en Munich por Bauernfeind y col. en una cepa de *E. coli* productora de BLEE no TEM no SHV, la cual en base a que tenía mayor actividad hidrolítica frente a cefotaxima y al lugar de su descubrimiento se le designó como CTX-M-1 (Bauernfeind y col.,1990). En función de la homología en la secuencia de sus aminoácidos se han descrito

más de 120 variantes de CTX-M, las cuales se dividen en cinco subclases denominadas CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 que a su vez incluyen diferentes tipos de CTX-M (Canton y col.,2012).

Las β -lactamasas tipo OXA son enzimas con gran actividad hidrolítica contra oxacilina, cloxacilina, meticilina, ureido y aminopenicilina (Cortes y col.,2006; Harada y col.,2008; Bush y Jacoby,2010), las cuales han sido aisladas principalmente en *Pseudomonas aeruginosa*, pero también se pueden encontrar en las enterobacterias, la mayoría de las β -lactamasas tipo OXA tienen poca actividad contra las cefalosporinas de tercera o cuarta generación por lo tanto no se consideran BLEE (Cortes y col.,2006; Harada y col.,2008). Sin embargo, la variantes OXA-11, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-18, OXA-19, OXA-32, y OXA-45 tienen distintos grados de actividad contra las cefalosporinas de tercera generación y el aztreonam (Harada y col.,2008).

2.1.8.- TÉCNICAS MOLECULARES

2.1.8.1.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase chain reaction), es una técnica de biología molecular descrita en 1983 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento específico de ADN partiendo de un ADN molde (Costa,2004; Rodríguez y Barrera,2004; Villegas y col.,2009).

Esta técnica se fundamenta en las características de la estructura química del ADN y su replicación semiconservativa, así como en la propiedad natural de la

ADN polimerasa para replicar hebras de ADN en las células (Villegas y col.,2009). Esta enzima puede utilizarse *in vitro* en ciclos alternados de altas y bajas temperaturas para separar las hebras de ADN recién formadas y dejar que la polimerasa vuelva a crear una hebra de ADN nueva utilizando un marcador de inicio de replicación. Anteriormente estas enzimas se desnaturalizaban por las altas temperaturas utilizadas en el proceso, sin embargo hoy en día se utilizan enzimas que proceden de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus* que vive en aguas termales y soporta temperaturas de más de 110 °C, por lo que se les consideran termoestables (Méndez y Pérez,2004; Rodríguez y Barrera,2004).

La PCR se lleva a cabo en una mezcla que consta de una pequeña muestra de ADN utilizado como molde, dos oligonucleótidos sintéticos que flanquean las secuencias específicas del fragmento de ADN que se desea amplificar, la ADN polimerasa, los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's) que se utilizan como sustratos para copiar las nuevas cadenas de ADN, iones divalentes como el cloruro de magnesio ($MgCl_2$) que actúan como cofactores de la polimerasa y una solución tampón (Buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la polimerasa (Rodríguez y Barrera,2004; Villegas y col.,2009).

El proceso de PCR consiste en un ciclo inicial de pre-calentamiento a altas temperaturas que se realiza entre 90 y 94 °C por 1-9 minutos para así garantizar que todas las hebras de ADN se separen, posteriormente se realizan entre 25 y 30 ciclos de tres cambios de temperatura y cada uno consisten en una fase de desnaturalización a una temperatura entre 94 y 95 °C donde se separan las cadenas del ADN. Otra fase de alineamiento entre 50 y 65 °C donde los

oligonucleótidos se unen a su secuencia complementaria en su ADN molde, esta temperatura debe ser 5 u 8 °C menor que la temperatura de fusión (T_m), la cual se determina por cálculos termodinámicos. Finalmente una fase de extensión a una temperatura entre 70 y 74 °C, la cual está dada por la temperatura óptima de acción de la *Taq* polimerasa que sintetizará la nueva hebra de ADN complementaria añadiendo los dNTP's en dirección 5'→3'. Al terminar los 30 ciclos se realiza un ciclo de extensión final a una temperatura entre 70 y 74 °C por 5-15 minutos para asegurar que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado. Las temperaturas utilizadas y los tiempos aplicados en cada ciclo deben ser estandarizados en cada PCR, ya que estos dependen de la naturaleza y tipo de polimerasa utilizada, la concentración de iones divalentes y de los dNTP's, así como de la temperatura de unión de los oligonucleótidos (Méndez y Pérez,2004; Rodríguez y Barrera,2004; Villegas y col.,2009).

La sensibilidad de esta prueba está dada por el hecho de que solo requiere una mínima cantidad de ADN para obtener un gran número de copias de este (Rodríguez y Barrera,2004) y su especificidad radica en los oligonucleótidos utilizados, los cuales son diseñados para ser exactamente complementarios al ADN molde o de estudio, ya que se toman en cuenta ciertas características como: la longitud, la cual debe estar entre 18 y 30 nucleótidos para que la hibridación sea eficiente, el contenido G+C debe estar entre 40-75% para evitar uniones inespecíficas, la temperatura de fusión debe ser similar entre los dos oligonucleótidos, además se debe evitar complementariedad entre los dos oligonucleótidos para que no se formen dímeros (Méndez y Pérez,2004; Rodríguez y Barrera,2004).

En el ámbito del diagnóstico microbiológico, la PCR es una de las técnicas de mayor utilidad, ya que permite determinar los agentes etiológicos de las diferentes infecciones de una manera específica, oportuna y eficaz, sobre todo aquellos microorganismos que son difíciles de cultivar o que requieren procesos diagnósticos complejos en su determinación (Costa,2004; Rodríguez y Barrera,2004). Esta técnica también se utiliza en la caracterización genética de agentes infecciosos mediante: genotipificación de los diferentes factores de virulencia o mecanismos de resistencias a fármacos; en epidemiología molecular y para detectar la presencia o ausencia de elementos genéticos específicos en las bacterias (Costa,2004; Villegas y col.,2009).

2.2- ANTECEDENTES DE LA HIPÓTESIS

La relación de los genes de virulencia y su asociación con los grupos filogenéticos ha permitido obtener datos importantes sobre su distribución y asociación con las diferentes patologías que causa *E. coli*.

Moreno y col. (2006) publicaron un estudio sobre la caracterización de *E. coli* causantes de infección extraintestinal en España, en el cual relacionaron el síndrome clínico con los grupos filogenéticos. Ellos observaron que los aislados de los grupos A, B1 y B2 produjeron indistintamente cistitis, pielonefritis o sepsis, mientras que los del grupo D causaron pielonefritis en un 32% y en menor proporción cistitis (3%). En cuanto a la distribución de los genes de virulencia, reportan que el gen *papA* se encontró en el 25% de los aislados del grupo A, 23% del grupo B1, 73% del grupo B2 y 55% del grupo D. El gen *KpsMT II* se detectó

en 13% de los aislados del grupo filogenético A, 31% del grupo B1 y 84% tanto en el grupo B2 como en el D. El gen *fyuA* se encontró en 50% de los aislados del grupo filogenético A, 46% del grupo B1, 97% del grupo B2 y 74% del grupo D, mientras que el de mayor distribución fue el gen *fimH*, el cual se determinó en 79% de los aislados del grupo filogenético A, 100% tanto el grupo B1 como en el B2 y 94% en el grupo D.

Estudios sobre la prevalencia de genes que codifican toxinas en ECUP en Eslovenia, reportaron que de 110 aislados el 50% pertenecían al grupo filogenético B2, 26% al A, 19% al grupo D y 5% al grupo B1, en cuanto a la distribución de los genes de virulencia observaron que el 44% de las ECUP presentaban el gen *usp* y se encontraba con mayor frecuencia (76%) relacionado con el grupo filogenético B2 (Starcic-Erjavec y col., 2008).

Tiba y col. (2008), caracterizaron genéticamente las cepas ECUP de pacientes con cistitis en Brasil y reportaron que en las 162 cepas ECUP analizadas hubo un predominio de los genes *fimH* (97,5%), seguidos de *KpsMT II* (53,1%), el operon *pap* (32,7%) y *usp* (22,2%). El hecho de que *fimH* fue el más frecuente y que el 50,6% de ellos solo codificaban este tipo de fimbria, demuestra que la fimbria tipo 1 es un importante factor de virulencia involucrado en las ITU_{bajo}.

Takahashi y col. en el 2006 publicaron un estudio donde determinaron la distribución de los grupos filogenéticos y la prevalencia de 18 genes de virulencia, en un total de 283 cepas de ECUP aisladas de pacientes con ITU_{bajo} adquiridas a nivel hospitalario, de las cuales; 9,5% pertenecían al grupo filogenético A, 5,6% al

grupo B1, 68,5% al grupo B2 y 16,2% al grupo D. De igual manera, reportan que la frecuencia de los genes *fimH*, *pap*, *fyuA*, *KpsMT II*, *PAI* y *usp* fue de 95%, 39%, 82%, 75%, 61%, 69%, respectivamente. Dicho estudio demuestra que las cepas ECUP que causan ITU_{bajo} de origen intrahospitalario comparten propiedades similares en términos de filogenia y algunos factores de virulencia. Sin embargo, Graham y col. (2001), demuestran que ciertos genes como el *pap* no se presentan con la misma frecuencia entre las cepas ECUP que causan infecciones urinarias adquiridas en la comunidad ya que reportan a dicho gen en el 30% de las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con bacteriuria y en el 60% de las UPEC aisladas de pacientes con cistitis, ambas entidades clínicas de origen comunitario.

