

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS DE
USO CLINICO EN *Escherichia coli* CAUSANTE DE INFECCIÓN DEL TRACTO URINARIO
ADQUIRIDO EN LA COMUNIDAD EN UNA INSTITUCIÓN DE TERCER NIVEL EN BOGOTÁ**

BETSY CASTRO CARDOZO

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
BOGOTÁ D.C
2011**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS
DE USO CLINICO EN *Escherichia Coli* CAUSANTE DE INFECCION DEL TRACTO URINARIO
ADQUIRIDO EN LA COMUNIDAD EN UNA INSTITUCION DE TERCER NIVEL EN BOGOTÁ**

BETSY CASTRO CARDOZO

**Trabajo de grado presentado para obtener el titulo de Magíster en Ciencias Básicas
Biomédicas**

Directores:

Javier Antonio Escobar Pérez. M.Sc.

Aura Lucia Leal Castro. M.Sc

Director asociado

Natasha Vanegas Gómez Ph.D

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
BOGOTÁ D.C
2011**

Nota de aceptación

FIRMA DEL JURADO

FIRMA DEL JURADO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS DE USO CLINICO EN *Escherichia Coli* CAUSANTE DE INFECCIÓN DEL TRACTO URINARIO ADQUIRIDO EN LA COMUNIDAD EN UNA INSTITUCIÓN DE TERCER NIVEL EN BOGOTÁ

RESUMEN

Introducción: La emergencia de bacterias de importancia clínica multirresistentes es un problema de salud pública a nivel mundial muy importante por el incremento en los costos del tratamiento y las vidas humanas afectadas. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado la circulación de estos patógenos multirresistentes en la comunidad causando diferentes tipos de infecciones como: infecciones gástricas, respiratorias, neumonías e infecciones del tracto urinario (ITU), principalmente.

Las ITU adquiridas en la comunidad son causadas en su mayoría por *Escherichia coli* extraintestinal (grupo filogenético B2 y D), que son más virulentos que los aislamientos intestinales o comensales (grupo filogenético A y B1). Además los aislamientos extraintestinales están aumentando su resistencia a los antibióticos empleados para el tratamiento empírico o de primera elección terapéutica como: sulfonamidas, quinolonas y β -lactámicos. Esto se debe a la adquisición de genes que codifican diversos mecanismos de resistencia, los cuales son transferidos por la incorporación de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones que tienen la función de almacenar, transportar y facilitar la inserción en el genoma bacteriano de DNA foráneo, lo cual se traduce en un fenotipo de multirresistencia.

La vigilancia activa en algunos países del mundo incluyendo latinoamericanos como Brasil han reportado la emergencia de un nuevo clon pandémico de *E. coli* de circulación en la comunidad, el cual se caracteriza por tener un tipo de secuencia (ST) 131, así como resistencia a todos los antibióticos B-lactámicos (excepto cefamicinas y carbapenemicos) por la acción de una BLEE tipo CTX-M-15, y además pueden tener

corresistencia a otros antibióticos como aminoglicósidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas. La mayoría de estos aislamientos son clasificados como patógenos extraintestinales (B2 y D) que pueden tener un perfil de virulencia muy amplio que incluyen toxinas, adhesinas, sistemas de adquisición de hierro y otros factores de virulencia que permiten la invasión y patogénesis que desencadenan una respuestas nocivas por el hospedero, ocasionando cuadros clínicos muy severos o incluso la muerte. En Colombia no ha datos que permitan establecer como es el comportamiento de las ITU, ni la frecuencia de la resistencia de los aislamientos de *E. coli* y si está circulando el clon ST131. Por esta razón es importante iniciar con la caracterización microbiológica y molecular de aislamientos de *E. coli* causantes de infección, en pacientes de la comunidad, con el fin de proporcionar datos sólidos de nuestra epidemiología para, en un futuro, brindar soporte para desarrollar o acoger nuevas guías de manejo y tratamiento de infecciones en la comunidad.

Objetivo: Determinar los mecanismos de resistencia a antibióticos de uso clínico en aislamientos de *Escherichia coli* causantes de infección del tracto urinario adquirida en la comunidad en una institución de tercer nivel en Bogotá.

Materiales y métodos: Estudio descriptivo prospectivo, realizado entre Abril a Noviembre del 2009, donde se incluyeron 133 aislamientos de *E. coli* causantes de ITU en pacientes de consulta externa, urgencias y salas de partos de un hospital de tercer nivel de Bogotá.

Ensayos fenotípicos y genotípicos: Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) a 8 antibióticos por medio del método de microdilución en agar, siguiendo las recomendaciones dadas por el CLSI (2010). En todos los aislamientos se determinó la presencia de los genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}, que codifican para B-lactamasas, por

medio de PCR múltiple. Adicionalmente se detectaron los genes de resistencia a sulfonamidas *Sul1*, *Sul2* y *Sul3*, tetraciclinas *tetA*, *tetB* y *tetC*, integrones clase 1, 2 y 3 y seis factores de virulencia *papC*, *cnf*, *hly*, *fimG/fimH*, *usp* y *sfaD/SfaE*. La relación genética de los aislamientos se realizó por medio de REP-PCR.

Resultados: De los 133 pacientes analizados, 91 (68.4%) fueron atendidos por consulta externa, 27 (20.3%) en urgencias y 15 (11.3%) en sala de partos. Ciento seis (80.0%) pacientes correspondieron al sexo femenino. Solo el 12.0% de los pacientes presentaron como antecedente diabetes mellitus. Del total de aislamientos analizados se encontró un perfil de resistencia a TET en 87 (65%), AMP 68 (51%), SXT 65 (49%), CIP 46 (34%), GEN 22 (17%), AMK 21 (15%). Dos aislamientos (1,5%) fueron resistentes a cefalosporinas de tercera generación (cefotaxime y ceftazidime) por la presencia del gen *bla*_{CTX-M-15}, estos aislamientos presentan relación con el clon ST131. Los genes *tetA* y *sul1* fueron detectados en 31(23.0%) y 33(24.8%) de los aislamientos respectivamente. Los integrones 1 y 2 se encontraron en 50(37.5%) y 5(6.7%) aislamientos, respectivamente. El 61% de los aislamientos fueron clasificados como extraintestinales y el restante 39.0% como intestinales. Los aislamientos extraintestinales presentan mayor variabilidad de perfiles de virulencia y presentando un alto porcentaje de los genes *fimG/fimH*, *cnf*, *hly* y *papC*. Este último con una marcada diferencia entre ambos tipos de aislamientos (extraintestinales 40.0% e intestinales 6.0%). En los aislamientos extraintestinales también se encontraron las adhesinas *usp* y *sfaD/SfaE* en 11(13.0%) y 10(12%) aislamientos, respectivamente. En la relación genética de los aislamientos se evidenció que tienen un comportamiento clonal conservando un porcentaje de similitud mayor al >80% respecto a la cepa ATCC 25922. De los nueve aislamientos seleccionados para determinar la relación genética con el clon ST 131 cinco aislamientos fueron relacionados con este clon.

Conclusiones.

Estos resultados confirman la circulación de aislamientos de *E. coli* ST131 causantes de ITU adquirida en la comunidad en pacientes colombianos, con y sin la adquisición de la cefotaximasa CTX-M 15. Además se determinó que los aislamientos de *E. coli* de circulación en la comunidad tienen un comportamiento clonal y que presentan un gran repertorio de factores de virulencia y resistencia (hasta a seis antibióticos). Este estudio también permite iniciar una caracterización del fenómeno de resistencia en aislamientos en la comunidad y así poder en un futuro iniciar un seguimiento epidemiológico.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

1. JUSTIFICACIÓN

2. MARCO TEORICO

2.1 Generalidades de *Escherichia coli*

2.2 Patogénesis y Factores de virulencia

2.2.1 Sistema de adhesinas

2.2.1.1 Pili tipo 1

2.2.1.2 Pili tipo P

2.2.1.3 Pili tipo S/F1C

2.2.1.4 La familia de adhesinas Dr.

2.2.2 Sistemas de adquisición de Hierro

2.3 Tratamiento de las ITU y resistencia a los antibióticos

2.3.1 Quinolonas

2.3.2 Trimetoprim – sulfametoxazol

2.3.3 β - lactámicos

2.3.4 Movilización de los mecanismos de resistencia: Los Integrones

2.4 Epidemiología de *E. coli*

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

3.2 Objetivos específicos

4. METODOLOGÍA

4.1 Tipo de estudio y obtención de los aislamientos bacterianos

4.2 Extracción de ADN

4.3 Estandarización de PCR múltiple para la confirmación de especies de *Enterobacterias*

4.4 Determinación de los grupos filogenéticos de *E. coli*

4.5 Determinación de factores de virulencia

4.6 Determinación de los perfiles de resistencia

4.7 Confirmación molecular de los mecanismos de resistencia a B-lactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas.

4.8 Determinación de integrones clase 1, 2 y 3

4.9 Relación genética por ERIC –PCR

4.10 Determinación del clon ST131 O25:H4

5. RESULTADOS

- 5.1 Estandarización de PCR múltiple para la confirmación molecular de cinco especies de *Enterobacterias*
- 5.2 Determinación del grupo filogenético de los aislamientos y sus factores de virulencia
- 5.3 Perfil de resistencia de los aislamientos de *Escherichia coli* y confirmación molecular.
- 5.4 Determinación de integrones clase 1, 2 y 3
- 5.5 Relación genética por ERIC –PCR
- 5.6 Determinación del clon ST131 O25:H4
- 6. DISCUSIÓN**
- 7. CONCLUSIONES**
- 8. BIBLIOGRAFÍA**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Adhesinas comunes en aislamientos UPEC	19
Tabla 2. Combinaciones de los genes para establecer el grupo filogenético de <i>E. coli</i> .	36
Tabla 3: Características demográficas y origen de los pacientes.	40
Tabla 4. Secuencias de los primers empleados para la detección de genes especie específicos de algunas especies de Enterobacterias.	42
Tabla 5. Características moleculares de los subgrupos clónales de <i>E. coli</i> .	50
Tabla 6. Características moleculares de aislamientos relacionados con el clon ST131	52
Tabla 7. Cuadro comparativo de aislamientos de <i>E. coli</i> intestinales y extraintestinales.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. . Esquemas de las diferentes estructuras encontradas en los pilis	18
Figura 2. A. Estructura básica del integrón	28
Figura 3: Diagrama de flujo de la metodología empleada en el estudio	33
Figura 4: productos de amplificación de la PCR múltiple para la identificación de cinco especies de Enterobacterias	41
Figura 5: Determinación de los grupos filogenéticos para aislamientos de <i>E. coli</i> .	42
Figura 6: Clasificación de los aislamientos de <i>E. coli</i> como intestinales y extraintestinales de acuerdo a la determinación de los grupos filogenéticos.	43
Figura 7: Perfil de factores de virulencia en aislamientos de <i>E. coli</i> intestinales y extraintestinales	44
Figura 8. Perfil de resistencia de los aislamientos de <i>E. coli</i> causantes de ITU-AC	45
Figura 9: Amplificación de los genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} y <i>bla</i> _{CTX-M} que codifican BLEE en aislamientos de <i>E. coli</i> causante de ITU.	46
Figura 10. Alineamiento de las secuencias de CTX-M-15 en aislamientos de <i>E. coli</i> .	46
Figura 11. Distribución de las características moleculares en los aislamientos de <i>E. coli</i> de acuerdo a la clasificación filogenética	47
Figura 12: Corresistencia en aislamientos de <i>E.coli</i> con presencia de integrón clase 1	48
Figura 13: Dendograma de los 133 aislamientos de <i>E. coli</i> causante de ITU-AC donde se muestra su relación genética	51
Figura 14. Alineamiento para la determinación de <i>E. coli</i> ST 131 A. de las secuencias del gen <i>pabB</i> de aislamientos de <i>E.coli</i> pertenecientes al grupo filogenético B2 para la identificación del clon ST131.	53

1. JUSTIFICACIÓN

Los aislamientos de *E. coli* productoras de BLEE es uno de los problemas más importantes a nivel mundial por causar infecciones en el hospital, sin embargo en los últimos cinco años se ha incrementado rápidamente la diseminación de estos patógenos en la comunidad causando infecciones en pacientes sin factores de riesgo aparentes o con antecedentes de consumo de antibióticos y patologías de base (renales o diabetes mellitus).

La infección de tracto urinario (ITU) es la infección más frecuente causada por estos aislamientos de *E. coli* productoras de BLEE, seguida por bacteriemias e infecciones gastrointestinales. Desde el año 2003 se ha reportado la emergencia y diseminación de un clon de *E. coli* causante de infecciones en la comunidad y asociadas al cuidado de la salud en diferentes países Europeos, en Norte América y Sur América [1]. Este clon tiene un tipo de secuencia 131 (ST131), y además alberga una mayor cantidad de factores de virulencia que los clones circulantes en el ambiente hospitalario, También ha adquirido múltiples mecanismos de resistencia contra antibióticos de primera elección terapéutica como B-lactámicos, sulfonamidas, inhibidores de la vía de los folatos y quinolonas. La cefalosporinasa CTX-M-15 es la enzima más frecuentemente encontrada en aislamientos relacionados con este clon [2-5].

En Colombia es poco lo que se conoce de *E. coli* productoras de CTX-M multirresistentes de la comunidad, los reportes existentes han estudiado aislamientos hospitalarios, por ejemplo, Valenzuela de Silva en el 2006 reportó la presencia de *Enterobacterias* de circulación hospitalaria productoras de cefalosporinasas tipo CTX-M-15, CTX-M-1 y CTX-M-2 [6, 7]. También se ha realizado diversos programas de vigilancia epidemiológica para los agentes infecciosos de circulación hospitalaria con mayor impacto clínico y análisis estadísticos que permite conocer los perfiles y

tendencias de la resistencia en estos patógenos circulantes en los hospitales colombianos, como los realizados por GREBO (www.grebo.org); pero infortunadamente, no se cuentan con una caracterización clínica, epidemiológica y molecular de los aislamientos que están circulando en la comunidad en nuestro país. De acuerdo a varios reportes realizados a nivel mundial los patógenos de circulación en la comunidad están perdiendo su perfil típico de multisensibilidad, por la adquisición de mecanismos de resistencia, previamente detectados en los aislamientos hospitalarios, con el agravante que estos aislamientos de la comunidad pueden ser mucho más agresivos y virulentos [8-10]. Por esto es importante iniciar la vigilancia del comportamiento de la resistencia a los antibióticos en aislamientos de circulación en la comunidad y verificar si el clon ST131 está circulando en nuestros aislamientos.

2. MARCO TEORICO

2.1. Generalidades de *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo que tienen la habilidad de colonizar varios nichos ambientales, animales y humanos. En este último, pocas horas después del nacimiento coloniza la mucosa intestinal, ya que está proporciona condiciones favorables para su crecimiento, como presencia glutamato y gran variedad de azúcares. En algunas ocasiones cuando las concentraciones de azúcares en el intestino son bajas, estas bacterias pueden potencializar su crecimiento al usar respiración microaerofila o anaerobia [11]. La relación del hospedero y *E. coli* se denomina comensalismo, en la cual se benefician los dos organismos, en el primero favorece la absorción de nutrientes, estabiliza el microambiente evitando la colonización de bacterias patógenas por la producción de bacteriocinas específicas, activación de señales y estímulos que desarrollan o regulan el sistema inmune, entre otros [12]. Mientras que el segundo obtiene la mayoría de nutrientes necesarios para su crecimiento y replicación.