Pitout y col. (2005) determinaron los factores de virulencia de *E. coli* productores de β -lactamasas de tipo CTX-M aisladas en su mayoría 80% (45/56) de ITU adquiridas tanto en la comunidad como a nivel hospitalario, donde reportan que el 63% de las cepas pertenecían al grupo filogenético D, 21% al grupo B2, 4% al grupo B1 y el 13% al grupo A. Ellos también compararon el comportamiento de las cepas productoras de CTX-M con un grupo de CTX-M negativas y observaron que el gen *usp* estuvo presente en 16% (6/36) y en 32% (6/19) de las cepas respectivamente. Mientras que el gen *KpsMT II* fue más frecuente (94%) en las cepas CTX-M positivas que en las cepas CTX-M negativas (37%).

Ruppé y col. en el 2009 en Camboya, reportaron que de 34 cepas de *E. coli* productoras de CTX-M, aisladas de ITU adquiridas en la comunidad, la mayoría (53%) pertenecían al grupo filogenético B2 y en menor proporción (38%) al grupo

D, seguido del grupo A con un 6% y el grupo B1 con un 3%, de igual manera reportan que no encontraron asociación entre el grupo filogenético y el tipo de CTX-M.

2.3-HIPÓTESIS

Las cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro expandido, aisladas de pacientes con infecciones urinarias adquiridas en la comunidad del área urbana de Mérida, portan genes de virulencia *fimH*, *papAH*, *KpsMT II*, *usp*, *fyuA* y *PAI* asociados invariablemente a los grupos filogenéticos descritos (A, B1, B2 y D).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO 3: MARCO METODOLÓGICO

3.1-Tipo de estudio:

Se realizó un estudio experimental de tipo exploratorio y descriptivo, utilizando la metodología esquematizada en la figura 13.

3.2- Cepas bacterianas:

En este estudio se evaluaron 30 cepas de *E. coli* uropatógena que forman parte de la colección del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela (LMMFFB-ULA), las cuales fueron aisladas a partir de pacientes con infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad durante los años 2009-2011 en el Laboratorio de Salud Pública del Estado Mérida. Estas cepas fueron caracterizadas en un estudio previo (Hernández,2011) destacándose la presencia de genes *bla_{CTX-M-15}* en el 93,4% de las cepas, 3,3% de genes *bla_{CTX-M-32}* y otros genes como *bla_{TEM-1}* y *bla_{SHV}* se encontraron en un 3,3% de las cepas.

3.3-Reactivación y reidentificación de las cepas:

Las cepas de *E. coli* previamente descritas, se encontraban conservadas a -20 °C en caldo BHI con 20% de glicerol. La reactivación de estas cepas se realizó subcultivándolas en agar Tripticasa Soya (BBL™). Posteriormente, se cultivaron en agar MacConkey (BBL™) para comprobar su pureza. Una vez verificada la pureza de los aislamientos se procedió a comprobar su identidad bioquímica de acuerdo a los métodos convencionales y utilizando las galerías bioquímicas API®20E (bioMérieux) S.A (Winn y col.,2008). Para confirmar fenotípicamente la producción de BLEE en todas las cepas de la colección, se utilizó la técnica del sinergismo de doble disco (SDD) de acuerdo a lo descrito por el CLSI 2012 (por

sus siglas en ingles Clinical and Laboratory Standards Institute). Los discos utilizados fueron ceftazidima (30 µg) (BBLTH), amoxicilina/ácido clavulánico (75/10 µg) (OXOID) y cefotaxima (30 µg) (BBLTH), se utilizó como cepa control para los antibióticos *E. coli* ATCC 25922 y para la producción de BLEE una cepa referencia de *Klebsiella pneumoniae* Kpn29 del LMMFFB-ULA secuenciada como CTX-M-2 positiva.

3.4.- Extracción del ADN genómico:

A partir de cultivos frescos de *E. coli* en placas con agar Müeller Hinton (BBLTM), se resuspendieron varias colonias en 200 µL de agua destilada estéril y se compararon con el patrón 1 de McFarland, posteriormente dichos inóculos fueron sometidos a ebullición por 15 minutos y centrifugados por 5 minutos a 13000 r.p.m para separar el sobrenadante, y obtener el ADN genómico contenido en este, el cual se usó de inmediato para así evitar su degradación por las ADNasas.

3.5- Pruebas moleculares:

La determinación de los genes para la clasificación filogenética, así como la detección de los genes de virulencia, fueron llevadas a cabo mediante la utilización de la técnica PCR. Los protocolos utilizados en todos estos ensayos fueron optimizados en una etapa anterior, permitiendo obtener detecciones altamente sensibles, ya que se lograron amplificaciones de los genes analizados con concentraciones de ADNs en el orden de nanogramos. Las cepas control fueron obtenidas y validadas por secuenciamiento genético en esta misma etapa (Tabla 6).

Tabla 6: Cepas utilizadas como control positivo

Cepas bacterianas	Características genéticas
E02	<i>E. coli usp</i> positiva
E09	<i>E. coli</i> positiva para los genes: <i>fyuA</i> , <i>KpsMT II</i> , <i>fimH</i> , <i>PAI</i> <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y el fragmento TspE4.C2
Sc03	<i>E. coli papAH</i> positiva

3.5.1.-Determinación de los grupos filogenéticos:

Los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN TspE4.C2 fueron amplificados en una reacción de PCR múltiple utilizando las secuencias específicas descritas por Clermont y col. (2000) (Tabla 7). La mezcla de reacción estuvo compuesta por 3 μ L de agua bidestilada ultrapura, 2,5 μ L de buffer (10x), 2,0 μ L de dNTPs (10 mM), 1,5 μ L de MgCl₂ (50 mM), 0,3 μ L de *Taq* polimerasa (Biorom) (5 U/ μ L), 2,5 μ L de cada iniciador (10 pmol/ μ L) y de ADN se utilizaron 2 μ L para un volumen final de 25 μ L. Las condiciones de amplificación, fueron las descritas en la tabla 8. Como control positivo se utilizó la cepa E09.

3.5.2.-Determinación de los genes de virulencia:

La amplificación de los genes *KpsMT II*, *fimH* y *PAI* se realizó en una reacción de PCR múltiple utilizando los oligonucleótidos descritos por Chapman y col. (2006) (Tabla 7). La mezcla de reacción estuvo compuesta por 3 μ L de agua bidestilada ultrapura, 2,5 μ L de buffer (10x), 2,0 μ L de dNTPs (10 mM), 1,5 μ L de MgCl₂ (50 mM), 0,3 μ L de *Taq* polimerasa (Biorom) (5 U/ μ L), 2,5 μ L de cada iniciador (10

pmol/μL) excepto para el *fimH* que se utilizaron 2 μL y de ADN se utilizaron 2 μL para un volumen final de 25 μL. Las condiciones de amplificación están descritas en la tabla 8. Como control positivo se utilizó la cepa E09.

Finalmente los genes *papAH*, *usp* y *fyuA* se amplificaron en una PCR simple cada uno, utilizando las secuencias descritas por Xia y col. (2011); Nakano y col. (2001) y Chapman y col. (2006) respectivamente (Tabla 7). En este caso las mezclas de reacción estuvieron compuestas por 13 μL de agua bidestilada ultrapura, 2,5 μL de buffer (10x), 1,5 μL de dNTPs (10 mM), 1,5 μL de MgCl₂ (50 mM), 0,2 μL de *Taq* polimerasa (Biorom) (5 U/μL), 2,5 μL de cada iniciador (10 pmol/μL) y 3 μL de ADN para un volumen final de 25 μL. Las condiciones de amplificación fueron las descritas en la tabla 8. Las cepas Sc03, E02 y E09 se utilizaron como control positivo para los genes *papAH*, *usp* y *fyuA*, respectivamente.

3.6- Visualización de los amplicones:

Los productos amplificados se observaron realizando una corrida electroforética en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (0,5 mg/ml), como buffer de corrida se utilizó tris acetato EDTA (TAE) 1X, posteriormente fueron fotografiados con el sistema iluminador y cámara UVP Biodoc-it System. El tamaño de los amplicones se comparó con un marcador de peso molecular de 100 pb y 1000 pb (Bioneer).

Tabla 7: Características de los oligonucleótidos empleados para amplificar los genes de virulencia y los genes utilizados en la agrupación filogenética de ECUP.

Gen o fragmento de ADN	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del amplicón	Referencia	
<i>chuA</i>	chuA 1	5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3'	279 pb	Clermont y col.,2000	
	chuA 2	5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'			
<i>yjaA</i>	yjaA 1	5'-TGAAGTGTGTCAGGAGACGCTG-3'	211 pb		
	yjaA 2	5'-ATGGAGAATGCGTTCTCAAC-3'			
TspE4.C2	TspE4.C2 1	5'-GAGTAATGTCTGGGGCATTCA-3'	152 pb		
	TspE4.C2 2	5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'			
<i>KpsMT II</i>	KpsMTIIFw	5'-GCGCATTTGCTGATACTGTTG-3'	272 pb		Chapman y col.,2006
	KpsMTIIRw	5'-CATCCAGACGATAAGCATGAGCA-3'			
<i>fimH</i>	fimHFw	5'- TGCAGAACGGATAAGCCGTGG-3'	508 pb		Chapman y col.,2006.
	fimHRw	5'- GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA-3'			
<i>PAI</i>	PAIFw	5'- GGACATCCTGTTACAGCGCGCA-3'	930 pb	Chapman y col.,2006	
	PAIRw	5'-TGCCCACCAATCACAGCCGAAC-3'			
<i>papAH</i>	papAHFw	5'-ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG-3'	720 pb	Xia y col.,2011.	
	papAHRw	5'-CGTCCCACCATACGTGCTCTTC-3'			
<i>Usp</i>	uspFw	5'-ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT-3'	1000 pb	Nakano y col., 2001	
	uspRw	5'-CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAAT-3'			
<i>fyuA</i>	fyuAFw	5'-TGATTAACCCCGCGACGGGAA-3'	880 pb	Chapman y col.,2006	
	fyuARw	5'-CGCAGTAGGCACGATGTTGTA-3'			

Tabla 8: Condiciones utilizadas en la amplificación por PCR.

Genes	Condiciones
<i>chuA</i> <i>yjaA</i> TspE4.C2	94°C 5min 1x ----- 94 °C 1min 55 °C 1min 30x 72 °C 1min ----- 72 °C 7min 1x
<i>KpsMT II</i> <i>fimH</i> <i>PAI</i>	94°C 5min 1x ----- 94 °C 1min 63 °C 1min 30x 72 °C 1min ----- 72 °C 7min 1x
<i>papAH</i>	94°C 5min 1x ----- 94 °C 1min 53 °C 1min 30x 72 °C 1min ----- 72 °C 7min 1x
<i>usp</i>	94°C 5min 1x ----- 94 °C 1min 57 °C 1min 30x 72 °C 1min ----- 72 °C 7min 1x
<i>fyuA</i>	94°C 5min 1x ----- 94 °C 1min 63 °C 1min 30x 72 °C 1min ----- 72 °C 7min 1x

LMMFFB-ULA: Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

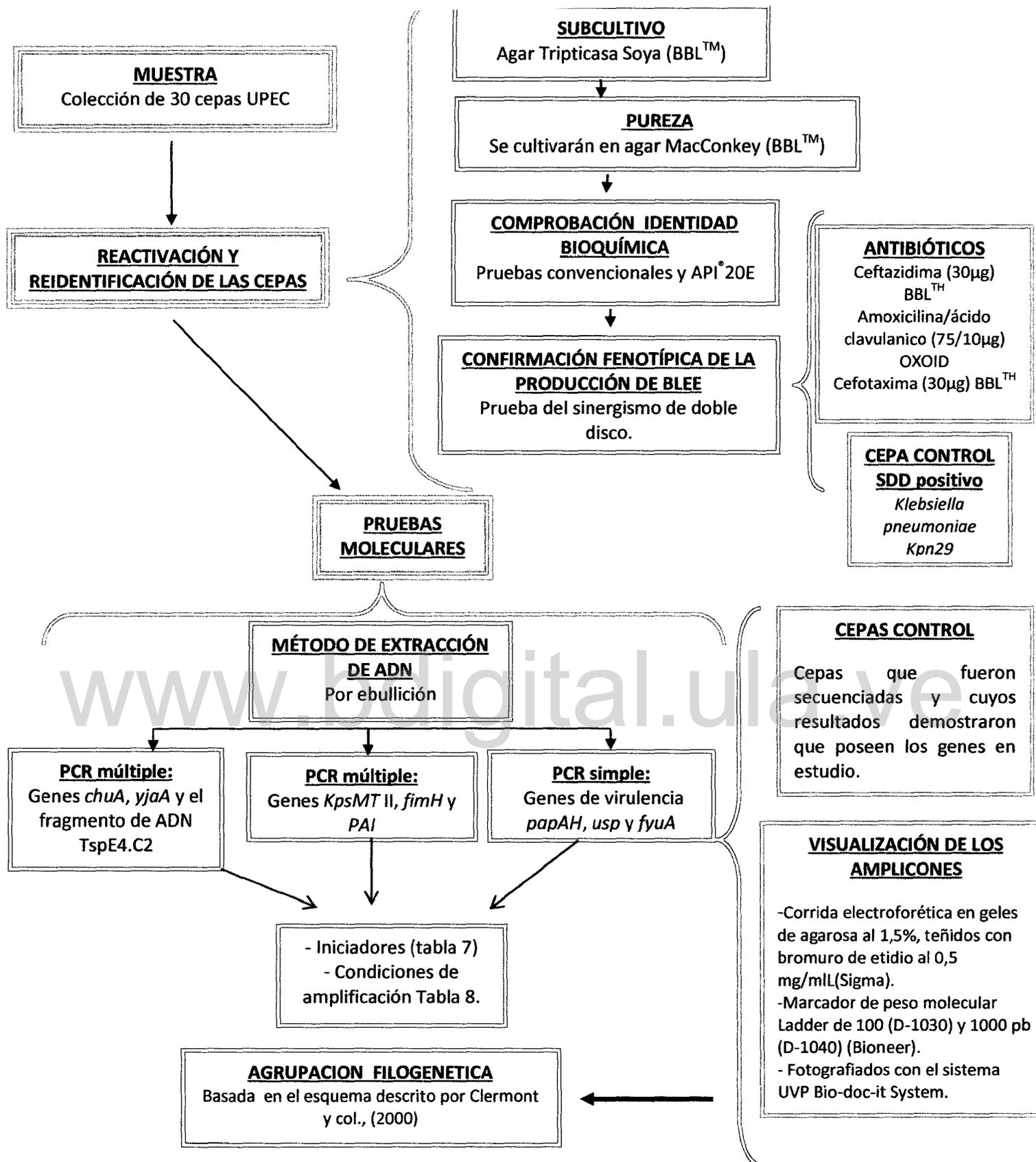


Figura 13: Diagrama metodológico.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1- Reactivación y reidentificación de las cepas:

En el proceso de reidentificación de las cepas en estudio mediante pruebas convencionales y galerías API 20E, se pudo observar que el 100% de las cepas eran fermentadoras de la lactosa, oxidasa negativas, productoras de indol a partir de triptófano, decarboxilaban la lisina, ureasa, citrato y reacción de Voges-Proskauer negativas, confirmando de esta manera que eran cepas de *E. coli*.

De igual manera, mediante la técnica del sinergismo de doble disco (SSD) se pudo observar, tanto en la cepa control positivo como en el 100% de las cepas analizadas, un ensanchamiento del halo de inhibición de los discos de ceftazidima y cefotaxima en presencia de amoxicilina/ácido clavulánico, lo que indica que todas las cepas en estudio eran productoras de BLEE.

4.2.- Determinación de los grupos filogenéticos mediante la amplificación por PCR de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN TspE4.C2:

Todas las muestras y los controles fueron sometidos a la detección de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN TspE4.C2, visualizándose en el control positivo señales de 279 pb, 211 pb y 152 pb, respectivamente (Figura 14). En el 47% de las cepas analizadas se observó la combinación de los genes *chuA* y *yjaA*, el 50% fueron negativas tanto para el gen *chuA* como para el fragmento de ADN TspE4.C2 y solo el 3% fueron positivas para el gen *chuA* y negativas para el gen *yjaA*. Según estos resultados y de acuerdo al esquema dicotómico propuesto por Clermont y col. (2000) las cepas se distribuyeron en los siguientes grupos

filogenéticos: 50% (15/30) en el grupo A, 47% (14/30) en el B2 y 3% (1/30) en el grupo D, para el grupo filogenético B1 no se detectó ninguna cepa (Figura 15).

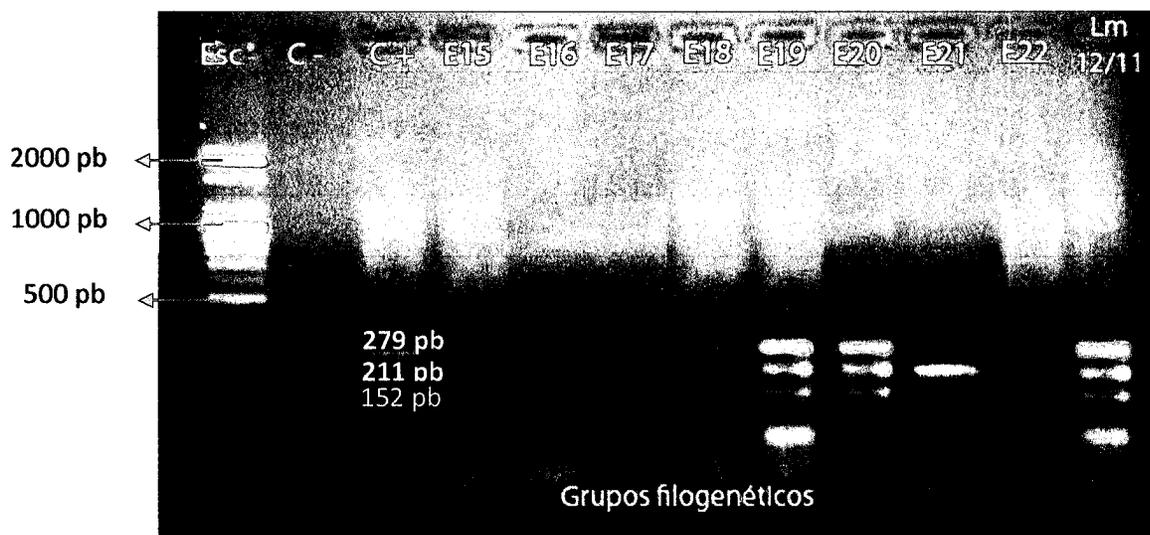


Figura 14: Cepas ECUP representantes de los grupos filogenéticos determinados por PCR múltiple. Esc: Escalera de 100 pb; C- : Control negativo; C+: Control positivo; E15, E18, E19, E20, E22 y Lm12/11: Cepas de *E. coli* positivas para los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento TspE4.C2; E16, E17 y E21: Cepas de *E. coli* positivas para el gen *yjaA*.