Algunos aislamientos de *E. coli* divergen de este grupo comensal por tener la capacidad de desarrollar gran variedad de patologías con un espectro de acción muy amplio, cursando desde afecciones agudas a crónicas, hasta infecciones invasivas e incluso causar la muerte [13]. Estos patógenos se han clasificado en dos grupos: 1. *E. coli* patógeno intestinal (variedades entéropatógena, hemorrágicas, invasivas, toxigénica y agregativa) pertenecientes al grupo filogenético A1 ó B1 y 2. *E. coli* extraintestinal (ExPEC) que se relacionan frecuentemente con infecciones del sistema nervioso central, meningitis neonatal, bacteriemias, infecciones del sitio operatorio y del tracto urinario (ITU). Estos patógenos se asocian al grupo filogenético D y B2 [11, 14].

Entre las ExPEC, el grupo más común es la UPEC (siglas en inglés para *E. coli* uropatogénica) las cuales son las responsables del 70% al 90% de las infecciones del

tracto urinario adquiridas en la comunidad (ITU-AC). En el ambiente hospitalario pueden llegar a causar alrededor del 50% de todas las infecciones ocasionadas por *E. coli*, aumentando considerablemente los índices de mortalidad y costos de hospitalarios.

Las UPEC son bacterias oportunistas intracelulares que poseen diversos factores de virulencia como adhesinas, toxinas, hemolisinas y sistemas de adquisición de hierro que les permite invadir las células uroepiteliales. Las ITU pueden cursar desde la colonización de la vejiga (bacteriuria asintomática o cistitis) hasta la invasión por medio del uréter hasta el riñón causando pielonefritis. La respuesta producida por este tipo de tejido, normalmente estéril, es la inflamación, causada por la producción de citoquinas y la activación de la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos, exfoliación del epitelio renal, generación de compuestos nitrogenados y compuestos antimicrobianos. Estos productos son los responsables de ocasionar gran variedad de síntomas clínicos como dolor, fiebre, disuria y leucocituria [15].

2.2. Patogénesis y Factores de virulencia.

E. coli intestinal induce una alteración histopatológica en el intestino conocida como lesión A/E (**A**dherencia y **E**liminación), que se lleva a cabo mediante mecanismos de virulencia complejos y específicos de cada tipo de cepa, e induce la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical de la célula endotelial. Este modelo de patogénesis se divide en tres fases importantes: adherencia inicial, inyección de factores y transducción de señales, e invasión [12].

Las UPEC tienen la habilidad de adherirse al epitelio y colonizarlo, debido a su mayor capacidad de soportar la circulación de volúmenes grandes de orina que participan en el mantenimiento, limpieza y esterilidad de los conductos urinarios. La estrecha

interacción célula–bacteria permite que se efectúe la invasión epitelial de la vejiga y uréter por medio de un proceso de internalización facilitado por una activación del transporte de membrana y la producción bacteriana de compuestos ácidos con características similares a los endosomas tardíos eucarióticos. Cuando las células uroepiteliales contienen gran cantidad de patógenos, se activa un mecanismo de exfoliación celular, el cual tiene como objetivo eliminar gran cantidad de bacterias de forma simultánea haciendo un recambio celular [16]. Sin embargo, este proceso puede dejar expuesto capas subyacentes de células inmaduras que cursan por el proceso de reordenamiento de los filamentos de actina (característicos de la etapa final de diferenciación celular), los cuales pueden favorecer la multiplicación bacteriana intracelular [17].

La patogénesis de la ITU puede ser explicada teniendo en cuenta factores dependientes del huésped como vaciamiento vesical incompleto u orina residual, reflujo vesicoureteral, presencia de cuerpos extraños o litiasis y lesiones inflamatorias persistentes. Respecto al patógeno la adquisición de factores de virulencia que aumenten su adhesión, evasión de la respuesta inmune, secreción de toxinas y sistemas de adquisición de nutrientes, entre otros [18].

2.2.1. Sistema de adhesinas.

Las bacterias expresan adhesinas sobre su superficie que pueden estar conformadas por monómeros, oligómeros o compuestos supramoleculares, como es el caso de estructuras muy importantes son las denominadas fimbria o pili. Estos componentes de adhesión son asociados a los pilis tipos 1, P y S, F1C y las adhesinas relacionadas a la familia Dr.

2.2.1.1. Pili tipo 1

Estos organelos están constituidos por fibras helicoidales compuestas de subunidades repetidas de la proteína FimA, acopladas a una estructura de 3 nm de ancho denominada fimD, dos proteínas adaptadoras (FimF y FimG) y otra proteína variante (FimH), esta última ubicada en su extremo C- terminal, la cual le permite interactuar con receptores de manosa de las diferentes células del hospedero. Todas las variantes naturales de FimH pueden tener estructuras trimanosa o monomanosa, que pueden o no variar la capacidad de unión a diferentes receptores como carbohidratos o colágeno tipo I y IV, laminina y fibronectina [7].

El pili es una de las adhesinas más comunes, está presente en aproximadamente el 80% de las Enterobacterias comensales y casi en el 70% de las UPEC. Estas últimas expresan el fenotipo de unión a monomanosa el cual tiene un alto tropismo por los receptores de glicoproteínas presentes en las células uroepiteliales, favoreciendo la colonización del tracto urinario. Estos receptores se pueden expresar más fácilmente cuando hay alguna alteración del epitelio que recubre la vejiga o el sistema urinario [19].

2.2.1.2. Pili tipo P

El pili tipo P es una estructura muy similar al pili tipo 1, y está constituido por una fibra redonda flexible, conformada por varias subunidades de la proteína PapA, que se encuentra anclada a la membrana por medio de la proteína PapC. En el extremo distal del pili P está presente la proteína PapG, la cual está asociada a tres subunidades más: PapE, PapF y PapK (figura 1). La adhesina PapG reconoce los receptores glicopeptídicos que son expresados por las celular renales y los eritrocitos, por esta razón este factor de virulencia se ha asociado más al desarrollo de pielonefritis que al proceso de colonización del epitelio urinario. Sin embargo *Mahmood y colaboradores* en el 2000 demostraron que PapG puede unirse a partículas surfactantes secretadas por el

hombre y algunos animales, lo que permite suponer que estas bacterias pueden ser más estables en la mucosa intestinal y persistir como flora normal [20].

La adhesina PapG es reconocida por el receptor denominado GbO3 (globotriacilceramida) y se une a él por medio de la β -glucosa del residuo de ceramida. Sin embargo se han reportado algunas variaciones de esta adhesina, como *PapGI*, *PapGII* y *PapGIII*, que interaccionan con los receptores modificados GbO4 y GbO5 que, mantienen la misma estructura de GbO3, pero con la presencia de uno o dos residuos de N-acetil-galactosamina (GalNAc) (figura 1) [21-23].

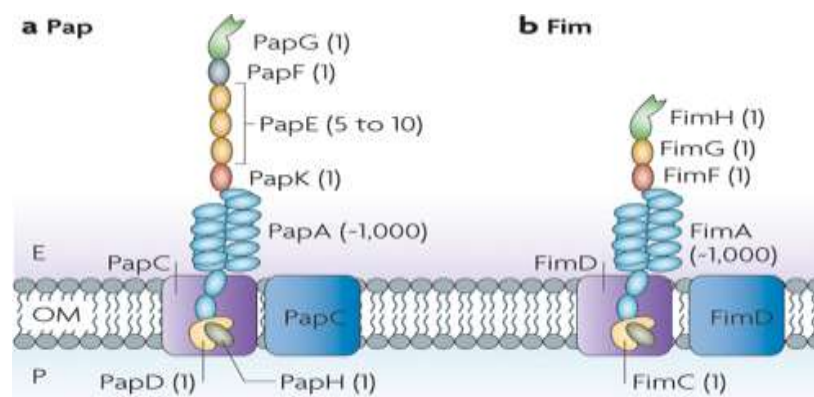


Figura 1. . Esquemas de las diferentes estructuras encontradas en los pilis. A. Esquema del pili tipo P. **B.** pili tipo 1. Los números indican el número de copias de las diferentes subunidades ensambladas para la formación de los tipos de pili. En la membrana externa (OM) se encuentra ancladas las subunidades de terminación como PapH y FimC respectivamente, las cuales se encuentran unidas a las chaperonas (color amarillo) permitiendo la unión de las diferentes subunidades que pueden estar en dímeros (color azul) o monómeros. **E.** exterior y **P:** espacio periplásmico [24]

2.2.1.3. Pili tipo S/F1C

El pili S está formado por la subunidad SfaA y tres subunidades menores denominadas SfaG, SfaH y SfaS. SfaA tiene la capacidad de interactuar con los residuos de ácido siálico presentes en las membranas de células del endotelio vascular y renal, facilitando la diseminación bacteriana y causando infecciones complicadas como meningitis, sepsis y pielonefritis. También se han identificado organelos homólogos al pili S como FIC, que

se encuentra presente en el 14% de los aislamientos UPEC, lo cual indica que puede tener un papel importante en la patogénesis de las infecciones urinarias [25].

2.2.1.4. La familia de adhesinas Dr.

Este grupo de adhesinas tienen una asociación de uropatogenicidad debido a que facilitan el ascenso en la colonización, permanencia y desarrollo de infecciones intestinales crónicas y del tracto urinario como pielonefritis. Los miembros de esta familia reconocen secuencias consenso repetidas presentes en factores de activación y regulación de eritrocitos, así como el colágeno tipo IV y diferentes tejidos incluyendo el uroepitelial, permitiendo la adherencia e invasión bacteriana [26, 27] En la tabla 1 se muestra un resumen de las adhesinas comúnmente asociadas a aislamientos UPEC.

Tabla 1. Adhesinas comunes en aislamientos UPEC

Organelo	Adhesina específica	Receptor en el hospedero	Célula afectada	Enfermedad asociada
Pili tipo 1	fimH	Glicoproteínas manosiladas, colágeno tipo IV, laminina, fibronectina	Células epiteliales, renales, eritrocitos, macrófagos, neutrofilos, matriz extracelular e implantes	Cistitis, sepsis, meningitis
Pili tipo P	PapG (I,II,III)	GbO3, GbO4, GbO5.	Células epiteliales renales, eritrocitos	Pielonefritis
Pili tipo S/F1c	SfaS,	Acido salicílico, plasminogeno y B-G alNac-1,4-Gal	Células endoteliales, epiteliales y renales	Asociación a ITU, sepsis y meningitis
Adhesinas Dr	varios	CD55, CD G66, colágeno tipo IV, $\alpha\beta$ integrinas	Células epiteliales, componentes intestinales o renales	Cistitis, pielonefritis, diarrea y sepsis

2.2.2. Sistemas de adquisición de Hierro

El hierro es uno de los elementos esenciales para las células procariotas y eucariotas, ya que son indispensables para el crecimiento y el desarrollo de múltiples procesos; las concentraciones de hierro en el hospedero puede ser muy bajas (10^{-6}M), lo cual puede contribuir a evitar el crecimiento bacteriano. Por esta razón, las bacterias han desarrollado varias estrategias para adquirir este elemento del huésped, una de estas

es por medio de sideróforos, los cuales son moléculas de bajo peso molecular con alta afinidad por hierro (Fe^{+3}) (que es insoluble como catión libre), que permite captarlo del ambiente y almacenarlo en el citoplasma bacteriano.

Las bacterias recuperan los sideróforos unidos a hierro por medio de receptores que facilitan el transporte del complejo hierro-sideróforos a través de la membrana [11] . Otra estrategia empleada por las bacterias para sobrevivir en estas condiciones hostiles, es la producción de la proteína enterobactina, la cual compite con la transferrina por la unión al hierro; en contraste, el hospedero puede contrarrestar esta acción produciendo la proteína lipocalin 2, la cual actúa eficazmente secuestrando el complejo enterobactina – hierro.

2.3. Tratamiento de las ITU y resistencia a los antibióticos

Actualmente se cuenta con varios antimicrobianos efectivos para el tratamiento de las ITU causadas por bacterias Gram negativas (en especial *E. coli*) como fluoroquinolonas, tetraciclinas, aminoglicósidos, sulfonamidas, inhibidores de la vía de los folatos y beta-lactámicos. Sin embargo, en los últimos años se ha reportado un aumento significativo de aislamientos productores de BLEE, y lo que es más preocupante con corresponsencia a uno o varios antibióticos de otras familias. Adicionalmente, este fenómeno está emergiendo rápidamente en el ambiente comunitario, lo cual complica la situación, porque se hace necesario direccionar adecuadamente el tratamiento empírico de pacientes con este tipo de infecciones, debido a que no se han actualizado las guías de manejo para este tipo de infecciones y se sigue considerado que las infecciones de inicio en la comunidad son generalmente no complicadas, de fácil resolución por intuirse que son causadas por patógenos multisensibles, lo cual puede conllevar en algunos casos a falla en el tratamiento [28].

En casos de infecciones complejas se pueden emplear cefalosporinas como cefotaxima, ceftazidima, cefepime o incluso carbapenemicos. Pero también se han encontrado registros en los cuales, están circulando en la comunidad mecanismos de resistencia como las cefalosporinasas. Por todo esto es muy importante siempre direccionar el tratamiento de estas patologías con la ayuda de la sintomatología y el perfil de susceptibilidad que permite diseñar estrategias de sinergismo que pueden evitar la selección de clones multirresistentes, que pueden permanecer como colonizadores, y así contribuir con la diseminación de estos patógenos en la misma comunidad o en pacientes hospitalizados con gran número de factores de riesgo [29, 30] .

Las Enterobacterias en especial *E. coli* de circulación hospitalaria, y ahora en la comunidad, adaptan y acumulan diferentes mecanismos de resistencia que adquieren por la transferencia horizontal de elementos genéticos móviles que pueden contener varios genes de resistencia de forma simultánea. Estos genes codifican enzimas capaces de generar mutaciones puntuales del sitio blanco o de reconocimiento del antibiótico impidiendo su unión, enzimas con actividad inhibitoria o hidrolítica, o sistemas de expulsión que disminuyen la concentración intracelular del antibiótico [8, 31].

2.3.1. Quinolonas

Las quinolonas como el ácido nalidíxico u oxolínico y las fluoroquinolonas tipo ciprofloxacina o norfloxacina son antibióticos que tienen como objetivo dos enzimas: la ADN girasa y la topoisomerasa IV, implicadas en la replicación y la transcripción del ADN bacteriano. La primera codificada por el gen *gyrA* que actúa en el control del superenrollamiento que se produce durante la transcripción y replicación del DNA bacteriano, la segunda es codificada por los genes *parC* y *parE* que ayudan a la separación del DNA, permitiendo la formación de la horquilla de replicación [32].

La resistencia bacteriana a esta familia de antibióticos está dada por cuatro mecanismos diferentes: el principal es la acumulación secuencial de mutaciones puntuales espontaneas en estas dos enzimas (DNA girasa y topoisomerasa IV), lo cual disminuye la afinidad del antibiótico. El segundo mecanismo son los mediados por plásmidos que transportan los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* que codifican proteínas que protegen la DNA girasa de la acción del antibiótico [33]. Otro mecanismo recientemente reportado es la adquisición y producción de la proteína aac(6')-Ib-cr, que es una enzima bifuncional capaz de acetilar varios aminoglicósidos y fluoroquinolonas como ciprofloxacina y norfloxacina [34]. Por último se encuentra la disminución en la expresión de porinas causando cambios en la conformación de la membrana externa, disminuyendo la permeabilidad y de esta forma evitando el ingreso del antibiótico al citoplasma bacteriano [35, 36].

2.3.2. Trimetoprim – sulfametoxazol

Las sulfonamidas y el trimetoprim son antibióticos bacteriostáticos que inhiben la síntesis de ácido fólico en las bacterias. La sulfonamida es un antagonista competitivo o un antimetabolito del PABA (Ácido Para-aminobenzoico), e inhibe competitivamente la dihidropteroato sintasa, enzima que en condiciones normales participa en la formación de ácido dihidrofólico, que subsecuentemente se convierte en ácido tetrahidrofólico (tetrahidrofolato), purinas, y por último en ADN. Estas también pueden actuar como un sustrato para esta enzima, resultando en la síntesis de formas no funcionales de ácido fólico, que conlleva a inhibir la síntesis del ADN [37].

La resistencia a estos antibióticos puede ser de naturaleza cromosómica aumentando la producción de PABA que actúa de dos formas: neutralizando las sulfonamidas y causando cambios enzimáticos que disminuye la afinidad del antibiótico por su sitio blanco. La resistencia extracromosomal es mediada por la adquisición de plásmidos

que contiene el gen *drf* que codifica una variante de la enzima hidrofolato reductasa, la cual posee baja afinidad por el trimetoprim evitando su acción. En el caso de las sulfonamidas, la presencia de integrones portadores de genes *Sul1*, *sul2* y *Sul3* que codifican variantes de la dihidripteroato sintetasa (DHPS) mil veces menos sensible a la acción del antibiótico [37].

2.3.3. β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos como penicilinas, cefalosforinas, monobactámicos y carbapenémicos son muy utilizados en las prácticas clínicas para el tratamiento de infecciones por bacilos Gram negativos, por su amplio espectro y baja toxicidad. Esta familia inhibe el sistema enzimático implicado en la transpeptidación del peptidoglicano naciente, evitando la formación de la pared bacteriana. La resistencia se puede atribuir a cuatro mecanismos diferentes: la inactivación enzimática del medicamento, alteración del sitio blanco, incapacidad del antibiótico de alcanzar su sitio de acción debido a alteraciones de las porinas a nivel de la membrana celular y eflujo de las moléculas una vez ingresan al citoplasma [36, 38, 39].

El primer mecanismo es el más frecuente y está dado por un grupo de enzimas denominadas β -lactamasas, las cuales se clasifican en β -lactamasas de amplio espectro BLAE y de espectro extendido BLEE, las primeras capaces de hidrolizar antibióticos derivados de las penicilinas, y las segundas, además de estos, también tienen acción sobre otros β -lactámicos como las cefalosporinas de primera, segunda, tercera generación (a excepción de las cefamicinas) monobactámicos, aztreonam, pero no hidrolizan carbapenémicos [8, 40].

La primera BLEE fue identificada en un aislamiento de *Kluyvera spp* en Alemania en 1983. Desde entonces se han reportado una gran diseminación de bacterias

productoras de estas enzimas en todas partes del mundo afectando varios servicios hospitalarios incluyendo las unidades de cuidado intensivo (UCI). Las BLEE se han clasificado de acuerdo a sus características funcionales (clasificación de Bush) o según su estructura primaria (clasificación de Ambler). Esta última, es la más sencilla y las divide en cuatro grupos moleculares A, B, C y D [41-43].

Las BLEE de clase A, son las más comunes en la familia *Enterobacteriaceae*, en el sitio activo posee un residuo de serina al igual que la clase C y D, siendo sus principales representantes las nuevas variantes de las enzimas TEM, SHV y CTX-M [44]. Una de las primeras BLEE descritas en aislamientos hospitalarios fue la enzima TEM (*Temoneira*) que tiene la capacidad de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas de primera generación. Actualmente se han reportado más de 130 isoformas originadas por mutaciones puntuales del gen *bla_{TEM}* haciendo un cambio considerable en el espectro de acción cubriendo hasta cefalosporinas de tercera generación.

Las enzimas SHV (*Sulphydryl reagent variable*) es otro grupo de enzimas presente en los bacilos Gram negativos, su precursor es SHV-1, el cual se puede encontrar universalmente en *Klebsiella pneumoniae*. Esta BLEE confiere resistencia a penicilinas pero no a cefalosporinas. En 1983 se identificaron en tres aislamientos de *K. pneumoniae* una mutación en esta enzima, que se le asignó el nombre de SHV-2 plasmídica, la cual se demostró que confería resistencia a cefotaxime. Estas enzimas son derivadas de TEM y poseen más del 70% de identidad. En la actualidad se conocen más de 50 isoformas que les permite ampliar su espectro de acción. Lo anterior indica que este mecanismo de resistencia tiene gran capacidad de diversificación evolutiva y diseminación en un corto tiempo, debido a la selección que ejerce el uso indiscriminado de antibióticos en los patógenos de circulación hospitalaria y en la comunidad [45-47].

El último representante de la clase A es CTX-M que fue descrita simultáneamente en Alemania y Argentina en un aislamiento humano de *E. coli* y *Salmonella spp* a mediados de 1989 [48, 49]. Esta nueva familia de BLEE constituida por 80 enzimas clasificadas en cinco grupos (CTX-M-1, 2, 8, 9 y 25) de acuerdo a la similitud en la estructura primaria, tienen actividad hidrolítica sobre cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima (de allí deriva su nombre de cefotaximasas), ceftaxidima o ceftriaxona, y otras de cuarta generación como cefpirona y Cefadizima [50].

Actualmente CTX-M es muy común encontrar en aislamientos de *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter, spp.*, y *Serratia marcescens* de circulación hospitalaria. Por ejemplo, durante los años noventa se inicio la diseminación de Enterobacterias productoras principalmente de CTX-M-2 en el ambiente hospitalario, en Suramérica (Argentina y Colombia) y Europa [6, 51]. Pero en el año 2000 inicio la emergencia a nivel mundial de *E. coli* productora CTX-M-15 causando ITU en la comunidad. En la actualidad esta situación esta categorizada como un problema de salud mundial con característica de pandemia puesto que también tiene una gran diseminación en los diferentes ambientes comunitarios. Los principales factores de riesgo para la adquisición de bacterias productora de CTX-M en la comunidad son: el consumo de cefalosporinas y fluoroquinolonas, ITU a repetición, enfermedad renal, diabetes mellitus y hospitalizaciones previas [52]. Hasta la fecha en Colombia no se han reportado evidencia que esta β -lactamasa CTX-M-15 se encuentre circulando en aislamientos comunitarios.

La diseminación de este mecanismo de resistencia está relacionada a diferentes elementos genéticos involucrados en su movilización, el principal es el plásmido conjugativo, el cual permite la transferencia no solo entre cepas de la misma especie sino también, entre diferentes especies. La inserción de estos genes de resistencia dentro de estos plásmidos esta mediada principalmente por secuencias de inserción

(por ejemplo: ISEcp1 o inserción de secuencias ligada a ISEcp1) incorporadas a su vez en transposones o integrones. La presencia de estos genes en los elementos genéticos móviles determinan su asociación con otros determinantes genéticos de resistencia transferibles como los que confieren resistencia a aminoglicósidos y quinolonas, otorgándole a los microorganismos un fenotipo de multirresistencia [53].

2.3.4. Movilización de los mecanismos de resistencia: los integrones.

El desarrollo de la multirresistencia ocurrió en parte por el advenimiento del uso indiscriminado de antibióticos, que llevó a seleccionar eventos asociados a mutaciones puntuales, y en menor grado al desarrollo *de novo* mecanismos de resistencias; pero el principal motivo se debió a que las bacterias adquirieron la resistencia a partir de la transferencia horizontal de genes que le suministraban nuevas alternativas de supervivencia en diferentes condiciones. Esto mediado por diferentes elementos móviles como plásmidos, transposones y secuencias de inserción capaces de transferir su material mediante mecanismos como conjugación, transformación y transducción.

En 1980, aquellos elementos genéticos asociados a la adquisición y pérdida de genes fueron identificados como integrones [54], que son un nuevo sistema de recombinación sitio-específica, totalmente independiente de la proteína RecA, encargada de los eventos de recombinación homóloga bacteriana [55]. Los primeros integrones descritos se movilizaban por la maquinaria aportada por un transposón puesto que ellos se encuentran flanqueados por los genes *tnpA* y *tnpR*, los cuales están involucrados en la transposición del Tn21. Pero con la caracterización de nuevos integrones, se pudo observar que la mayoría tenían estas regiones ausentes o desorganizadas por la presencia de una secuencia de inserción (IS). Esto se pudo comprobar para los integrones de la familia In2 e In4, pertenecientes a la familia de

Tn21 y Tn1696 respectivamente, los cuales perdieron los genes de involucrados en la transposición (Figura 2) [56].

La estructura basal de los integrones está formada por el gen de la integrasa, *intI*, que posee actividad de recombinasa sitio-específica, una región reguladora (identificada como P) y un sitio de recombinación *attI*. A continuación del sitio *attI*, se encuentra la región variable que está formada por uno o más casetes integrados mediante eventos de recombinación, los cuales aportan los determinantes de resistencia a antibióticos, que se indica en la Figura 2 [57].

La clasificación de los integrones está dada según la integrasa que codifican, hasta el momento se han descrito cinco clases que se encuentran asociadas a la diseminación de los mecanismos de resistencia a antibióticos (denominadas clases 1 a 5). Estas clases están unidas físicamente a un elemento móvil, ya sea una secuencia de inserción (IS), un transposón o un plásmido conjugativo. Entre estas clases, tres (1, 2 y 3) se encuentran históricamente involucradas en el fenotipo de multirresistencia [58].

Los integrones de clase 1 son los más ampliamente distribuidos en aislamientos clínicos y están asociados a transposones funcionales o no funcionales derivados del Tn402, que a su vez pueden encontrarse insertados en Tn21. Los integrones de clase 2 están exclusivamente asociados con la familia del Tn7 [59, 60]; la integrasa (Int2) asociada a esta clase de integrones tiene la particularidad de poseer una mutación puntual que crea un codón de terminación prematuro por lo que resulta en una enzima defectiva. La remoción del codón de terminación mediante la sustitución por un residuo que permite la síntesis completa de la proteína, permitió evaluar la funcionalidad de la Int2 mutada, la cual actúa de forma similar a la Int1. Los integrones de clase 3 se

encontrarían insertados en un transposón no caracterizado. Los integrones de clase 4 y 5 poseen un rol menor en la resistencia a antibióticos [7, 61, 62].

En Colombia solo dos grupos de investigación han reportado la presencia de integrones. Pinilla y colaboradores en el 2006 identificaron la presencia de la integrasa clase 1 en aislamientos de *Staphylococcus epidermidis* aislados de puntas de catéter de neonatos de una institución en Bogotá y en el 2010 Najar y colaboradores reportó la presencia del 79.9% de integrones clase 1 en Enterobacterias aisladas de pacientes hospitalarias. Hasta la fecha no se ha identificado la presencia de aislamientos con integrasa clase 2 o 3.

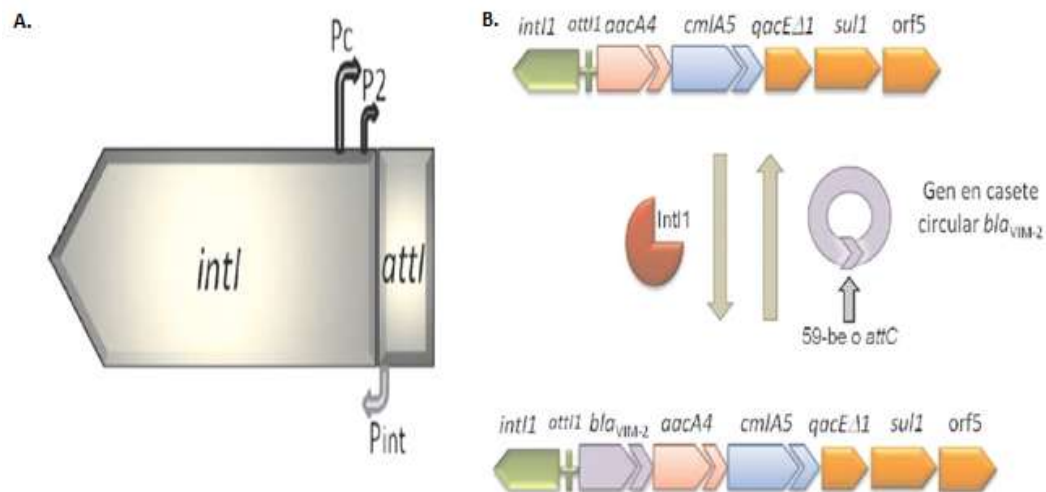


Figura 2. A. Estructura básica del integrón: se observan los componentes fundamentales para la recombinación sitio específica de esta plataforma genética: *int* gen que codifica la integrasa, *attI* sitio adyacente de la recombinación, *Pc* y *P2*, posibles promotores para la expresión de los genes casete insertados. *Pint* promotor de la integrasa. **B. Modelo de integración y escisión de los genes casetes:** Proceso por el cual el sitio específico *attI1* del integrón clase 1 reconoce el sitio *attC* (secuencia de 59 pb) del casete circular que contiene el gen de resistencia a carbapenémicos (VIM-2), para su posterior integración en la región variable. La región variable del integrón contiene otros genes de resistencia a aminoglicósidos (*aacA4*) y cloranfenicol (*cmlA5*)[57].

2.4 Epidemiología de *E. coli*.

E. coli es uno de los microorganismos más importantes en la epidemiología clínica por su amplia diseminación en el ambiente hospitalario y en la comunidad. También, por la capacidad de diversificación que permite la formación de nuevos grupos genéticos, que tienen la capacidad de causar gran variedad de enfermedades de relevancia clínica como: bacteriemias, osteomielitis, infecciones de sitio operatorio o infecciones urinarias con gravedad variable [11]. Uno de estos grupos está formado por ExPEC, que reúne patógenos como *E. coli* asociada a sepsis (SEPEC), *E. coli* asociada a meningitis neonatal (NEMEC) y por ultimo *E. coli* uropatogena (UPEC) que puede afectar a hombres y mujeres de diferentes edades [15].

El grupo de UPEC puede causar infecciones en la comunidad, presentando más de ocho millones casos de ITU no complicada (como cistitis) y hasta 127.000 casos de sépsis en los Estados Unidos anualmente. Las ITU adquiridas en la comunidad se desarrollan con más frecuencia en mujeres jóvenes, sexualmente activas y sin enfermedades de base. Algunos de los factores de riesgo para la adquisición de estas infecciones puede ser el uso de anticonceptivos orales, relaciones sexuales frecuentes y consumo de antibióticos como trimetoprim/sulfametoxazol o fluoroquinolonas [63].