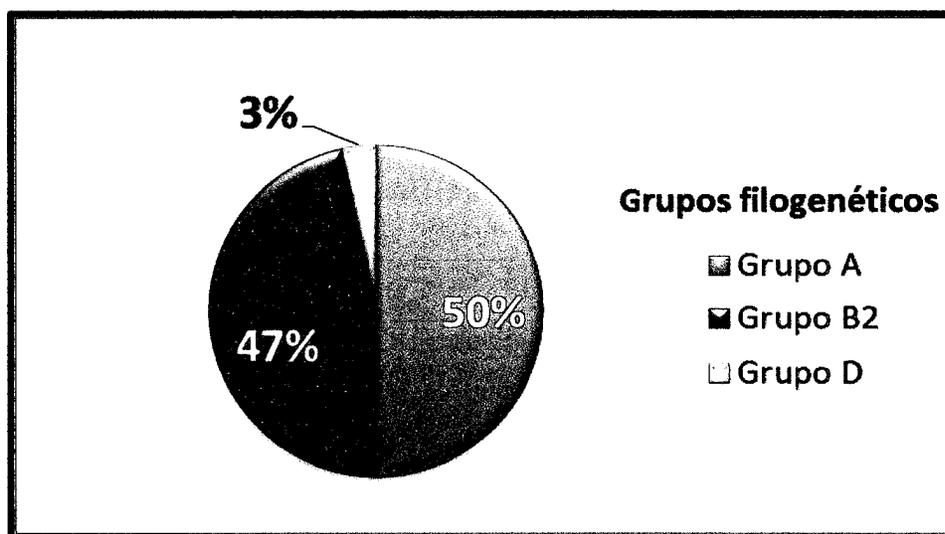


Figura 15: Distribución de los grupos filogenéticos en cepas ECUP.

4.3- Determinación molecular de los genes de virulencia *fyuA*, *fimH*, *PAI*, *papAH*, *usp* y *KpsMT II*:

En cada una de las PCRs utilizadas para la determinación de los genes *usp*, *papAH*, *fyuA*, *PAI*, *fimH* y *KpsMT II*, se observaron en los controles positivos amplificadas de 1000 pb, 720 pb, 880 pb, 930 pb, 508 pb y 272 pb respectivamente (Figura 16), para las muestras en estudio se determinó que el 80% (24/30) de las cepas ECUP fueron positivas para al menos uno de los genes de virulencia en estudio, mientras que en el 20% (6/30) de dichas cepas no se detectaron los genes investigados. Del 80% de las cepas positivas, 50% (15/30) presentaron más asociaciones de genes entre ellos, mientras que en el 30% (9/30) no hubo asociación de genes, detectándose un solo un factor de virulencia en ese grupo de cepas (Figura 17).

Realizando la distribución de la frecuencia de los diferentes genes de virulencia estudiados, se pudo determinar que los de mayor presencia en las cepas analizadas fueron el gen *fyuA* con un 66,7% y el gen *fimH* con un 53,3%, seguidos por los genes *KpsMT II*, *usp* y *PAI* con un 36,7%, 26,7% y 20% respectivamente, mientras que el gen detectado con menor frecuencia fue *papAH* con un 6,7% (Figura 18).

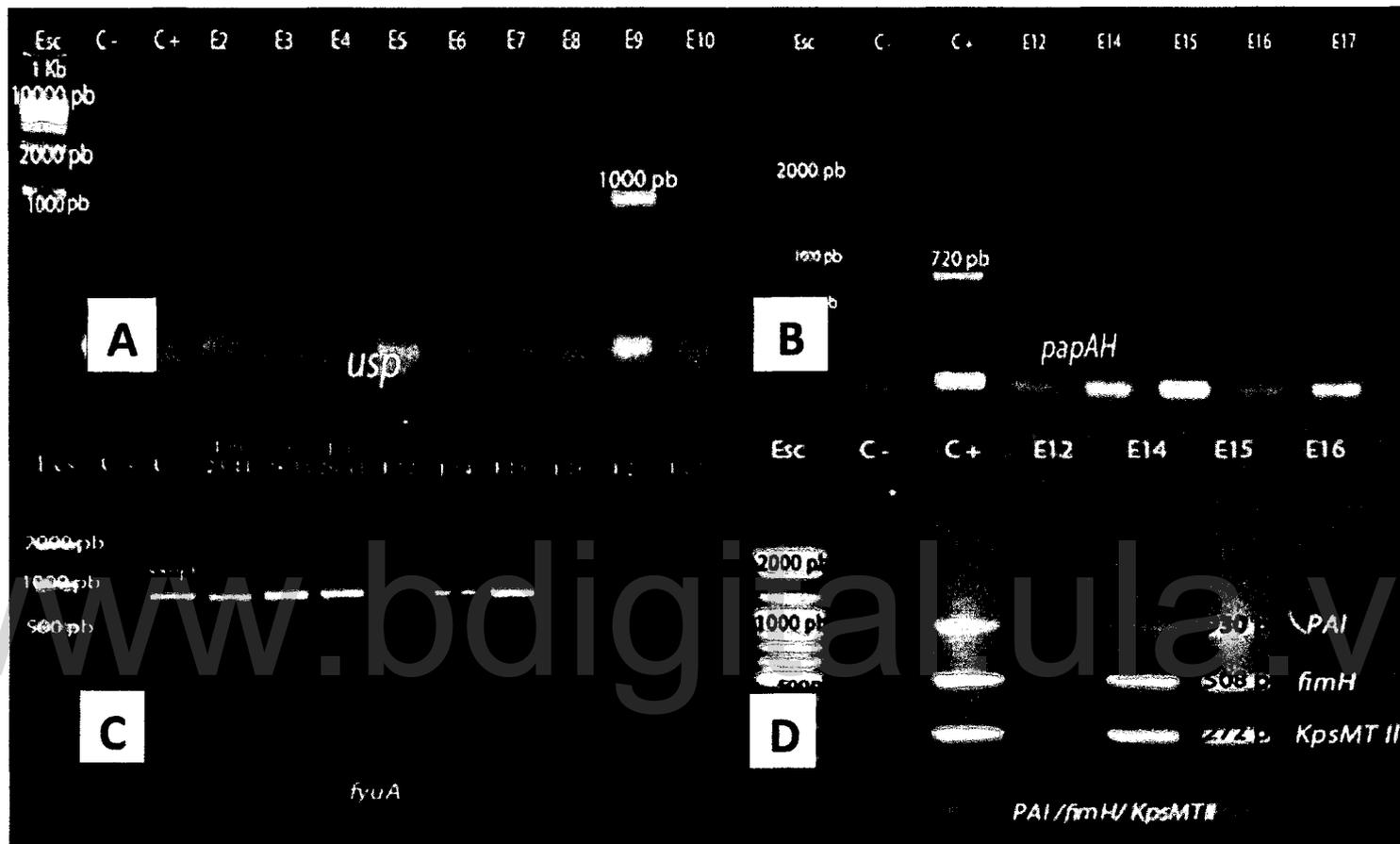


Figura 16: PCRs simples y múltiples para determinar genes de virulencia en cepas ECUP. **A: PCR simple para determinar el gen *usp*.** Esc 1Kb: Escalera de 1000 pb; C-: Control negativo; C+: Control positivo; E2 y E9: Cepas de *E.coli* positivas; E3, E4, E5, E6, E7, E8, E10: Cepas de *E. coli* negativas. **B: PCR simple para determinar el gen *papAH*.** Esc: Escalera de 100 pb; C-: Control negativo; C+: Control positivo; E17: Cepa de *E. coli* positiva; E12, E14, E15, E16: Cepas de *E. coli* negativas. **C: PCR simple para determinar el gen *fyuA*.** Esc: Escalera de 100 pb; C-: Control negativo; C+: Control positivo; Lm23/11, Lm28/11, Lm29/11, E14, E15, E16: Cepas de *E. coli* positivas; E12, E21, E22: Cepas de *E. coli* negativas. **D: PCR múltiple para determinar los genes *PAI*, *fimH*, *KpsMT II*.** Esc: Escalera de 100 pb; C-: Control negativo; C+: Control positivo; E14 y E15: Cepas de *E. coli* positivas; E12, E16: Cepas de *E. coli* negativas.

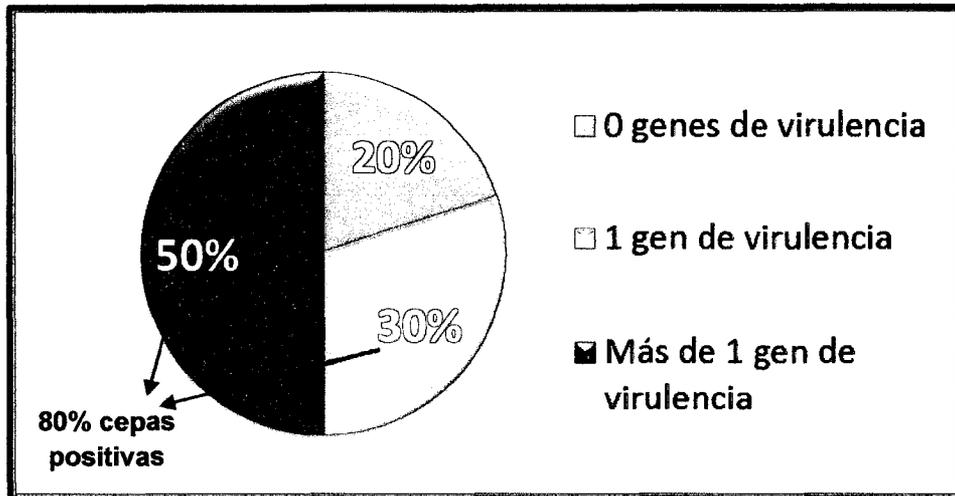


Figura 17: Distribución del número de genes de virulencia en cepas ECUP.

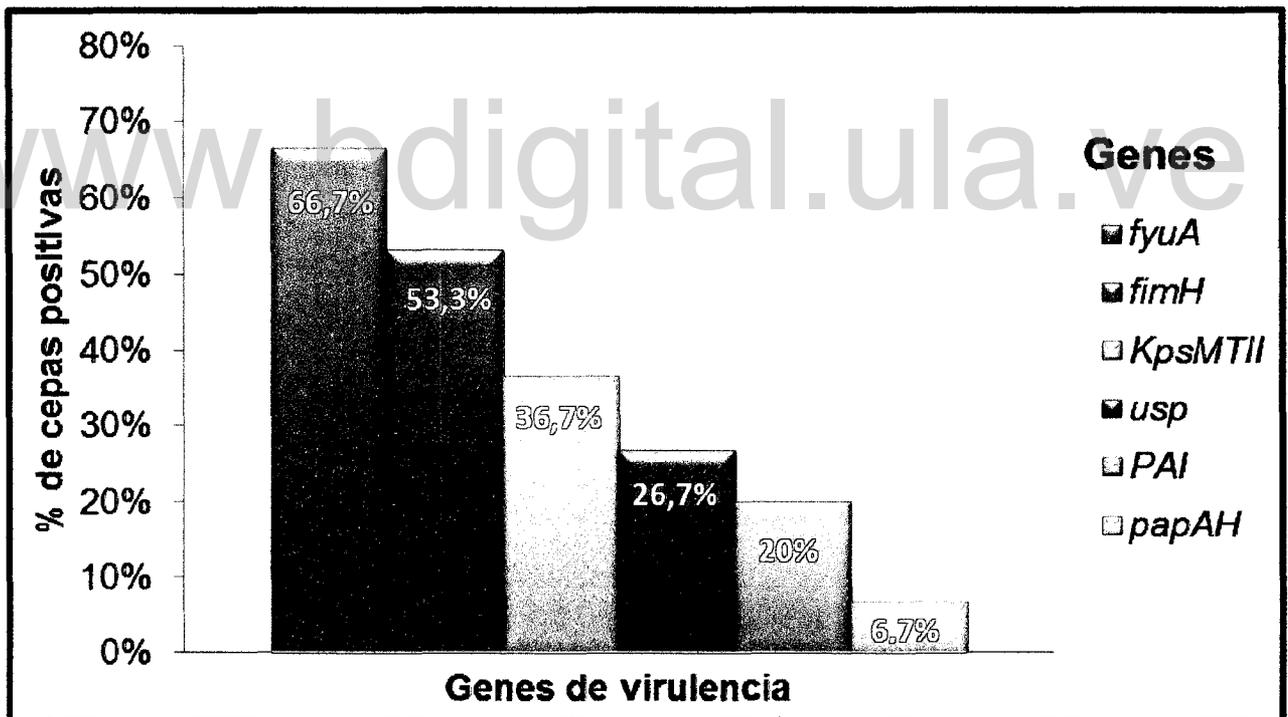


Figura 18: Distribución de la frecuencia de los diferentes genes de virulencia estudiados en cepas ECUP.

4.4- Distribución de los genes de virulencia en los grupos filogenéticos de las cepas ECUP analizadas:

Con base en los resultados obtenidos se analizó la asociación de los grupos filogenéticos con los genes de virulencia detectados en las cepas ECUP estudiadas pudiéndose observar que en las cepas del grupo filogenético B2 se detectaron todos los genes de virulencia investigados, seguido en orden de frecuencia las cepas del grupo A presentaron 4 factores de virulencia de los seis investigados y solo tres de estos genes fueron detectados en las cepas del grupo D. De igual manera se pudo observar que los genes *fyuA* y *fimH* estuvieron presente en todos los grupos filogenéticos, mientras que los genes *PAI* y *papAH* sólo se detectaron en las cepas de los grupos filogenéticos A y B2, el gen *usp* en las cepas del grupo B2 y el gen *KpsMT II* en las cepas de los grupos B2 y D (Tabla 9)

Tabla 9: Distribución de los genes de virulencia en los grupos filogenéticos de cepas ECUP.

Gen de virulencia	GRUPOS FILOGENÉTICOS		
	A (15 cepas)	B2 (14 cepas)	D (1 cepa)
<i>fyuA</i>	7 (46.7%)	12 (85.7%)	1 (100%)
<i>fimH</i>	4 (26.7%)	11 (78.5%)	1 (100%)
<i>PAI</i>	1 (6.7%)	5 (35.7%)	0 (0%)
<i>papAH</i>	1 (6.7%)	1 (7.1%)	0(0%)
<i>usp</i>	0 (0%)	8 (57.1%)	0 (0%)
<i>KpsMT II</i>	0 (0%)	10 (71.4%)	1 (100%)

Sideróforo yersineabactina (*fyuA*), fimbria tipo 1(*fimH*), isla de patogenicidad (*PAI*), fimbria P (*papAH*), proteína uropatógena específica (*usp*), cápsula tipo II (*KpsMT II*).

4.5.- Perfil de genes de virulencia:

Al analizar el número de genes de virulencia presentes en las cepas estudiadas, se pudieron establecer 6 patrones genotípicos y de acuerdo al perfil de asociación de dichos genes se establecieron dos variantes para cada patrón, excepto para el patrón I (Tabla 10). El patrón genotípico detectado con mayor frecuencia en las cepas ECUP estudiadas fue el patrón II con un 30,1%, estando constituido por cepas que presentaron un solo gen de patogenicidad, pudiendo ser el gen *fyuA* (Patrón IIa) o el gen *fimH* (Patrón IIb). El segundo patrón genotípico más frecuente, fue el V con un 26,7%, este se correspondió al grupo de cepas ECUP que presentaron 4 genes de virulencia con sus variantes Va:*usp-fyuA-KpsMTII-fimH* y Vb:*fyuA-KpsMTII-PAI-fimH*. En menor frecuencia se observaron los patrones genotípicos I con un 20%, el III con un 10% y los patrones IV y VI con un 6,6 % cada uno.

La relación de la distribución de los patrones genotípicos, los grupos filogenéticos y el perfil de BLEE en las cepas ECUP analizadas se describen en la tabla 11, donde se muestra que aunque no hubo una distribución particular de los factores de virulencia, el grupo filogenético y el tipo de β -lactamasa producido, se pudo demostrar que las cepas ECUP del grupo filogenético A se ubican principalmente en los patrones genotípicos correspondientes a los de menor número de genes de virulencia, mientras que el B2, tuvo una tendencia a ubicarse en los patrones más complejos que contenían hasta 5 genes de virulencia y la única cepa ECUP del grupo D se ubicó en el patrón IVb, caracterizado por 3 genes de virulencia.

Tabla 10: Distribución de los perfiles de genes de virulencia en las cepas ECUP.

N° Genes de virulencia	Perfil de genes	Patrón genotípico					
		Tipo	Var.	N°	Total N°	%	Total %
0	-	I	I	6	6	20	20
1	<i>fyuA</i>	II	IIa	5	9	16,8	30,1
	<i>fimH</i>		IIb	4		13,3	
2	<i>fyuA-PAI</i>	III	IIIa	2	3	6,7	10
	<i>fyuA-fimH</i>		IIIb	1		3,3	
3	<i>fyuA-PAI-papAH</i>	IV	IVa	1	2	3,3	6,6
	<i>fyuA-KpsMTII-fimH</i>		IVb	1		3,3	
4	<i>usp-fyuA-KpsMTII-fimH</i>	V	Va	6	8	20	26,7
	<i>fyuA-KpsMTII-PAI-fimH</i>		Vb	2		6,7	
5	<i>usp-fyuA-KpsMTII-PAI-fimH</i>	VI	VIa	1	2	3,3	6,6
	<i>usp-fyuA-KpsMTII-fimH-papAH</i>		VIb	1		3,3	

Var.: Variantes de los patrones genotípicos.