En las ultimas décadas se ha registrado el cambio clonal de *E.coli* causante de ITU en la comunidad. En Inglaterra durante los años 1986 y 1987, se reportó un brote *E. coli* O15:K52:H1 que causó ITU y bacteriemias en pacientes jóvenes no hospitalizados. Posteriormente este clon fue reportado en otros países europeos y estadounidenses [64, 65]. Luego otro brote de 14 casos de ITU adquirida en la comunidad fue caracterizado en Copenhague causando por *E. coli* O78:H10 [66]. En Calgary, Alberta y Canadá se diseminó rápidamente un brote causado por *E. coli* productora de BLEE [67].

En el año 2001 fueron recuperados aislamientos de *E. coli* multirresistentes perteneciente al grupo clonal A (denominado CgA) y con un serotipo O73:K52:H18, de los cuales el 11% fueron aislados de pacientes con infección urinaria. El 49% de estos aislamientos presentaron resistencia a sulfonamidas. En el 2008 dos grupos de investigación analizaron un grupo de aislamientos de *E. coli* productores de BLEE y describieron la presencia del serotipo O25b, tipo secuencia 131 (ST131). Estos aislamientos relacionados genéticamente se han asociado a la producción de BLEE tipo CTX-M-15, y la presencia de un amplio repertorio de genes de virulencia que potencializa su patogenicidad como toxinas, hemolisinas y adhesinas [68].

La emergencia de este clon se ha registrado en varios países del mundo. En Europa un estudio realizado durante el año 2006 indicó que el 13.0 % de los aislamientos productores de BLEE fueron ST 131, en Francia el 61.0% de aislamientos resistentes a fluoroquinolonas que presentaban BLEE también pertenecía a este clon pandémico. En general se estima que aproximadamente el 25.0% de aislamientos de *E. coli* extraintestinal adquiridos en la comunidad pertenecen a este clon emergente ST131, y solo el 3,0% de los aislamientos no productores de BLEE [69, 70].

En Colombia no se cuenta con estudios epidemiológicos y moleculares que permitan determinar el comportamiento y el perfil de resistencia de los patógenos en el ambiente comunitario. Sin embargo, *E. coli* ocupa el primer lugar en la lista de patógenos de importancia clínica y epidemiológica de pacientes hospitalizados colombianos de los servicios de UCI y no UCI según el reporte de GREBO (grupo para el control de resistencia bacteriana en Bogotá), presentando un perfil de multirresistencia en el cual se incluye 45,0% de resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol (23.0%), ciprofloxacina (24.0%), ampicilina sulbactam (25.0%) y cerca del 10.0% de resistencia a cefalosporinas de tercera generación.

Por estas razones el objetivo del presente trabajo fue realizar una caracterización microbiológica, genética y molecular de aislamientos de *E. coli* causantes de infección de tracto urinario en pacientes de la comunidad, en una institución de salud de tercer nivel en Bogotá y determinar si existe o no la circulación de aislamientos pertenecientes al clon ST131 en nuestro país.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo General

Determinar los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos de uso clínico en aislamientos de *Escherichia coli* causantes de infección del tracto urinario adquirida en la comunidad en pacientes de una institución de tercer nivel en Bogotá.

3.2. Objetivos específicos:

1. Identificar los factores de virulencia presentes en los diferentes grupos filogenéticos de *E. coli* por medio de PCR múltiple.
2. Determinar el perfil de resistencia de aislamientos de *E. coli* causantes de infección del tracto urinario adquirida en la comunidad.
3. Identificar los genes que confieren resistencia a antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas en aislamientos de *E. coli* por medio de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).
4. Determinar la presencia de integrones clase 1, 2 y 3 en aislamientos de *E. coli* causantes de infección del tracto urinario adquirida en la comunidad por medio de PCR.
5. Establecer la relación genética de los patógenos causantes de infección urinaria por medio de ERIC-PCR (repetidos intergénicos consenso de Enterobacterias)

4. Materiales y métodos

En la figura 3 se muestra un esquema donde se resumen las principales estrategias metodológicas empleadas para la caracterización de los aislamientos de *E. coli* recuperados en este estudio.

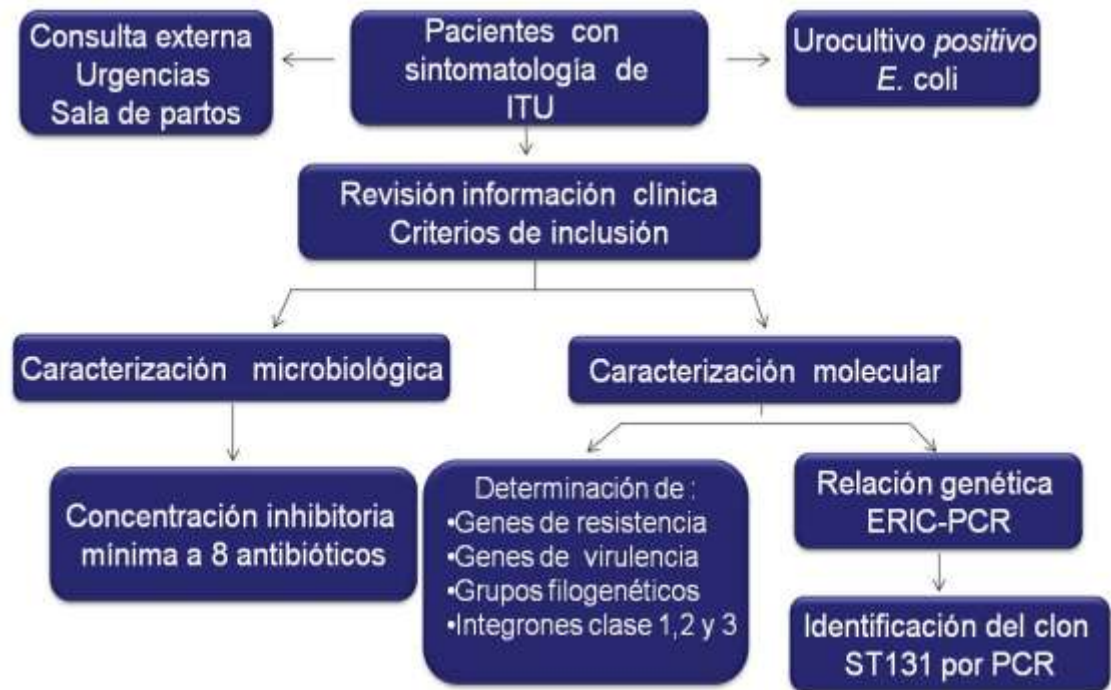


Figura 3: Diagrama de flujo de la metodología empleada en el estudio

4.1. Tipo de estudio y obtención de los aislamientos bacterianos

Se realizó un estudio observacional de cohorte transversal, en una institución hospitalaria de tercer nivel en Bogotá durante Abril a Diciembre de 2009. En este periodo de tiempo se recolectaron 317 aislamientos de *E. coli* provenientes de urocultivo correspondientes a 247 pacientes que fueron atendidos en los servicios de consulta externa, urgencias y sala de partos en una institución de salud pública de tercer nivel en Bogotá; de los cuales se incluyeron al estudio 133 pacientes que cumplieron con los siguientes criterios: sintomatología de infección de vía urinaria, en los pacientes hospitalizados esta sintomatología debió manifestarse antes de las 72 horas del ingreso a la institución hospitalaria, resultado de urocultivo positivo para *E.*

coli con un recuento mayor a 10^5 Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/ml, no estar en tratamiento de enfermedades crónicas de manejo hospitalario como cáncer o diálisis y no estar utilizando dispositivos de uso clínico como: sondas, catéter, bolsas de diálisis, etc.

A todos los pacientes se les realizó una encuesta y se les diligenció una ficha clínica con información sobre antecedentes clínicos y epidemiológicos, la cual fue complementada con la información registrada en la historia clínica (previa firma de un consentimiento informado) con el objetivo de determinar si la infección fue adquirida en la comunidad o en el ambiente hospitalario.

Los 317 aislamientos fueron enviados al Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana en medio de transporte AMIES con carbón BBL® con previa identificación y perfil de susceptibilidad realizado por el método automatizado vitek®2 de Biomereieux. Luego fueron sembrados en agar macconkey e incubados a 37°C por 24 horas para confirmar su pureza y viabilidad. Finalmente fueron almacenados en crioviales de polipropileno en caldo LB (Luria Bertani) con glicerol al 20% a -70°C, hasta su uso en los ensayos microbiológicos y moleculares.

4.2. Extracción de ADN

Se realizó una siembra de los aislamientos en agar infusión cerebro corazón (BHI) y se incubaron a 37°C por 24 horas, se tomó una colonia y se inoculó en 2 ml de caldo BHI a 37°C durante 4 horas en agitación constante (250 rpm) hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial; después de la centrifugación (10.000 rpm durante 5 minutos) el pellet bacteriano se resuspendió en 50 µl de buffer lisis (TRIS HCL 1M pH 8.0, EDTA 0.5M pH 8.0, sacarosa 7%, lisostafina 1µg/ µl y SDS 1.25%) y fue incubado a 37°C por 30 minutos en baño de María. Luego se adicionaron 150 µl de una solución de fenol cloroformo (1:1); se mezcló en vortex muy bien y se centrifugó a 10.000 rpm durante

20 minutos, al sobrenadante se le adicionó 10 µl de agua destilada estéril y se centrifuga de nuevo por 10 minutos. El sobrenadante se pasa a un tubo de 0.6 ml y se adiciona 200 µl de Etanol frío al 95% para precipitar el DNA, se incuba a -80°C por 15 minutos y luego se centrifuga a 10.000 rpm, se descarta el etanol y se deja secar a temperatura ambiente para eliminar el exceso de etanol, finalmente se resuspende el DNA con 50 µl de agua destilada estéril. La cuantificación del ADN obtenido se hizo por densidad óptica (DO_{260nm}) y calidad con la relación DO₂₆₀/DO_{280nm} empleando el NanoDrop 2000c marca BIORAD®.

4.3. Estandarización de PCR múltiple para la confirmación de especies de *Enterobacterias*.

Se realizó una búsqueda bioinformática de genes especie específicos para la identificación simultánea por PCR múltiple de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*. La secuencia de cada gen fue descargada de la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) y se diseñaron primers específicos para su amplificación por medio del programa primer y primer3. Las condiciones óptimas encontradas para la amplificación de los genes fue: denaturación a 95°C por 10 minutos, 30 ciclos a 95°C por 15 segundos, 63°C por 60 segundos, 72°C por 60 segundos y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Se usó como control las cepas *Escherichia coli* ATCC 25923 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70023. *Proteus mirabilis* Pt 09, *Enterobacter cloacae* ATCC 28631 y *Klebsiella oxytoca* ATCC 16252.

4.4. Determinación de los grupos filogenéticos de *E. coli*.

Los aislamientos de *E. coli* fueron clasificados en 4 grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) utilizando la PCR múltiple descrita por *Clemornt y colaboradores* en el 2000 [71]. Esta clasificación se basa en la presencia o ausencia de los genes: *chuA* que es requerido

para el transporte del grupo hemo en bacterias enterohemorrágicas, *yjaA*, identificado inicialmente en el genoma de *E. coli* K-12 y sin una función establecida, y el fragmento TSPE4.C2, que codifica para una lipasa putativa [72].

En la tabla 2 se muestran las combinaciones de estos genes para cada uno de los 4 grupos filogenéticos. El ciclo de amplificación fue modificado, respecto al descrito por los autores y fue el siguiente: un paso inicial de denaturación a 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los aislamientos de los grupos filogenéticos A y B1 fueron clasificados como aislamientos intestinales y los grupos filogenéticos D y B2 como aislamientos extraintestinales, de acuerdo a las recomendaciones dadas por Clermont y colaboradores [71].

Tabla 2: Combinaciones de los genes para establecer el grupo filogenético de *E. coli*.

Clasificación	Grupo filogenético	<i>ChuA</i>	<i>YjaA</i>	<i>TSPE4.C2</i>
Intestinales	A	negativo	negativo	negativo
		negativo	positivo	negativo
	B1	negativo	negativo	positivo
Extraintestinales	B2	positivo	positivo	negativo
		positivo	positivo	positivo
	D	positivo	negativo	negativo
		positivo	negativo	positivo

4.5. Determinación de factores de virulencia.

En los 133 aislamientos se detectaron los genes *papC*, *SfaD/sfaE*, *cnf1*, *usp*, *fimG/H* y *hly*, los cuales codifican para los siguientes factores de virulencia: subunidad papC del P pili, Fimbria S, factor nefrotóxico necrozante, proteína específica de uropatógeno, subunidad fimG/H de fimbria tipo 1 y α hemolisina, respectivamente. Estos genes

fueron detectados de manera simultánea por medio de la PCR descrita por *Adamus-Bialek* y colaboradores [73].

4.6. Determinación de los perfiles de resistencia.

La confirmación del perfil de resistencia de los aislamientos se estableció por medio de la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) a 8 antibióticos; Ampicilina (AMP), amikacina (AMK), ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), trimetoprim/sulfametoxazol (STX) y tetraciclina (TET) por el método de dilución en agar e interpretados de acuerdo a los criterios del CLSI (2010). La cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 fue usada como control.

4.7. Confirmación molecular de los mecanismos de resistencia a β -lactámicos, quinolonas y sulfonamidas.

Se determinó, en todos los aislamientos, la presencia de las β -lactamasas CTX-M, SHV y TEM, codificadas por los genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}, respectivamente, por medio de la PCR múltiple reportada por *Monstein y colaboradores*, pero usando como control interno de la reacción el gen 16S que se amplificó usando los primers GP169 (5'ATGGTGTGACGGGCGGTGTG3') y GP170 (5'GGAGGAAGGTGGGGATGACG3') [74]. Se usaron como controles positivos para este ensayo: la cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 (para SHV), *E. coli* CTX-M-2 (para CTX-M) y *E. coli* TEM-1 (para TEM). Las variantes para SHV, TEM y CTX-M fueron determinadas por la secuenciación de las dos hebras de ADN de los productos de amplificación obtenidos, y posterior comparación con las secuencias reportadas para estos genes en la base de datos del GenBank, por medio de alineamientos usando el programa multaling, disponible en www.expasy.org. La corresponsión a otros antibióticos (sulfonamidas y tetraciclinas) se confirmó mediante la amplificación de los genes *Sul1*, *Sul2* y *Sul3*, *TetA*, *TetB* y *TetC*, respectivamente, siguiendo las recomendaciones dadas por *Koljalg y colaboradores* [75, 76].

4.8. Determinación de integrones clase 1, 2 y 3.

La detección de los integrones 1 y 3 se realizó por medio de la amplificación de los genes *Int1* e *Int3* por PCR múltiple siguiendo las recomendaciones de Márquez y Col 2008 [7] con las siguientes condiciones de corrido: 94°C por 4 minutos 30 ciclos, de 94 °C 30 seg, 65°C por 30 seg, 72 °C por 90 seg y una extensión final de 72°C 7 minutos. La detección del integrón de clase 2 se realizó por la amplificación de la integrasa 2 con las condiciones anteriores pero con un T_m de 60°C, esperando un producto de amplificación de 789pb. Los aislamientos positivos para *Int2* se les evaluaron la funcionabilidad de la integrasa por PCR [60] y posterior secuenciación.