Tabla 11: Relación de la distribución de los patrones genotípicos, grupos filogenéticos y perfil de BLEE en cepas ECUP.

Grupos Filogenéticos	Tipos de BLEE		Patrón genotípico										Total		
			I	Ila	Ilb	IIla	IIlb	IVa	IVb	Va	Vb	VIa		VIb	
A	CTX-M-15	N° de cepas %	5 16,7%	5 16,7%	3 10,0%		1 3,3%	1 3,3%						15 50,0%	
	Total N° de cepas Total %		5 16,7%	5 16,7%	3 10%		1 3,3%	1 3,3%						15 50%	
B2	CTX-M-15	N° de cepas %	1 3,3%			2 6,7%					5 16,7%	2 6,7%	1 3,3%	1 3,3%	12 40%
	CTX-M-32	N° de cepas %								1 3,3%				1 3,3%	
	TEM y SHV	N° de cepas %			1 3,3%									1 3,3%	
	Total N° de cepas Total%		1 3,3%		1 3,3%	2 6,7%					6 20%	2 6,7%	1 3,3%	1 3,3%	14 46,6%
D	CTX-M-15	N° de cepas %							1 3,3%					1 3,3%	
	Total N° de cepas Total %								1 3,3%					1 3,3%	

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

E. coli es el agente causal más frecuentemente aislado en las ITU (80%) (Starcic-Erjavec y col.,2008; Tiba y col.,2008), generando una importante morbilidad principalmente en mujeres con un 80%, mientras que en los hombres es 20% (Montiel y col.,2011). Las cepas causantes de dichas infecciones son un grupo genéticamente heterogéneo debido a que poseen una variedad de factores de virulencia y estrategias que facilitan la colonización, invasión y persistencia dentro del tracto urinario (Tiba y col.,2008; Wiles y col.,2008). Este panorama se ve agravado por el hecho de que las cepas de *E. coli* productoras de BLEE, a pesar de estar tradicionalmente asociadas a infecciones hospitalarias, en los últimos años se han aislado con mayor frecuencia en ITU adquiridas en la comunidad (ITU-com) (Ruppé y col.,2009; Hernández,2011).

La intervención en la prevención de las infecciones extraintestinales por *E. coli* requiere del conocimiento de la capacidad patogénica de *E. coli* durante una ITU, la cual, se puede predecir tanto por los antecedentes filogenéticos de la bacteria, como por el perfil de los factores de virulencia que esta posea (Johnson y Stell,2000).

En este estudio, que es el primero en su estilo, donde se analizó una colección de 30 cepas de *E. coli* productoras de BLEE en su mayoría (96,7%) de tipo CTX-M provenientes de pacientes con ITU_{bajo} adquiridas en la comunidad, se pudo determinar que hubo una distribución homogénea de las cepas ECUP estudiadas entre los grupos filogenéticos A y B2, ya que pertenecían en un 50% al grupo A y un 47% al B2, este resultado difiere relativamente con lo reportado por Takahashi y col. (2006), Starcic-Erjavec y col. (2008) y Ruppe y col. (2009), quienes refieren

en sus respectivos estudios que las cepas ECUP pertenecen en su mayoría al grupo filogenético B2. Sin embargo, los resultados aquí presentados se correlacionan con los reportados por Moreno y col. (2006), demostrando que a pesar de que tradicionalmente se ha establecido que las cepas del grupo filogenético A son cepas comensales (Xia y col.,2011; Pitou,2012), estas cepas ECUP pueden producir ITU. Las diferencias en la capacidad patogénica de las cepas del grupo filogenético A puede explicarse por el número o tipo de genes de virulencia que posea la bacteria y por el hecho de que dichos genes se encuentran contenidos en islas de patogenicidad que pueden transmitirse o no de una cepa a otra (Fernández y col.,2004, Schmidt y Hensel,2004).

La amplia distribución de los genes *fyuA*, *fimH*, *PAI*, *papAH*, *usp* y *KpsMT II* observada en este estudio (80%) y el hecho de que dichas cepas contengan genes *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* y *bla_{SHV}* (Hernández,2011), indican que existe una carga de factores de virulencia importante que le permiten a estas ECUP ejercer su papel patógeno en el tracto urinario de pacientes de la comunidad. Por otro lado, es importante señalar que en el 20% de las cepas ECUP analizadas en las cuales no se detectaron ninguno de los genes en estudio, pudieran portar otros genes de virulencia no investigados en este trabajo y que justifican su capacidad para producir ITU.

El análisis de la distribución de cada uno de los genes de patogenicidad estudiados en las cepas ECUP demostró que el gen más frecuente (66,7%) fue el *fyuA*, el cual codifica para el sideróforo yersiniabactina. Este resultado es avalado por otros estudios (Moreno y col.,2006; Takahashi y col.,2006) donde también reportan el

gen *fyuA* como uno de los más prevalentes (66,8% - 82,0%) en cepas ECUP que causan ITU. La amplia distribución de este gen se explica por la necesidad de *E. coli* de poseer factores de virulencia que le faciliten la utilización del hierro del hospedero para poder crecer y multiplicarse en el tracto urinario (Brooks y col.,2008; Winn y col.,2008).

Otro de los genes investigados en las ECUP analizadas, fue el gen *fimH* que codifica la fimbria tipo 1 en *E. coli*. A pesar de que fue el segundo más frecuente (53,3%) dicho porcentaje es similar a lo reportado en otros estudios por Moreno y col. (2006) (86,5%), Takahashi y col. (2006) (95%) y Tiba y col. (2008) (97,5%), lo que demuestra que la fimbria tipo 1 es uno de los factores de virulencia más importantes para el desarrollo de una ITU.

La baja frecuencia del gen *papAH* (6,7%) en la colección de ECUP estudiada, concuerda con lo reportado por Takahashi y col. (2006) y Tiba y col. (2008), quienes indican que el gen *papAH* fue el menos frecuente (32,7% y 39% respectivamente) en cepas ECUP causantes de ITU, esto se explica por el hecho de que la colección de cepas analizadas tanto en este estudio como en los de Takahashi y col. (2006) y Tiba y col. (2008), provenían de pacientes con ITU_{bajo}. La base fundamental de dicha explicación es que los receptores para las fimbrias P (*papAH*) se encuentran en mayor proporción en el riñón y no el tracto urinario bajo (Edmody y col.,2003).

En la colección de ECUP analizadas, otro de los genes detectados con baja frecuencia (26,7%) fue el gen *usp*, lo que se correlaciona con lo reportado por Tiba y col. (2008) en cepas ECUP aisladas de pacientes con cistitis en Brasil (22.2%),

sin embargo, estos hallazgos difieren con lo reportado en otros países como Japón y Eslovenia por Kurazono y col. (2000) (80%) y Starcic-Erjavec y col. (2008) (44%) respectivamente, lo que evidencia una clara variación en la distribución de este gen en los diferentes continentes. Esta variación geográfica apoya lo referido por Tiba y col. (2008) y Wiles y col. (2008) quienes refieren que las cepas ECUP son un grupo genéticamente heterogéneo ya que los genes que codifican los factores de virulencia en *E. coli* están localizados en islas de patogenicidad que se pueden transmitir vertical y/u horizontalmente de una cepa a otra facilitando así dicha variabilidad. Otros autores (Pitou y col.,2005) observaron diferencias en la distribución del gen *usp* de acuerdo a la presencia o no de los genes *bla_{CTX-M}*, siendo menos frecuente (16%) en cepas CTX-M positivas, esto puede explicar la baja frecuencia del gen *usp* en la colección de cepas ECUP analizadas en este estudio ya que el 96,7% de ellas eran CTX-M positivas. La relación entre la positividad de las CTX-M con la baja frecuencia del gen *usp* puede ser por la pérdida de algún fragmento de ADN que contenga el gen *usp* al adquirir los genes *bla_{CTX-M}*. En estudios realizados en Venezuela (Quiroz,2012) en cepas de *E. coli* productoras de septicemia nosocomial, se puede observar que también existen diferencias en la distribución del gen *usp* según el patotipo de la cepa estudiada, ya que en dicho estudio reportan una distribución para este gen de 4,5%, siendo mucho menor a lo reportado en la colección de cepas ECUP estudiadas.

Al analizar los resultados obtenidos en la asociación de los grupos filogenéticos con los genes de virulencia detectados en las cepas ECUP en estudio, se establece que los genes *fyuA* y *fimH* son importantes para el desarrollo de ITUs

adquiridas en la comunidad ya que dichos genes fueron detectados en todos los grupos filogenéticos de las ECUP analizadas. Por otro lado, se puede decir que los genes *usp* y *KpsMT II* no fueron importantes para el establecimiento de ITUs, ya que los mismos no se detectaron en las cepas del grupo filogenético A pero si en las cepas del grupo B2. Esto explicaría por qué las cepas del grupo A son consideradas, menos patógenas que las del grupo B2 (Xia y col.,2011; Pitou,2012). Sin embargo, los resultados aquí presentados dejan claro que las cepas del grupo filogenético A tuvieron la misma capacidad que las cepas del grupo filogenético B2 y D para causar ITU en pacientes comunitarios.