4.9. Relación genética por ERIC –PCR.

La relación genética de los aislamientos se realizó por medio de la amplificación por PCR de las secuencias ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), empleando los primers ERIC 1(5'CATTAGGGGTCCTCGAATGTA3')y ERIC 2(5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3') usando las siguientes condiciones: denaturación 94°C por 10 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C a 1 min, 45°C a 1 min y 72°C por 2 minutos con una extensión final de 72°C por 16 min. Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa al 0.8% [77]. El análisis de las imágenes se realizó usando el software Gelcompar versión II, empleando un coeficiente de variación de Dice (Opt 1.00%) (Tol 1,5%- 1,5%).

4.10. Determinación del clon ST131 O25:H4.

La detección del clon ST131 O25:H4 de *E. coli* se realizó por la identificación del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) de los genes housekeeping *mdh* y *papB* empleados en el MLST. El gen *mdh* se amplificó empleando la PCR reportada Clermont y colaboradores y por secuenciación de sus dos cadenas (sentido y antisentido) de DNA

se identificó el SNP C525T, específico para la variante O25b [78]. El gen *papB* se amplificó por medio de la estandarización de una PCR y posterior secuenciación para determinar los SNPs C266T y G573A, específicos para la variante del alelo relacionado con los aislamientos tipo O25b pertenecientes al grupo filogenético B2 subgrupo I [79]. Para la amplificación de este gen se diseñaron los primers pabF (5'ACCGTTGTTAGTGAAAGC3') y papR (5'GGCGAGATTACCTGATA3') que amplifica un fragmento de 456 pb. Los fragmentos fueron secuenciados empleando el secuenciador MegaBace DNA Análisis System de Amersham.

5. RESULTADOS

De los 317 aislamientos clínicos de *E. coli* causantes de infección del tracto urinario recuperados durante el periodo de estudio, se incluyeron en el estudio 133 muestras que corresponden al mismo número de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión (materiales y métodos). Los aislamientos restantes no fueron incluidos por corresponder al mismo paciente, por no cumplir con los criterios de inclusión y el consentimiento informado o por dificultades en recuperación de la muestra.

Tabla 3: Características demográficas y origen de los pacientes.

Características	n (%)	Características	n (%)
Sexo		Antecedentes	
Femenino	106 (80,0)	Diabetes mellitus	16 (12,0)
Edad en años		Uso de sonda	10 (7,5)
Menor a 30	31 (23,3)	Intervenciones urológicas	8 (6,0)
31 - 40	11 (8,3)	Cirugías	6 (4,5)
41 -50	15 (11,3)	Urolitiasis	3 (2,3)
51 -60	19 (14,3)	Malformación de vías urinarias	2 (1,5)
61 -70	16 (12,0)	Servicios	
71 - 80	21 (15,8)	Consulta Externa	91 (68,4)
Mayor a 80	9 (6,8)	Urgencias	27 (20,3)
ND	11 (8,3)	Sala de partos	15 (11,3)
Seguridad Social			
SISBEN	87 (65,4)		
ARS	13 (9,8)		
EPS	8 (6,0)		
Particular	2 (1,5)		
Régimen especial	1 (0,8)		
Ninguna	22 (15,5)		

En la tabla 3 se muestra las características demográficas de los pacientes y su distribución por servicios. De los 133 pacientes, 91 (68,4%) fueron atendidos por consulta externa, 27 (20,3%) en urgencias y 15 (11,3%) sala de partos. Ciento seis (80,0%) pacientes correspondieron al sexo femenino. El principal antecedente fue diabetes mellitus en 16 (12,0%) de los pacientes, seguido de uso de sondas 10 (7,5%) e intervenciones urológicas 8 (6,0 %). En los grupos etarios 31 (23,3 %) pacientes fueron menores de 30 años y 46 (34,6%) eran mayores de 60 años (Tabla 3). Del total de

pacientes incluidos en el estudio 87 (65,4%) presentaron como seguridad social, seguido del ARS 13 (9,8%) pacientes y EPS con 8 (6,0%). El 22 (15,5%) de los pacientes no presente ninguna seguridad social.

5.1. Estandarización de una PCR múltiple para la confirmación molecular de cinco especies de *Enterobacterias*

Todos los aislamientos se identificaron previamente utilizando el sistema automatizado Vitek®2. Para confirmar el género y la especie de los aislamientos se estandarizó una PCR múltiple en la cual, además de amplificar el gen *uidA*, específico para *E. coli*; se amplificaron los genes *wosA*, *Ehe*, *Khe*, *pehX*, específicos para *Proteus mirabilis*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, respectivamente. En la Tabla 4 se muestran los productos esperados para cada uno de los genes amplificados. En la figura 4 se muestra un gel de agarosa al 1,5% con los fragmentos amplificados para cada uno de los microorganismos analizados. Los 133 aislamientos amplificaron el gen *uidA* específico para *E. coli*.

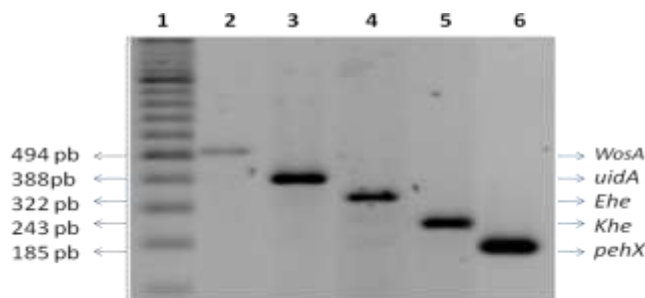


Figura 4: productos de amplificación de la PCR múltiple para la identificación de cinco especies de Enterobacterias. 1: Marcador de peso molecular (100pb); 2: *Proteus mirabilis* Pt09 3: *E. coli* ATCC 25922 4: *Enterobacter cloacae* Ent 794 5: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 6: *Klebsiella oxytoca* ATCC 43086. Los productos fueron separados en gel de agarosa al 1,5% y teñidos con solución del bromuro de etidio al 0.0002% y observados en el documentador de geles.

Tabla 4. Secuencias de los primers empleados para la detección de genes especie específicos de algunas especies de Enterobacterias.

Gen	Función	Microorganismo	Tamaño del fragmento
<i>Ehe</i>	Hemolisina	<i>Enterobacter spp</i>	322 pb
<i>Khe</i>	α hemolisina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	243 pb
<i>pehX</i>	Poligalacturonidasa	<i>Klebsiella oxytoca</i>	185pb
<i>wosA</i>	Proteína putativa	<i>Proteus mirabilis</i>	494 pb
<i>uidA</i>	beta-D-glucuronidasa	<i>Escherichia coli</i>	388 pb

5.2. Determinación del grupo filogenético de los aislamientos y sus factores de virulencia

Clermont y colaboradores en el 2009 reportaron una metodología para la clasificación de los aislamientos de *E. coli* en intestinales y extraintestinales a partir de la amplificación simultanea de los genes *chuA*, *yjaA*, y el fragmento TSPE4.C2. [71, 72]. En la figura 5 se muestra un ejemplo de los productos de amplificación esperados para cada uno de los grupos filogenéticos y su interpretación. De los 133 aislamientos analizados, 47 (35%) fueron clasificados como aislamientos intestinales; distribuidos en 39 (82%) y 8 (17%) aislamientos de los grupos filogenéticos A y B1, respectivamente. Ochenta y seis aislamientos (65%) fueron clasificados como *E. coli* extraintestinales, distribuidos en 42 (49%) y 44 (51%) aislamientos pertenecientes a los grupos filogenéticos D y B2, respectivamente (figura 6).

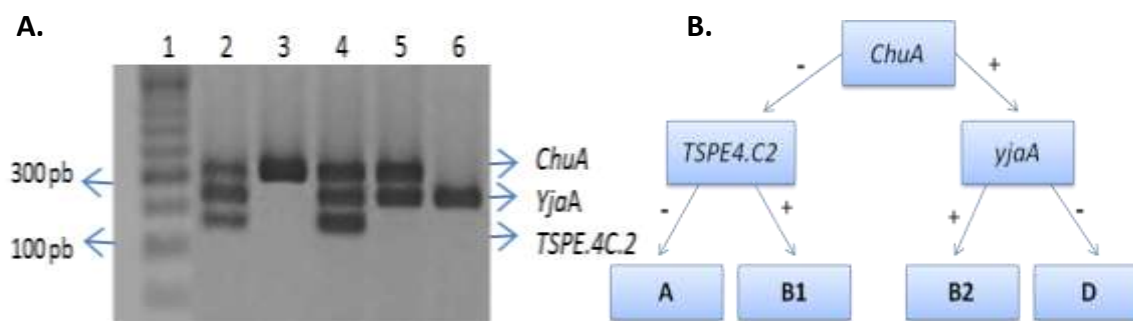


Figura 5: Determinación de los grupos filogenéticos para aislamientos de *E. coli*. A. Gel de agarosa con la combinación de los productos de amplificación esperados para los grupos filogenéticos en *E. coli* 1. marcador de peso molecular de 100 pb, 2. Aislamiento grupo B2, 3. grupo D, 4. grupo B2. 5. grupo B2, 6. grupo A, 7. grupo B2, 8 grupo A. 9. grupo B2. Esquema con la interpretación para el establecer los grupos filogenéticos según presencia o ausencia de los genes.

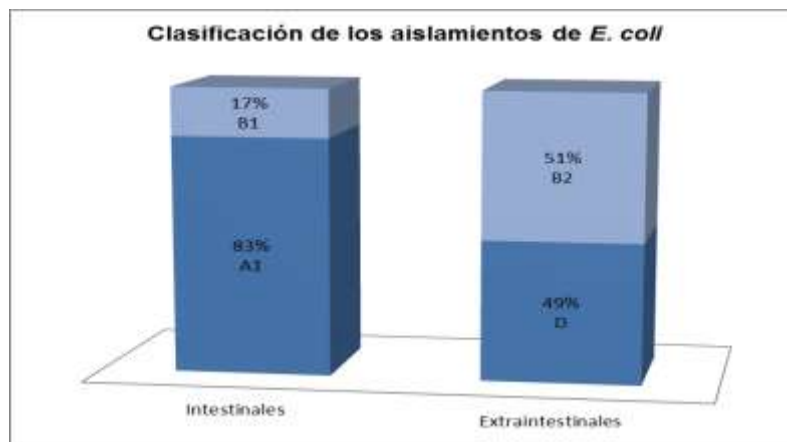


Figura 6: Clasificación de los aislamientos de *E. coli* como intestinales y extraintestinales de acuerdo a la determinación de los grupos filogenéticos. Esta clasificación se realizó por medio de la detección de los genes *chuA*, *yjaA*, y el fragmento TSPE4.C2. Según la metodología descrita por Clermont y colaboradores. Los valores en las barras corresponden al porcentaje de aislamientos calculado respecto al n de aislamientos intestinales y extraintestinales.

En la figura 7 se muestra una comparación de la frecuencia de los factores de virulencia *papC*, *SfaD/sfaE*, *cnf1*, *usp*, *fimG/H* y *hly*, en los aislamientos intestinales y extraintestinales (clasificados de acuerdo al grupo filogenético). Como puede observarse el principal factor de virulencia presente en los aislamientos y es la adhesina *fimG/H*, en 33 (70% de los aislamientos intestinales) y 74 (84% de los aislamientos extraintestinales) aislamientos, respectivamente. Sin embargo, los factores como la proteína específica de uropatógenos *usp*, la adhesina *SfaD/sfaE* y la α hemolisina solo se encontraron en 1 (2.0%) aislamiento. En ninguno de los aislamientos intestinales se encontró la presencia del gen *cnf1* que codifica el factor citotóxico necrotizante tipo 1.

En los aislamientos extraintestinales se encontraron con mayor frecuencia los 6 factores de virulencia analizados respecto a los aislamientos intestinales. El gen *usp* se encontró en 11 (13.0%) de los aislamientos, seguido de *SfaD/sfaE* 10 (12.0%) y *hly* en 9 (11.0%). El factor citotóxico necrotizante tipo 1 lo presentaban exclusivamente 7 (8.0%) aislamientos extraintestinales, pero en menor frecuencia respecto a todos los factores

de virulencia analizados. Las adhesinas codificadas por los genes *fimG/H* y *papC* fueron las más frecuentemente halladas en aislamientos extraintestinales, presentes en 72 (84.0%) y 34 (40.0%) aislamientos, respectivamente.

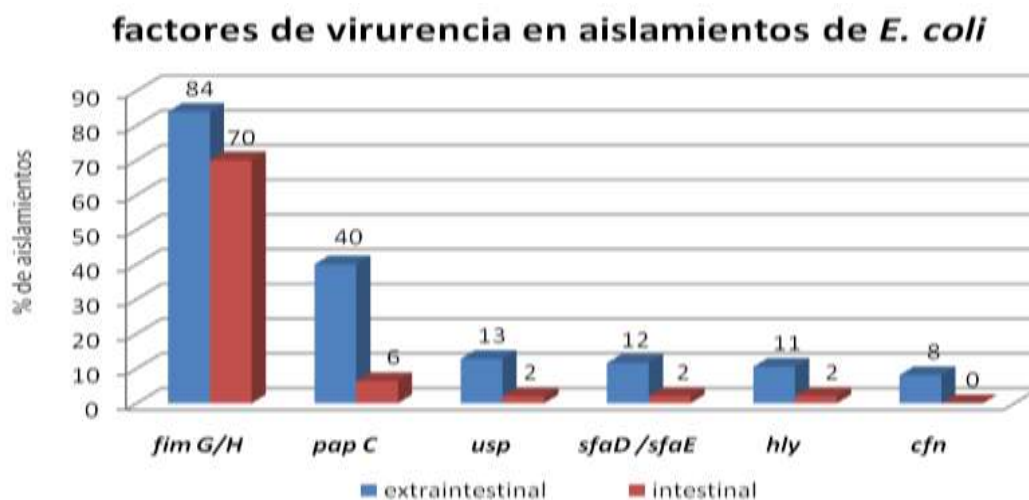


Figura 7: Perfil de factores de virulencia en aislamientos de *E. coli* intestinales y extraintestinales. Los porcentajes fueron calculados de acuerdo al número total de aislamientos encontrados en cada tipo de *E. coli* (47 intestinales y 86 extraintestinales). ***FimG/H***: subunidad *fimG/H* fimbria tipo 1, ***papC***: subunidad *papC* del P pili, ***usp***: proteína específica de uropatógeno, ***SfaD/sfaE***: Fimbria S, ***hly***: α hemolisina y ***cnf***: factor nefrotóxico necrozante tipo 1.

5.3. Perfil de resistencia de los aislamientos de *Escherichia coli* y confirmación molecular.

Los perfiles de resistencia encontrados en los aislamientos de *E. coli* causantes de ITU-AC fue el siguiente: tetraciclina 87 (65.0%) aislamientos, ampicilina 68 (51.0%), trimetoprim sulfametoxazol 65 (49.0%), ciprofloxacina 46 (34.0%), gentamicina 22 (17.0%), amikacina 21 (15.0%) y 2 (1,5%) fueron resistentes a cefalosporinas de tercera generación como Cefotaxime y ceftazidime (figura 8).

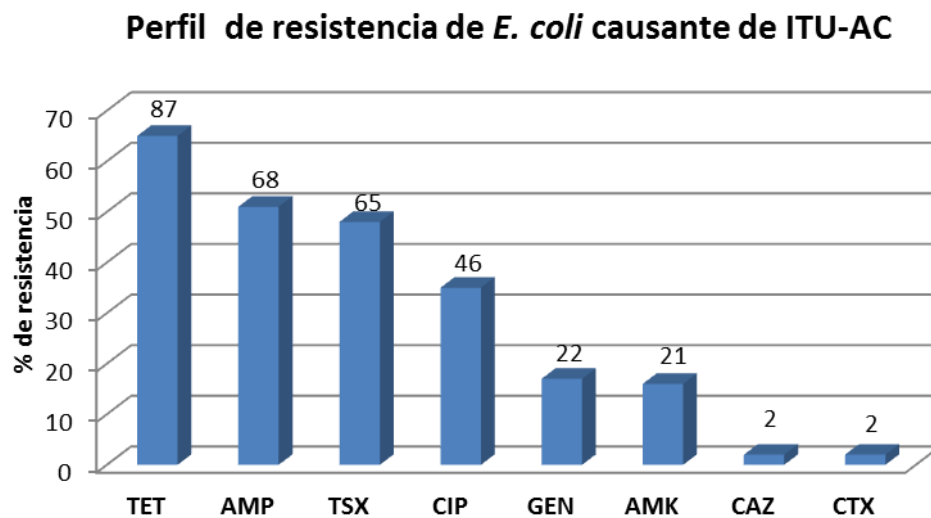


Figura 8. Perfil de resistencia de los aislamientos de *E. coli* causantes de ITU-AC. TET: tetraciclina, AMP: ampicilina, TSX: trimetoprim/sulfametoxazol, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, AMK: amikacina, CAZ: ceftazidime y CTX: cefotaxime. El número encima de las barras corresponde al n de aislamientos.

De los 133 *E. coli* analizadas, 13 (10.0%) aislamientos presentaron un fenotipo de multisensibilidad, es decir, no eran resistentes a ninguno de los ocho antibióticos evaluados, 32 (24.0%) aislamientos fueron resistentes a un solo antibiótico, de los cuales 16 (50%) fueron resistentes a TET y 9 (28.0%) a ampicilina. El perfil de multirresistencia (resistencia a más de tres antibióticos) se encontró en 43 (32.0%) aislamientos, siendo el perfil más predominante la resistencia a CIP, AMP, TET y TSX en 39 (28.0%) aislamientos. La resistencia a 5 y 6 antibióticos fue hallada en 15 (11.0%) y 2 (1.5%) aislamientos, respectivamente.

La confirmación molecular de la resistencia a antibióticos β -lactámicos se realizó por la amplificación de los genes que codifican las BLEE tipo TEM, SHV y CTX-M como se muestra en la figura 9. La BLEE más frecuente fue TEM-1, presente en 75 (56.0%) aislamientos, seguida de CTX-M-15 presentes en 2 (1.5%) y SHV-5 en un aislamiento. La variante de CTX-M fue determinada por, la identificación de la variación nucleotídica en la posición 719 (A719G) del gen *Bla*_{CTX-M-15} por secuenciación (de las dos hebras de

DNA) y alineamiento con el gen *Bla*_{CTX-M-3} (gen precursor de esta familia de BLEE) (figura 10). La variante de la enzima SHV fue determinada por el mismo procedimiento mencionado anteriormente. Cincuenta y ocho (44%) aislamientos no presentaron ninguna de las BLEE evaluadas.

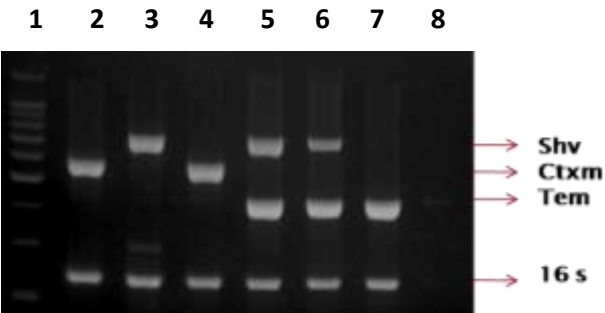


Figura 9: Amplificación de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} que codifican BLEE en aislamientos de *E. coli* causante de ITU. Carril 1: marcador de pesos molecular 2. Control positivo para CTX-M cepas de *E. coli* CTX-M-2, 3. Control positivo para SHV cepa de *E. coli* positiva para SHV-1, 4. Control positivo CTXM-12 5. Aislamiento clínico Ec 21, 6. Aislamiento clínico *K. pneumoniae* KP 37, 7. Aislamiento clínico EC 14. 8: control negativo.

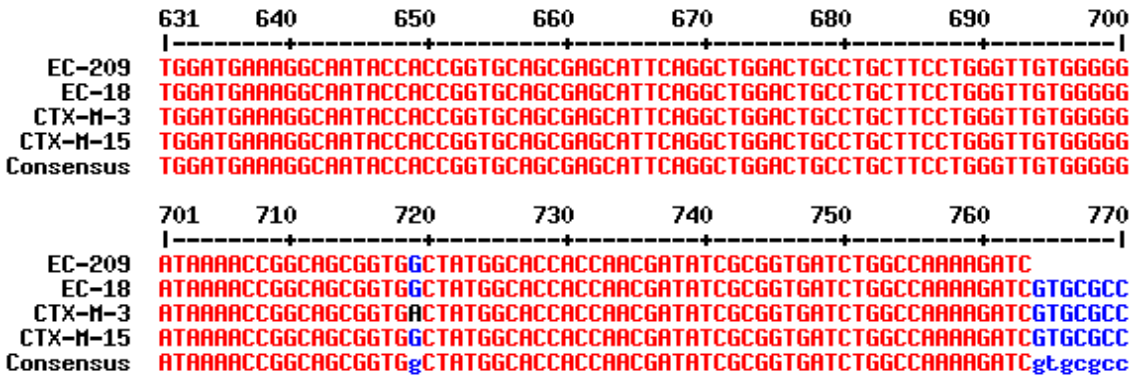


Figura 10. Alineamiento de las secuencias de CTX-M-15 en aislamientos de *E. coli*. Comparación de las secuencias de CTX-M-15 y los dos aislamientos clínicos EC-209 y EC-18 en los cuales se observa la variación de A719G.

La corresponsencia a tetraciclina se evaluó por la presencia de los genes *tet*, siendo el más frecuente *tetA*, presente en 31 (23.0%) aislamientos. Los genes *tetC* y *tetB* fueron encontrados en 22 (17.0%) y 5 (4.0%) aislamientos, respectivamente. La presencia

simultánea de *TetA* y *TetC* se encontró en 6 (5.0%) aislamientos. Estos tres genes no se encontraron en 81 (61%) aislamientos, de los cuales 46 (34.0%) eran resistentes a tetraciclina, esto supone la presencia de otros mecanismos de resistencia. Igualmente se determinó la resistencia a sulfonamidas por medio de la amplificación de los genes *Sul1*, *Sul2* y *Sul3*, pero solo se encontró el gen *Sul1* en 33 (24,8%) aislamientos. En la figura 11 se muestra una comparación de la frecuencia de todos los genes de resistencia en los aislamientos intestinales y extraintestinales. Como puede observarse los genes *BlaTEM*, *tetA*, *tetC* y *sul1* fueron lo que se encontraron con mayor frecuencia, pero no se encontró una diferencia significativa entre los dos grupos de aislamientos.

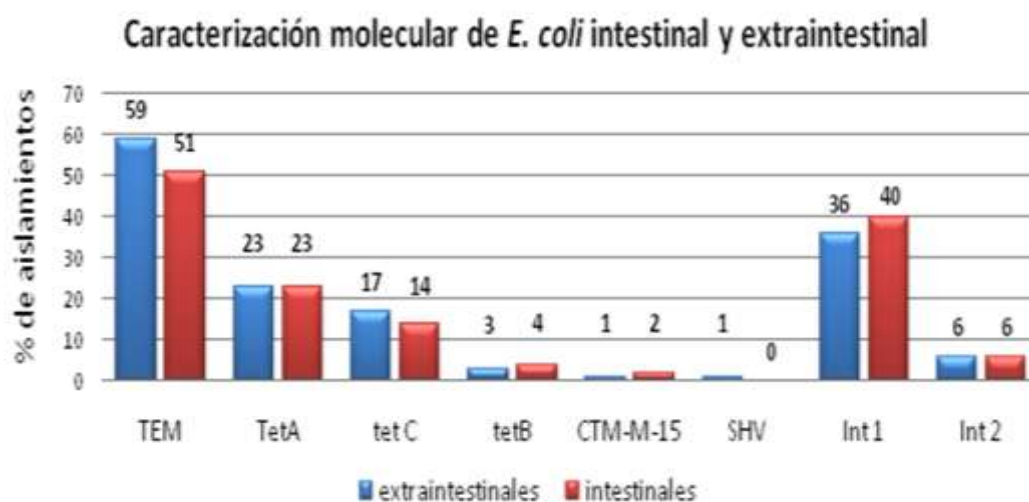


Figura 11. Distribución de las características moleculares en los aislamientos de *E. coli* de acuerdo a la clasificación filogenética. Genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos *TEM*, *SHV* y *CTX-M*, genes de resistencia a tetraciclinas, *tetA*, *tetB*, *tetC*; Int 1: integrasa 1, Int2: integrasa 2. Los valores encima de la barra indican el porcentaje que fue calculado respecto al n de cada grupo. Extraintestinal 86 aislamientos e intestinal 47 aislamientos

5.4. Determinación de integrones clase 1, 2 y 3

Cincuenta (38.0%) aislamientos albergaron el integrón de clase 1 y el integrón de clase 2 solo se detectó en 9 (7.0%) aislamientos. El integrón de clase 3 no fue encontrado en ningún aislamiento de *E. coli*. La secuenciación de los 9 genes *int2* (que codifica para la

integrasa II) encontrados en los aislamientos de *E. coli* mostró la presencia del codón de parada TAA, lo cual significa que ninguno de ellos posee una integrasa II funcional.

Los integrones son plataformas de captura y transferencia horizontal de genes de resistencia y pueden estar asociados a otras plataformas genéticas que pueden albergar otros genes de resistencia, ocasionando que, en un solo evento genético de transferencia, el aislamiento receptor adquiriera resistencia a múltiples antibióticos. En la figura 12 se muestra la relación entre la presencia del integrón clase 1 y la corresponsencia de los aislamientos a varios antibióticos. De acuerdo a los datos obtenidos puede decirse que los integrones de clase 1 fueron encontrados con mayor frecuencia en aislamientos con resistencia a cuatro y cinco antibióticos (en 14 (28.0%) y 15 (30.0%) aislamientos, respectivamente), entre los que se encuentran tetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazol y gentamicina y β -lactámicos como ampicilina y ceftazidima y cefotaxima.



Figura 12: Corresponsencia en aislamientos de *E.coli* con presencia de integrón clase 1. Las barras indica el porcentaje de aislamientos que presentan resistencia de uno a siete antibióticos evaluados pertenecientes a la familia de aminoglicósidos, β -lactámicos, tetraciclinas, sulfonamidas y quinolonas.

5.5 Relación genética por ERIC –PCR

En la figura 13 se muestra la relación genética de los aislamientos de *E. coli* causantes de ITU adquirida en la comunidad de acuerdo a la amplificación de sus secuencias ERIC. Todos los aislamientos presentaron una similaridad mayor al 80.0% respecto a la cepa ATCC 25922 de *E. coli* multisensibles, y se agruparon en 8 subgrupos diferentes (I al VIII). La distribución de los aislamientos en cada uno de los 8 subgrupos fue: I con 74 (55,6%) y II con 24 (18,0%), III y IV con 2(1.5%) aislamientos cada uno, V y VI con 3(2,2%) cada uno, VII con 4(3.0%) y VIII con 8(6.0%). A los 13(9.7%) aislamientos que no se relacionaban genéticamente con los demás aislamientos analizados se reunieron en un grupo diferente denominado otros. Las características genéticas de cada uno de los subgrupos se muestran en la tabla 5.

Estos resultados muestran que más de la mitad de los aislamientos de *E. coli* analizados se agrupan en un único subgrupo (I); todos los aislamientos no son idénticos genéticamente, pero están relacionados, y presentan un comportamiento clonal. Los dos subgrupos principales son I y II conformados principalmente por *E. coli* extraintestinales 46 (62.2%) y 20 (91.0%) aislamientos respectivamente, mientras que los subgrupos V y VI se encuentran en mayor frecuencia los aislamientos intestinales. Respecto a los factores de virulencia *fimG/H* en la adhesina más frecuente en todos los subgrupos (excepto subgrupo V). En los aislamientos de los subgrupos I, II y VII se identificaron los seis factores de virulencia como *papC*, *SfaD/sfaE*, *cnf1*, *usp*, *fimG/H* y *hly*. Los *E. coli* que solo poseen adhesinas pertenecen a los subgrupos III, IV, V, VI y el denominado otros. En el subgrupo VIII se encontró la mayor frecuencia (37.0%) de aislamientos con la proteína específica de uropatógenos, seguido del grupo II (9.0%) y I (8.1%).

Los aislamientos del grupo V no presentaron integrones (clase 1 y 2), ni ninguno de los genes de resistencia evaluados. Respecto a la presencia de TEM se encontró en el 75.0% de los aislamientos del grupo VII, SHV solo se identificó en un aislamiento del grupo II, los aislamientos de *E. coli* productoras de CTX-M-15 se clasificaron en los subgrupos I y VII. En todos los subgrupos (excepto el V) se encontró la presencia del integrasa clase 1 y 2 se encontró en patógenos de tres subgrupo (I, II y Otros) siendo más frecuente en el subgrupo I.

Tabla 5. Características moleculares de los subgrupos clónales de *E. coli*.