De acuerdo a los perfiles genotípicos establecidos se observó que la asociación más frecuente (20%) fue la del perfil *Va:usp-fyuA-KpsMTII-fimH*. Esto no se correlaciona con lo reportado por Quiroz (2012) en Venezuela, ya que su estudio indica al perfil *Vb:fyuA-KpsMTII-PAI-fimH* como el más frecuente, lo que demuestra que son cepas con carga genética diferente, esta variabilidad se debe a que las cepas analizadas por Quiroz (2012) están relacionadas a pacientes hospitalarios con historia de septicemia nosocomial y fueron aisladas en otra región del país, por lo tanto expresan otro tipo de factores de virulencia para producir dicha patología.

La asociación entre el perfil genotípico y el grupo filogenético de las cepas ECUP analizadas confirmó una vez más que las cepas de los grupos filogenéticos B2 y D contienen más número de genes de virulencia que las cepas del grupo A. Esto se correlaciona con lo reportado por Soto (2006) y Moreno y col. (2006), quienes señalan la misma relación, lo que indica que las cepas ECUP del grupo A, a pesar

de contener menos genes de virulencia son igualmente capaces de causar una ITU y que dicha capacidad pudiera estar relacionada con la presencia de otros genes no investigados en este estudio o con otros factores dependientes de los pacientes y no con el número de genes que estas posean.

Los hallazgos de este estudio representan un aporte importante en el ámbito científico venezolano, ya que por primera vez en este país se reportan las características genéticas que describen la potencialidad patogénica relacionada a los grupos filogenéticos en cepas ECUP causantes de ITU a nivel de la comunidad, esto permite conocer mejor la carga genética de las cepas que circulan en nuestro medio y en un futuro poder aplicar medidas de prevención más eficaces para disminuir la frecuencia de este tipo de enfermedad causada *por E.*

coli en la población.

www.bdigital.ula.ve

CONCLUSIONES

1.- Mediante la amplificación por PCR de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN TspE4.C2 se logró la determinación de los grupos filogenéticos en el grupo de cepas ECUP analizadas causantes de ITU adquiridas en el área urbana de Mérida, las cuales se distribuyeron indistintamente en los grupos filogenéticos A y B2 y en menor proporción en el grupo D.

2.- Mediante las reacciones de PCRs optimizadas para este estudio se lograron determinar los genes de virulencia *KpsMT II*, *fimH*, *PAI*, *fyuA*, *usp* y *papAH* en la colección de cepas ECUP analizadas, siendo los genes *fyuA* y *fimH* los más prevalentes y el menos frecuente el gen *papAH*.

3.- El gen de virulencia *fyuA* fue el de mayor distribución entre los grupos filogenéticos A, B2 y D, además se observaron diferencias importantes en la prevalencia de los genes *usp* y *KpsMT II* en las cepas de los grupos filogenéticos A y B2.

4.- La mayoría de las ECUP analizadas presentaron el patrón Ila que corresponde a la presencia del gen de virulencia *fyuA*, mientras que en las cepas donde se observaron agrupaciones de genes, el más frecuente fue el perfil Va: *usp-fyuA-KpsMTII-fimH*.

5.- La asociación del perfil patogénico y los grupos filogenéticos arrojó que las cepas ECUP del grupo A tenían menos genes asociados que las cepas de los grupos B2 y D, además las 29 cepas ECUP que contenían genes *bla_{CTX-M}* se

distribuyeron invariablemente en los diferentes patrones genotípicos y grupos filogenéticos detectados en las ECUP analizadas.

www.bdigital.ula.ve

RECOMENDACIONES

Referidas al trabajo:

1.- Complementar los estudios de cepas de *E. coli* multirresistentes con la investigación molecular de genes de virulencia y sus grupos filogenéticos, así como relacionarlos con los factores predisponentes del hospedero y el síndrome clínico específico que causan.

2.- Incluir cepas bacterianas de origen hospitalario.

Generales:

1.- Establecer estrategias epidemiológicas y medidas de higiene para controlar la diseminación de cepas con grandes cargas genéticas virulentas hacia la comunidad ya que pueden empeorar el panorama de morbilidad en este grupo poblacional.

2.- Mantener bajo vigilancia epidemiológica las cepas ECUP aisladas en la comunidad de Mérida, para detectar a tiempo cualquier cambio en su comportamiento como cepas patógenas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambler, R.(1980). The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 289:321-231.

Bauernfeind, A.; Grimm, H. y Schweighart, S.(1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*,18:294-298.

Bien, J.; Sokolova, O. y Bozko, P.(2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Inter J Nephro*,2012:1-15.

Blattner, F.; Plunkett, G.; Bloch, C.; Perna, N.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J.; Rode, C.; Mayew, G.; Gregor, J.; Davis, N.; Kirkpatrick, H.; Goeden, M.; Rose, D.; Mau, B. y Shao, Y.(1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*,277:1453-461.

Bonacorsi, S.; Clermont, O.; Tinsley, C.; Le Gall, I.; Beaudoin, J.; Elion, J.; Nassif, X. y Bingen, E.(2000). Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. *Infect Immun*,68(4):2096-2101.

Brooks, G.; Carroll, K.; Butel, J. y Morse, S.(2008). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick Y Adelberg*.(19a. edición). España: Manual Moderno.

Bush, K.; Jacoby, G. Y Medeiros, A.(1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(6):1211-1233.

Bush, K. y Jacoby, G.(2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*,54(3):969-976.

Caicedo, P.; Martínez, T.; Meneses, E.; Joaqui, W.; Imbachi, R.; Mahe, D. y Ramírez, E.(2009). Etiología y resistencia bacteriana en infección de vías urinarias en el Hospital Universitario San José de Popayán, Colombia entre enero y diciembre de 2008. *Urol Colomb*,18(3):45-52.

Calvo, J. y Martínez, L.(2009). Mecanismo de acción de los antimicrobianos. *Emferm infecc Microbiol Clin*,27(1):44-52.

Cantón, R.; González-Alba, J. y Galán, J.(2012). CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol*,3(110):1-19.

Cañavate, C.; Cacho, J.; Coira, A.; Lepe, J. y Domingo, A.(2010). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario.[En línea] Disponible en URL:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap14a.asp>.

Carniel, E.(2001). The Yersinia high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infect*,3:561-569.

Chambers, C.; McIntyre, D.; Mouck, M. y Sokol, P.(1996). Physical and structural characterization of yersiniophore, a siderophore produced by clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Biometals*,9:157-167.

Chapman, T.; Wu, X.; Barchia, I.; Bettelheim, K.; Driesen, S.; Trott, D.; Wilson, M. y Chin, J. (2006). Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol*,72(7):4782-4795.

Clermont, O.; Bonacorsi, S. y Bingen, E.(2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*,66(10):4555-8.

Cordiés, L.; Dr. Machado, L. y Hamilton, M.(1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Act Med*,8(1):13-27.

Cortés, J.; Urdaneta, A.; Potdevin, G.; Cuervo, S.; Bermúdez, D.; Molina, C. y Arroyo, P.(2006). Impacto de las β -lactamasas de espectro extendido en pacientes con cáncer. *Rev Colomb Cancerol*,10(3):183-196.

Costa, J.(2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*,22(5):299-305.

Crosa, J. y Walsh, C.(2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*,66(2):223.

Datta, N. y Kontomichalou, P.(1965). Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nat*,208:239-41.

Dhakal, R.; Kulesus, R. y Mulvey, M. (2008). Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur J Clin Invest*,38(S2):2-11.

Drechsel, H.; Stephan, H.; Lotz, R.; Haag, H.; Zähler, H.; Hantke, K. y Jung, G.(1995). Structure elucidation of yersiniabactin, a siderophore from highly virulent *Yersinia* strains. *Liebigs Ann*:1727-1733.

Dutta, P.; Cappello, R.; Navarro-García, F. y Nataro, J.(2002). Functional comparison of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*. *Infec and Immu*,70(12):7105-7113.

Edmody, L.; Kerényi, M. y Nagy, G.(2003). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Inter J Antimicrob Agents*,22:29-33.

Fernández, S.; Alonso, G y Toro, E. (2004). Estructura de mosaico del cromosoma bacteriano: Islas patogénicas. *INHRR*,35(2):20-31.

Fischbach, M.; Hening, A.; Liu, D. y Walsh, C.(2005). *In vitro* characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *PNAS*,102(3):571-576.

Graham, J.; Leathart, J.; Keegan, J.; Pearson, J.; Bint, A. y Gally, D.(2001). Analysis of *Escherichia coli* strains causing bacteriuria during pregnancy: selection for strains that do not express type 1 fimbriae. *Infect Immun*,69:794-799.

Guzmán, A.; Salinas, J.; Toche, P. Y Afani, A.(2004). Alergia a β -lactámicos. *Rev Chil Infect*,21(4):285-298.

Guyer, D.; Henderson, M.; Nataro, J. y Mobley, H.(2000). Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*,38:53-66.