Subgrupo	Clasificación n(%)	Perfil de virulencia n(%)	Gene de resistencia n(%)	Integrón n(%)
I n=74	ExEC 46 (62.2%) InEC 28 (37.9%)	<i>fimG/H</i> 60(81.1%) <i>PapC</i> 20 (27.0%) <i>SfaD/E</i> 8 (10.8%) <i>Hly</i> 7 (9.5%) <i>Usp</i> 6 (8.1%) <i>cnf1</i> 5 (6.8%)	<i>TEM</i> 44(59.5%) <i>CTX-M-15</i> 1(1.4%) <i>Tet A</i> 17(23.0%) <i>Tet C</i> 14(18.4%) <i>Tet B</i> 4 (5.40%)	<i>Int 1</i> 30 (40.5%) <i>Int 2</i> 7 (9.4%)
II n=24	ExEC 20(91.0%) InEC 2 (9.1%)	<i>fimG/H</i> 18(81.1%) <i>PapC</i> 10 (45.5%) <i>Usp</i> 2 (9.0%) <i>SfaD/E</i> 1 (4.5%) <i>Hly</i> 1 (4.5%) <i>cnf1</i> 1 (4.5%)	<i>TEM</i> 11(45.8%) <i>SHV</i> 1(4.1%) <i>Tet A</i> 8(33.3%) <i>Tet C</i> 2 (8.3%)	<i>Int 1</i> 7 (21.1%) <i>Int 2</i> 1 (4.1%)
III n=2	ExEC 3 (100.0%)	<i>fimG/H</i> 2(66.7%)	<i>TEM</i> 2(66.6%) <i>Tet A</i> 1(33.3%)	<i>Int 1</i> 1 (50.0%)
IV n=2	ExEC 2(66.7%) InEC 1 (33.3%)	<i>fimG/H</i> 3(100.0%)	<i>TEM</i> 1(50.0%)	<i>Int 1</i> 1 (50.0%)
V n=3	InEC 2 (66.7%) ExEC 1 (33.3%)	<i>PapC</i> 2(66.7%) <i>fimG/H</i> 1(33.3%)	-	-
VI n=3	InEC 2 (66.7%) ExEC 1(33.3%)	<i>fimG/H</i> 2(66.7%) <i>PapC</i> 1(33.3%)	<i>TEM</i> 2(66.6%) <i>Tet C</i> 1(33.3%)	<i>Int 1</i> 2 (50.0%)
VII n=4	ExEC 2 (50.0%) InEC 2(50.0%)	<i>fimG/H</i> 4(100.%) <i>PapC</i> 2 (50.0%) <i>Usp</i> 1 (25.0%) <i>SfaD/E</i> 1 (25.0%) <i>Hly</i> 1 (25.0%) <i>cnf1</i> 1 (25.0%)	<i>TEM</i> 3(75.0%) <i>CTX-M-15</i> 1(25.0%) <i>Tet C</i> 2(50.0%)	<i>Int 1</i> 1 (25.0%)
VIII n=8	InEC 4(50.0%) ExEC 4 (50.0%)	<i>fimG/H</i> 6(75.0%) <i>usp</i> 3 (37.5%)	<i>TEM</i> 5(62.5%) <i>Tet A</i> 4(50.0%) <i>Tet B</i> 1(12.5%)	<i>Int 1</i> 3 (37.0%)
Otros n=13	ExEC 7 (53.8%) InEC 6(46.1%)	<i>fimG/H</i> 3(23.0%)	<i>TEM</i> 2(15.35%) <i>Tet A</i> 1(7.6%) <i>Tet C</i> 3(23.0%)	<i>Int 1</i> 5(38.4%) <i>Int 2</i> 1(7.6%)

ExEC: *E. coli* uropatogena extraintestinal, InEC: *E. coli* uropatogena extraintestinal, (-) ningún aislamiento

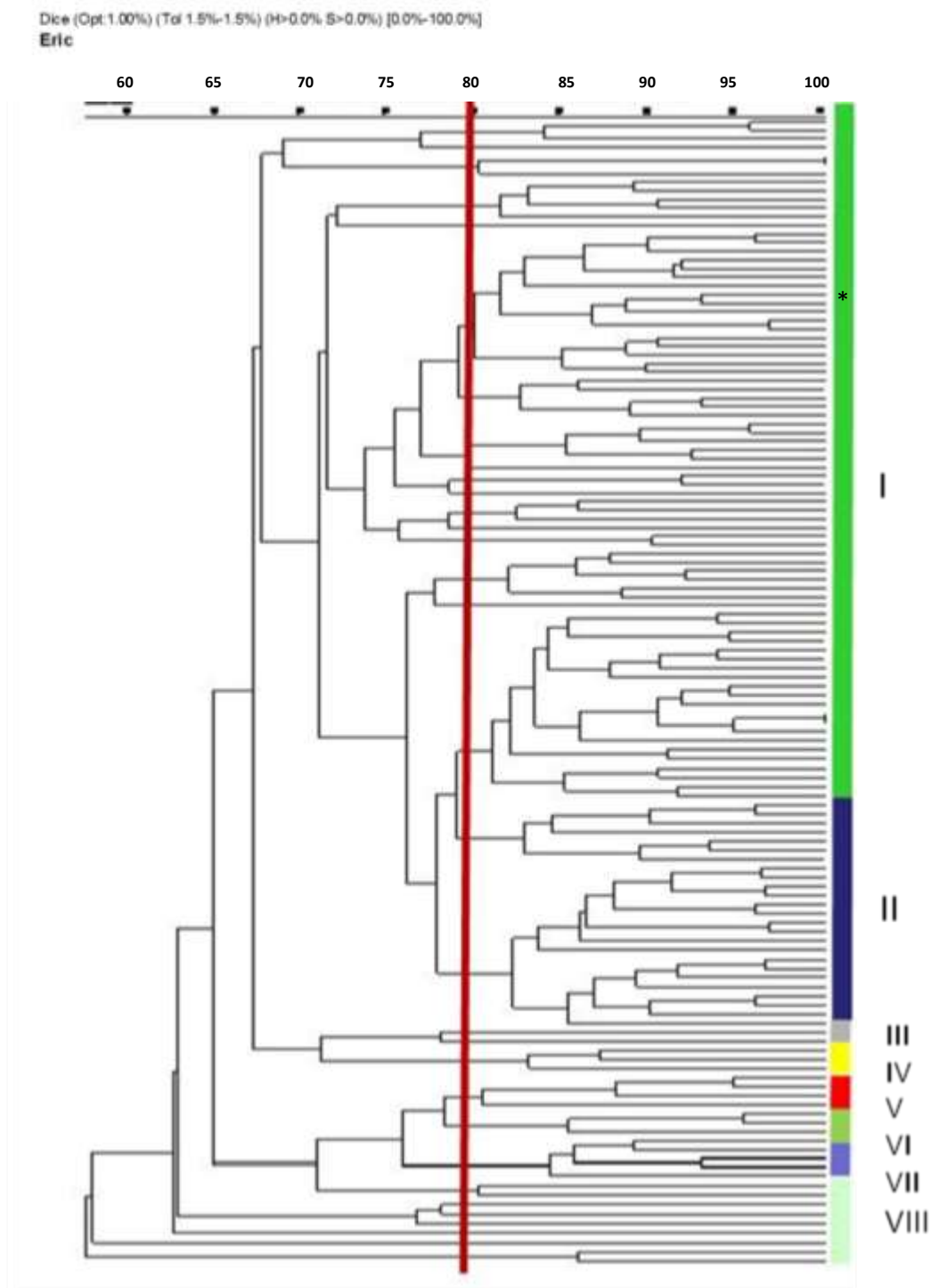


Figura 13: Dendrograma de los 133 aislamientos de *E. coli* causante de ITU-AC donde se muestra su relación genética. El asterisco muestra la posición de la cepa ATCC 25922.

En la tabla 7 se muestra la comparación de los aislamientos intestinales y extraintestinales, los pacientes de este último grupo el 26,7% son menores de 30 años y el 11.6% presentan como principal antecedente clínico diabetes mellitus al igual que en los intestinales el 12.7%. Las malformaciones de vías urinarias y urolitiasis solo se identificaron en pacientes con aislamientos extraintestinales con 2.3% y 3.4 % respectivamente.

Tabla 7. Cuadro comparativo de aislamientos de *E. coli* intestinales y extraintestinales.

Característica	Intestinales n(%)	Extraintestinales n(%)
Datos demograficos		
Género	39(82.9%)	67 (77.9%)
Edad en años		
Menor a 30	9 (19.1%)	23 (26.7%)
31 – 40	6(12.7%)	5 (5.8%)
41 -50	5(10.6%)	10 (11.6%)
51 -60	6(12.7%)	13 (15.1%)
61 -70	6(12.7%)	10 (11.6%)
71 - 80	7 (14.1%)	14 (16.3%)
Mayor a 80	3 (6.4%)	6 (6.9%)
ND	5(10.6%)	6 (6.9%)
Antecedentes clinicos		
Malformación de vías uri.	0 (0.0%)	2 (2.3%)
Diabetes mellitus	6(12.7%)	10 (11.6%)
Urolitiasis	0 (0.0%)	3(3.4%)
Cirugías	1(2.1%)	4(4.6%)
Intervenciones urológicas	2 (4.2%)	7 (8.1%)
Uso de sonda	1(2.1%)	8 (9.3%)
Genes de resistencia		
<i>TEM</i>	24 (51,1%)	51 (59.3%)
<i>SHV</i>	0 (0.0%)	1 (1.1%)
<i>CTX-M-15</i>	1 (2.1%)	1 (1.1%)
<i>Tet A</i>	11 (23,4%)	20 (23.2%)
<i>Tet B</i>	2 (4.2%)	3 (3.4%)
<i>Tet C</i>	7 (14,8%)	15 (17.4%)
Perfil de resistencia	AMK, TET 3 (6.3%) AMP,TET 6 (12.7%) CIP TET AMP 7 (14.8%) CIP, TET, AMP , GEN 4 (8.5%) CIP, TET, AMP ,STX, GEN 1 (2.1%) CIP, TET, AMP ,STX, CAX, CAZ 1(2.1%)	TET 11 (12.7%) AMP, TSX 4 (4.6%) AMK, TSX, TET 7 (8.1%) CIP, TET, AMP ,STX 10 (11.1%) CIP, TET, AMP ,STX, GEN 8 (9.3%)
Integrón		
Clase 1	19 (40.4%)	31 (36.0%)
Clase 2	3 (6.3%)	6 (6.9%)
Factores de virulencia	Sin factores 12 (25.5%) <i>fimG/H</i> 30 (63,8%) <i>papC</i> 1(2.1%) <i>usp</i> 1 (2.1%) <i>usp, fimG/H</i> 1 (2.1%) <i>papC, SfaD/E, fimG/H y hly</i> 1 (2.1%)	Sin factores 9 (10.4%) <i>fimG/H</i> 38 (44.1%) <i>papC, fimG/H</i> 3 (26.7%) <i>papC, SfaD/E, cnf1, fimG/H y hly</i> 3 (3.4%) <i>papC, SfaD/E, usp, fimG/H y hly</i> 3 (3.4%) <i>papC, SfaD/E, cnf, usp, fimG/H y hly</i> 3 (3.4%) <i>usp, fimG/H</i> 2 (2.3%) <i>cnf, usp, fimG/H</i> 1 (1.1%) <i>papC, cnf</i> 1 (1.1%) <i>papC, SfaD/E.</i> 1 (1.1%) <i>SfaD/E.</i> 1 (1.1%) <i>SfaD/E, fimG/H</i> 1 (1.1%)

5.6. Determinación del clon ST131 O25:H4

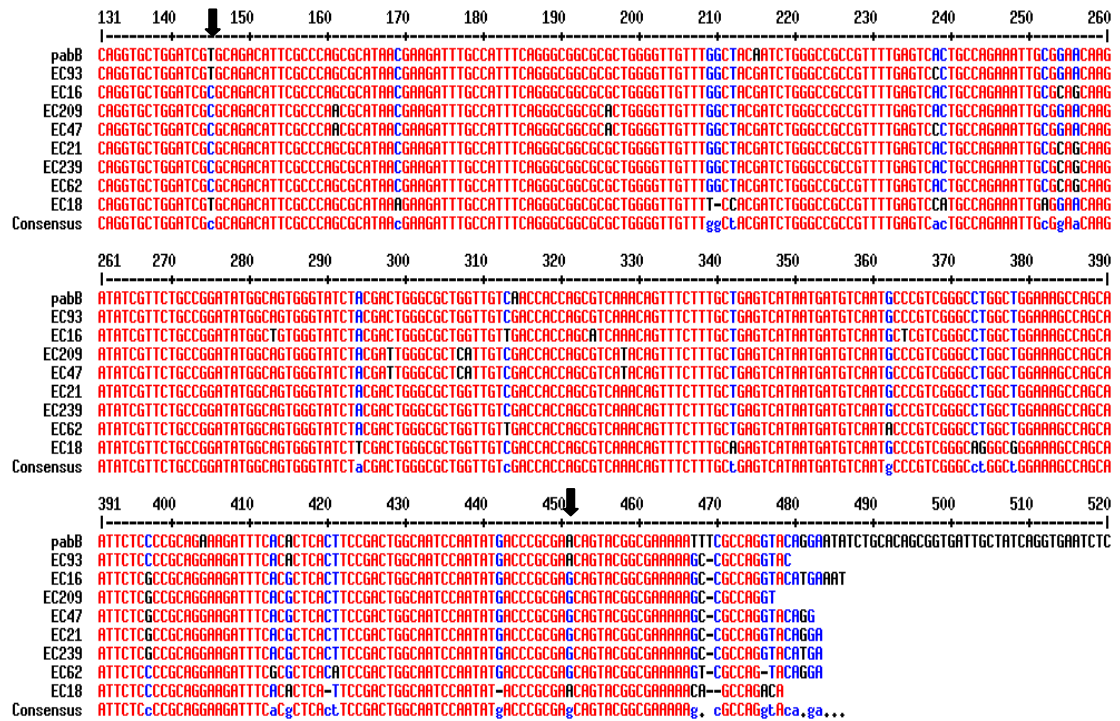
De los 133 aislamientos analizados, nueve aislamientos del grupo filogenético B2 y 1 del grupo B1 (portador de CTX-M 15) fueron seleccionados para determinar su relación con el clon ST131 O25:H4 por medio de la secuenciación de los genes *pabB* y *mdh*. De los 9 aislamientos analizados, 2 (EC93 y EC18) contenían los SNP C266T y G573A en el gen *pabB*, característicos del clon ST131 (figura 14). En contraste, la secuenciación del gen *mdh* identificó 5 aislamientos con el cambio nucleotídico C525T, característico del clon ST131, dos de estos fueron los aislamientos EC93 y EC18, que contienen también la mutación en el gen *papB*, y los otros tres fueron los aislamientos EC209, EC21 y EC38 (figura 14). Los aislamientos EC18 y EC209 albergan las enzimas CTX-M-15 y TEM-1, poseen integrón clase 1, el primero posee el gen *tetA* y el segundo el gen *tetC* y pertenecen a los grupos filogenéticos B2 y B1, respectivamente. En la tabla 6 se relacionan las características genéticas, microbiológicas y moleculares de los 5 aislamientos relacionados con el clon ST131, asignados ya sea por el gen *papB* o por el gen *mdh*.

Tabla 6. Características moleculares de aislamientos relacionados con el clon ST131

n	TEM-1	CTX-M-15	SHV- 5	Tet A	Tet C	int	Grupo filogenético	Subgrupo	Factores de virulencia	Perfil de resistencia
18	+	+	-	+	-	Int 1	B2	1	<i>papC</i> , <i>fimG/H</i>	AMK, CIP, STX, TET
21	+	-	+	-	-	Int 2	D	2	<i>papC</i> , <i>fimG/H</i>	AMK, STX, TET
38	+	-	-	-	-	Int 1	D	1	<i>papC</i> , <i>fimG/H</i>	AMK, TET
93	+	-	-	+	-	Int 1	B2	3	<i>fimG/H</i>	AMP, GEM, CIP, TET
209	+	+	-	-	+	Int 1	B1	7	<i>fimG/H</i>	AMP, CTX, CIP, TET

Estos resultados confirman la circulación de aislamientos de *E. coli* ST131 causantes de ITU adquirida en la comunidad en pacientes colombianos, con y sin la adquisición de la cefotaximasa CTX-M 15.

A.



B.