Guyer, D.; Radulovic, S.; Jones, F. y Mobley, H.(2002). Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infec Immu*,70(8):4539-4546.

Haag, H.; Hantke, K.; Drechsel, H.; Stojiljkovic, I.; Jung, G. y Zähler H.(1993). Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J Gen Microbiol*,139:2159-2165.

Hamon, M.; Batsche, E.; Regnault, B., Tham, T.; Seveau, S.; Muchardt, C. y Cossart, P.(2007). Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc Natl Acad Sci U*,104(33):13467-13472.

Harada, S.; Ishii, Y. y Yamaguchi, K.(2008). Extended-spectrum β -lactamases: Implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean J Lab Med*,28:401-412.

Heras, B.; Shouldice, S.; Totsika, M.; Scanlon, M.; Schembri, M. y Martin, J.(2009). DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*,7:215-225.[En línea]

Disponible en URL: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n3/fig_tab/nrmicro2087_F5.html.

Hernández, E.(2011). Perfil fenotípico y molecular de *Escherichia coli* uropatógena productora de β -lactamasa de espectro expandido. Tesis de grado de especialidad no publicada. Universidad de Los Andes, Mérida.

Herzer, P.; Inouye, S.; Inouye, M. Y Whittam, T.(1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*,172(11):6175-6181.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2012). [En línea] Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=562>.

Integrated Taxonomic Information System (ITIS).(2012). Catalogue of Life: 3rd February 2012.[En línea] Disponible en URL: <http://www.catalogueoflife.org/details/species/id/4260649>.

Johnson, J.(1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev*,4(1):80.

Johnson, J. y Stell, A.(2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The J Infect Dis*,181:261-272.

Knight, S. y Bouckaert, J.(2009). Structure, function, and assembly of type 1 fimbriae. *Top Curr Chem*,288:67-107.

Knothe, H.; Shah, P.; Krcmery, V.; Antal, M. y Mitsuhashi, S.(1983). Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofur, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infect*,11:315-317.

Kuhnert, P.; Boerlin, P. y Frey, J.(2000). Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiol Rev*, 24:107-117.

Kurazono, H.; Yamamoto, S.; Nakano, M.; Nair, G.B.; Terai, A.; Chaicumpa, W. y Hayashi, H.(2000). Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. *Microb Pathog*,28(3):183-9.

Marín, M. y Gudiol, F.(2003). Antibióticos β -lactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21(1):42-55.

Méndez, S. y Pérez, E.(2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*,22(3):183-92.

Montiel, R.; Marcano, N.; Mack, S. y Canónico,F.(2011). Definiciones, epidemiología de las infecciones urinarias, factores de riesgo. Primer consenso Venezolano de infección urinaria 2011. [En línea] Disponible en URL: http://www.soveuro.org.ve/archivos/Consenso_IU_2011.pdf.

Moreno, E.; Prats, G.; Planells, I.; Planes, A.; Perez, T. y Andreu, A.(2006). Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. *Enferm Infecc Microbiol Clin*,24(8):483-489.

Mulvey, M.(2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*,4(5):257-271.

Murray, P; Rosenthal, K. y Pfaller, M.(2009). Microbiología médica.(6ta Ed). España: Elsevier S.A.

Nakano, M.; Yamamoto, S.; Terai, A.; Ogawa, O.; Makino, S.; Hayashi, H.; Nair, B. y Kurazono, H.(2001). Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *FEMS Microbiol Lett*, 205:71-76.

Neilands, J.(1995). Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *The J Biolol Chem*,270(45):26723-26726.

Nishiyama, M.; Horst, R.; Eidam, O.; Herrmann, T.; Ignatov, O.; Vetsch, M.; Bettendorff, P.; Jelesarov, I.; Grütter, MG.; Wüthrich, K.; Glockshuber, R. y Capitani, G.(2005). Structural basis of chaperone–subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD. *EMBO J*,24(12):2075-2086.

Parham, N.; Pollard, S.; Chaudhuri, R.; Beatson,S.; Desvaux, M.; Russell, M.; Ruiz,J.; Fivian, A.; Vila, J. y Henderson, I.(2005). Prevalence of pathogenicity island II_{CFT073} genes among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 43(5):2425-2434.

Pattus, F. y Abdallah, M.(2000). Siderophores and iron-transport in microorganisms. *J of the Chib Che Societ*, 47:1-20.

Perry, R. y Fetherston, J.(1997). *Yersinia pestis* etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol Rev*,10:35-66.

Perry, R. y Fetherston, J.(2011). Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect*,13(10):808-817.

Pitout, J.(2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Front Microbiol*,3(9):1-7.

Pitout, J.; Laupland, K.; Church, D.; Menard, M. y Johnson, J.(2005). Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*,49(11):4667-4670.

Quiroz, B.(2012). Caracterización genética de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas CTX-M. Tesis de grado de especialidad no publicada. Universidad de Los Andes, Mérida.

Rasko, D.; Phillips, J.; Li, X. y Mobley, H.(2001). Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: probes specific for uropathogenic populations. *J Infect Dis*,184:1041-1049.

Rippere-Lampe, K.; O'Brien, A.; Conran, R. y Lockman, H.(2001). Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (*cnf1*) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infec and Immu*,69(6):3954-3964.

Rodríguez, I y Barrera, H.(2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UIANL*,7(3):323-335.

Rosenblatt-Farrell, N.(2009). El paisaje de la resistencia a los antibióticos. *Sal Púb México*,51(5):435-442.

Ruppé, E.; Hem, S.; Lath, S.; Gautier, V.; Arieu, F.; Sarthou, J.; Monchy, D. y Arlet, G.(2009). CTX-M β -Lactamases in *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections, Cambodia. *Emerg Infec Dis*,15(5):741-748.

Sánchez, M.(2011). Curiosidades de la microbiología.[En línea] Disponible en: <http://curiosidadesdelamicrobiologia.blogspot.com/2011/05/escherichia-coli-o104h4.html>.

Sirot, D.; Sirot, J.; Labia, R.; Morand, A.; Courvalin, P.; Darfeuille-Michaud, A.; Perroux, R y Clucel, R.(1987). Transferable resistance to third-generation

cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *J Antimicrob Chemother*,20:323-34.

Schmidt, H. y Hensel, M.(2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*,17(1):14-56.

Soto, S.(2006). Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*,24(8):479-80.

Sougakoff, W.; Goussard, S. y Courvalin, P.(1988). The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiol Lett*,6:343-348.

Stapleton, A.(2006). Urinary tract infection in women: New pathogenic considerations. *Clin Infect Dis Rep*,8:465-472.

Stromberg, M.; Marklund, B.; Lund, B.; Ilver, D.; Hamers, A.; Gastra, W.; Karlsson, K. y Normark, S.(1990). Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gala1-4Galcontaining isoreceptors. *EMBO J*,9:2001-2010.

Starcic-Erjavec, M.; Križan-Hergouth, V.; Gubina, B. y Žgur-Bertok, D.(2008). Prevalence of toxin encoding genes in *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in Slovenia. *Zdrav Vestn*,77:427-32.

Tafur, J.; Torres, J. y Villegas, M.(2008). Mechanisms of antibiotic resistance in gramnegative bacteria. *Asoc Colomb Infec*,12(3):223-233.

Takahashi, A.; Kanamaru, S.; Kurazono, H.; Kunishima, Y.; Tsukamoto, T.; Ogawa, O. y Yamamoto, S.(2006). *Escherichia coli* isolates associated with uncomplicated and complicated cystitis and asymptomatic bacteriuria possess similar phylogenies, virulence genes, and O-serogroup profiles. *J Clin Microbiol*,44(12):4589-4592.

Tiba, M.; Yano, T. y Leite, D.(2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 50(5):255-260.

Torres, A. y Payne, S.(1997). Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol*,23(4):825-833.

Villegas, V.; Sánchez, M. Y Chuaire, L.(2009). Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular. *Colomb Med*,40:347-52.

Vincent, C.; Boerlin, P.; Daignault, D.; Dozois, C.; Dutil, L.; Galanakis, C.; Reid-Smith, R.; Tellier, P.; Tellis, P.; Ziebell, K. y Manges, A.(2010). Food reservoir for *E. coli* causing urinary tract infections. *Emer Infec Dis*,16(1):88-95.

Wiles, T.; Kulesus, R. y Mulvey, M.(2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*,85(1):11-19.

Winn, W.; Allen, S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P. y Woods, G.(2008). Diagnóstico microbiológico texto y atlas en color.(6ta Ed.).Buenos Aires,Argentina: Panamericana.

Winkelmann, G.(2002). Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans*,30:691–696.

Wullt, B.(2003). Erratum to the role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary. *Inter J of Antimicro Agents*,21:100-120.

Xia, X.; Meng, J.; Zhao, S.; Bodeis-Jones, S.; Gaines, S.; Ayers, S. Y Mcdermott, P.(2011). Identification and antimicrobial resistance of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail meats. *J Food Prot*,74(1):38–44.

Yamamoto, S.; Nakano, M.; Terai, A.; Yuri, K.; Nakata, K.; Nair, G.B.; Kurazono, H. y Ogawa, O.(2001). The presence of the virulence island containing the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. *J Urol*,165(4):1347-51.