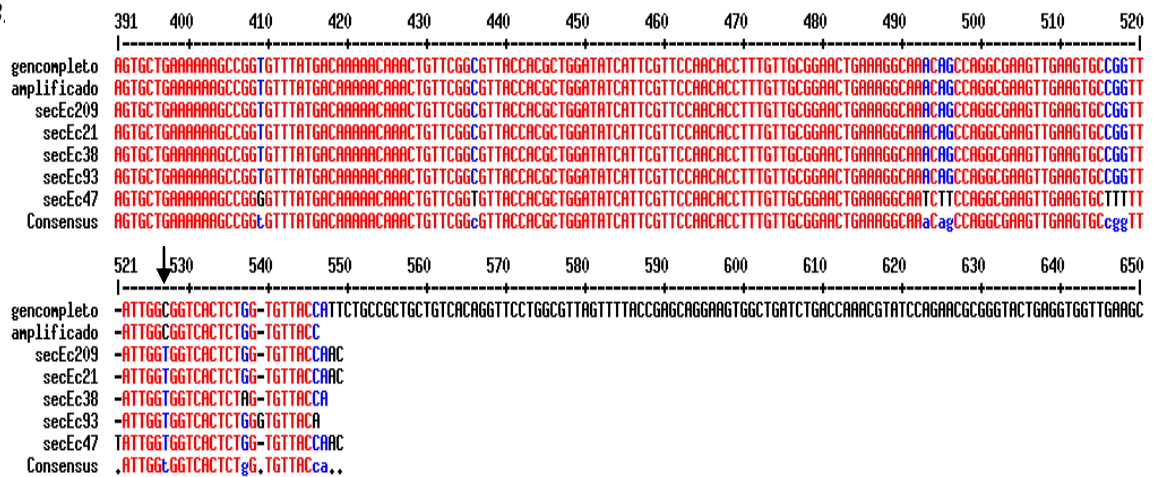


Figura 14. Alineamiento para la determinación de *E. coli* ST 131 A. de las secuencias del gen *pabB* de aislamientos de *E. coli* pertenecientes al grupo filogenético B2 para la identificación del clon ST131. Las flechas indican el cambio de los nucleótidos específicos. La fila pabB indica la secuencia correspondiente al gen *pabB* de aislamientos ST131, las demás filas contienen las secuencias obtenidas por la secuenciación de los aislamientos clínicos. Las flechas indican el cambio de los nucleótidos específicos C266T y G573A B. Alineamiento de las secuencias del gen *mdh* de aislamientos de *E. coli* pertenecientes al grupo filogenético B2 para la identificación del clon ST131. Las flechas indican el cambio de los nucleótidos específicos C525T.

6. Discusión

E. coli es uno de los microorganismos con mayor diversificación epidemiológica existente, puesto que hay aislamientos que pueden ser ambientales, colonizadores de seres humanos y animales; permanecer durante varios años sin causar patologías o tener alteraciones genéticas que aumentan su patogénesis; otro gran grupo tiene la capacidad de adquirir información genética constantemente, lo cual le permite la supervivencia y diferenciarse en varios ambientes u hospederos, dando origen a gran cantidad de clones [11]. Análisis genómicos comparativos de las cepas secuenciadas ha permitido identificar fragmentos de DNA específicos de clones comensales, patogénicos y ambientales, la presencia de estos genes ha logrado establecer grupos filogenéticos principales (como A, B1, B2 y D) de *E. coli*. Los dos primeros se relacionan con patógenos intestinales o comensales y los dos últimos con los patógenos extraintestinales capaces de causar gran variedad de patologías agudas o crónicas [11,71].

Nowrouzian y colaboradores reportó en 2009 una prevalencia de los grupos filogenéticos en 1.117 aislamientos de *E. coli* así: grupo A el más predominante (40.0%), seguido por B2 (25.0%), mientras que B1 y D (17.0% cada uno) son menos comunes [80]. En un estudio multicéntrico realizado en Corea durante 2007 se encontró una mayor prevalencia de aislamientos de *E.coli* pertenecientes al grupo filogenético D (35.7%) causantes de ITU en la comunidad, seguido del grupo B2 (34.1%) [81], es decir que más del 69.0% de las infecciones fueron ocasionadas por aislamientos de *E. coli* extraintestinales. Estos datos están de acuerdo a los encontrados en este estudio, pues el 64.5% de las infecciones analizadas fueron causadas por aislamientos extraintestinales (grupo B2 33.0 % y grupo D 31.5%).

La ITU es una de las patologías más frecuentes causada *por E. coli* a nivel mundial, y ocasiona enormes costos a los sistemas de salud, por ejemplo, se estima que en Estados Unidos ocasiona gastos económicos cercanos a los 2.5 billones de dólares anuales. Adicionalmente, estas infecciones afecta principalmente a mujeres jóvenes, con vida sexual activa, uso de espermicidas o diafragmas, uso de antibióticos y hospitalizaciones previas [82]. Los datos encontrados en nuestro estudio muestran que el 31.6% de las muestras fueron recuperadas de personas jóvenes (menores de 40 años) y el 80.0% de los aislamientos totales fueron recuperados de mujeres, de las cuales el 11.3 % estaban en embarazo o en periodo post-parto, confirmando el alto impacto que tienen este tipo de infecciones en el género femenino. Aunque este estudio se enfocó en las ITU de comunidad, se recolectaron datos clínicos y epidemiológicos para establecer los antecedentes a largo plazo de los pacientes (más de 6 meses antes de ingresar al estudio) como diabetes mellitus, intervenciones urológicas y otras cirugías (16.0%, 6.0% y 4.5 %, respectivamente) fueron los principales antecedentes encontrados en los 133 pacientes analizados. Un resultado bastante interesante fue que, de los 133 pacientes incluidos en el estudio, 87 (65.4%) estaban afiliados al SISBEN y 22 (15.5%) no tenía ningún tipo de seguridad social, es decir que el 80.0% de los pacientes posiblemente no estaba vinculado a una empresa y/o no tenía un trabajo formal.

Una de las características más interesantes de *E. coli* es su alta variabilidad genética que incluye, la continua adquisición de islas de patogenicidad, islas genómicas y mecanismos de resistencia a los antibióticos. Este constante cambio genético y su adaptación en el huésped humano le ha permitido diseminarse y permanecer en el ambiente hospitalario. El uso exagerado, incontrolable e irracional de los antibióticos en los hospitales ha ocasionado el surgimiento de clones multirresistentes de esta bacteria, por la adquisición de elementos móviles con nuevos rearrreglos genéticos que

han ligado varios genes de resistencia. Sin embargo, este fenómeno no es exclusivo de *E. coli* causantes de infecciones hospitalarias, en los últimos años se ha reportado el incremento de aislamientos resistentes en la comunidad, por la adquisición de los genes de resistencia identificados inicialmente en aislamientos hospitalarios u otros nuevos. Estos aislamientos en la comunidad tienen la posibilidad de interactuar con otro tipo de microorganismos ambientales, estar sometidos a condiciones extremas que puede favorecer la adquisición de material genético del hábitat con el que interactúan [83]. Diversos estudios han mostrado que el traslado de estos genes de resistencia a aislamientos en la comunidad es mucho más preocupante, ya que se ha comprobado que estos son mucho más virulentos que sus homólogos de circulación hospitalaria, por el transporte en su genoma de islas de patogenicidad diferente.

En las últimas décadas se ha visto el incremento de la resistencia antimicrobiana en los aislamientos de *E. coli* de la comunidad. Inicialmente se reportó la resistencia a antibióticos específicos como: trimetoprim/sulfametoxazol, ampicilina o tetraciclina. Sin embargo la transferencia horizontal de información genética entre diferentes especies ha permitido la adquisición de resistencia a familias de antibióticos completas como por ejemplo las BLEE que tienen acción en la mayoría de β -lactámicos [84].

En un estudio publicado por *Lee y colaboradores* en el 2010 se evaluaron 543 aislamientos de *E. coli* de la comunidad causando ITU; de los cuales el 69.1% fueron resistentes a ampicilina, 28.4% a ciprofloxacina, y 20% a trimetoprim/sulfametoxazol [81]. En los aislamientos de comunidad (considerados por años como multisensibles) nosotros encontramos porcentajes de resistencia un poco más altos, comparados con este estudio, para antibióticos como trimetoprim/sulfametoxazol (51%) y ciprofloxacina (49%); y más bajas para ampicilina (51.0%). Adicionalmente, en el 32.0% de los aislamientos se encontró resistencia simultánea a cuatro antibióticos (los perfiles

CIP-TET-AMP-STX y CIP-TET-AMP-GEN fueron los más frecuentes). De acuerdo a los datos reportados por el grupo GREBO (www.grebo.org/resistencia.asp), los aislamientos hospitalarios de *E. coli* poseen 25.0% de resistencia a ampicilina, 45.0% trimetoprim/sulfametoxazol y 24.4% a ciprofloxacina. Estos datos, aunque provienen de un número total de aislamientos y fuentes diferente, muestran una posible tendencia de los aislamientos de *E. coli* de circulación en la comunidad a aumentar su resistencia a antibióticos de primera elección, lo cual posiblemente ocasiona que los pacientes presenten una falla en el tratamiento empírico (automedicado o proporcionado por entidades prestadoras de salud) en forma recurrente y se vean en la necesidad de acudir a los centros de salud de tercer nivel con infecciones mas complejas.

Los análisis moleculares mostraron que el 74% de los aislamientos resistentes a ampicilina poseían el genes *bla*_{TEM-1}, de los aislamientos resistentes a tetraciclina se identifico alguna de las variantes del gen *tet* en el 51%, lo que hace pensar que posiblemente la resistencia es debido a otro mecanismo de resistencia como bombas de eflujo. Esta variedad de mecanismos de resistencia es posible que la mayoría se hayan adquirido por medio de mecanismo de transferencia de genes como los integrones clase 1 que se encontró en el 38% de los aislamientos e integrones clase 2 presentes en el 7% de *E. coli*, lo cual es muy interesante puesto que la primera vez en se reporta la presencia de la integrasa II en aislamientos colombianos.

En el 2008, dos estudios reportaron la diseminación en tres continentes de aislamientos de *E. coli* productores de BLEE pertenecientes al grupo filogenético B2, con un serotipo O25b y un tipo de secuencia 131 (ST131). En estos estudios los autores también determinaron que estos aislamientos albergan con mayor frecuencia la enzima CTX-M-15, además la presencia de un amplio repertorio de genes virulencia (*maxI*, *usp*

y *ompT*) [68]. También Johnson y colaboradores en el 2009 reporta la proteína específica de uropatógenos *usp*, la proteína de membrana externa *ompT*, el receptor de aerobactina *iutA*, el autotransportador de la toxina *sat* y el marcador de la isla de patogenicidad *maxI* como genes marcadores del clon ST 131.

En Europa un estudio realizado en el año 2006 indicó que el 13.0% de aislamientos de *E. coli* productores de BLEE fueron ST131 [69]. En Francia el 61.0% de aislamientos resistentes a fluoroquinolonas que presentaban BLEE también pertenecían a este clon pandémico [70]. En aislamientos de la comunidad se ha encontrado hasta un 25.0% pertenecen a este clon y solo el 3.0% de los aislamientos de *E. coli* causantes de ITU que no eran productores de BLEE. En el caso de América, en Canadá menos del 3 % de aislamientos hospitalarios son ST131, pero en aislamientos resistentes a sulfonamidas y quinolonas provenientes de pacientes de la comunidad recolectados durante el 2002 al 2004, el 23.0% fueron ST131. Un estudio reciente en Chicago indica que el 53.0% de aislamientos de *E. coli* ST131 presentaban CTX-M en pacientes con trasplante renal o pacientes hematológicos [85]. En sur América, el único reporte proviene de un hospital en Rio de Janeiro, Brasil, donde se identificó que el 8.0% de aislamientos de *E. coli* productores de BLEE pertenecían al clon ST131 [86, 87].

En el presente trabajo, aunque no se analizaron todos los aislamientos, de los 9 aislamientos secuenciados, se identificaron 5 pertenecientes a este clon ST131, de tres grupos filogenéticos y con resistencia a múltiples antibióticos, 2 aislamientos presentaron resistencia a B-lactámicos (cefalosporinas de tercera generación), por la presencia de la enzima CTX-M-15, a fluoroquinolonas, tetraciclinas, sulfonamidas y trimetoprim, lo cual está acorde con las publicaciones realizadas a nivel mundial. En Colombia no se han realizado reportes de aislamientos relacionados con el clon ST 131 o

productores de BLEE tipo CTX-M-15 en la comunidad. Pero en el ambiente hospitalario se ha detectado la presencia de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* productores de CTX-M-12, CTX-M-2 y CTX-M-15 [88-90], pero no se estableció si tenían alguna asociación con el clon ST131. Los resultados de nuestro trabajo indican que el clon pandémico de *E. coli* ST131 posiblemente está emergiendo en Colombia así como se ha reportado en varios países del mundo como España, Australia, Canadá, Estados Unidos, sur África y Brasil [91] .

Es importante resaltar que una de las características más importantes de este clon ST 131 es la presencia de la multirresistencia media por la adquisición de elementos genéticos móviles (integrones) y un gran repertorio de factores de virulencia que le permite la invasión en los diferentes tejidos del hospedero, adquisición de nutrientes como el hierro esencial para la supervivencia bacteriana. Lo cual permite que el cuadro clínico de las infecciones causadas por estos patógenos extraintestinales sea mucho más severo por la acción de estos factores de virulencia que desenlazan respuestas nocivas en los diferentes tejidos afectados.

Los factores de virulencia de la EXEC se han clasificado en cinco grupos basados en su función: toxinas, adhesinas, factores de protección, sideróforos y otros factores de virulencia adicionales. *E. coli* O25b-ST131 presenta adhesinas como iha en el 91.0% al 100% de los aislamientos y fimbria P 98.0%. Pero no se han asociado la presencia de adhesinas relacionadas con el desarrollo de pielonefritis con la fimbria P con presencia de las subunidad papG (I,II y III). Sin embargo en aislamientos coreanos se identificó la presencia del alelo pap GIII (todos ST 131) [81, 92]. Adicionalmente estos aislamientos pueden presentar hasta en el 95.0% de los casos sideróforos como *sat* ó *fyu* y otros genes como *usp* y *malX* [1, 92]. En los aislamientos analizados se pudo observar que los clasificados como extraintestinales presentan más combinaciones de factores de virulencia, siendo *fimG/H* (44.1%) el más frecuente seguido de *usp* (13.0%), *SfaD/sfaE* (12.0%) y *hly* (11.0%). En los aislamientos relacionados con el ST 131 no se encontró el

gen marcador *usp*, pero solo se encontró la presencia de los genes *papC* y *fimG/H* en tres aislamientos y *fimG/H* en solo dos. También es importante resaltar que el 24.0% de los aislamientos estreptococales (B2 y D) evaluados no presentó ninguno de los seis factores de virulencia evaluados. La emergencia en Colombia de aislamientos de *E. coli* relacionados con el clon pandémico ST131 debe alertarnos para continuar con los programas y estudios de vigilancia del comportamiento de la resistencia en la comunidad, para generar alternativas para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por este tipo de aislamiento.

6. Conclusiones

Se realizó el diseño y estandarización de una PCR múltiple para la identificación de cinco especies de Enterobacterias, constituyendo una herramienta para la confirmación molecular de género y especie de patógenos de importancia clínica.

Se encontró una frecuencia cerca del 75% de aislamientos de *E. coli* adquiridos en la comunidad con multirresistencia a antibióticos de primera elección terapéutica como β -lactámicos y sulfonamidas y tetraciclinas, y se evidenció la presencia del 2.1% de aislamientos con coresistencia a seis antibióticos.

Se identificó que el 64,6% de aislamientos *E. coli* de circulación comunitaria causantes de ITU pertenecen al grupo filogenético B2 y D, clasificados como extraintestinales. Adicionalmente se demostró la alta frecuencia de genes de virulencia como fimG/H (44.1%) y la gran variedad de perfiles de virulencia este tipo de aislamientos.

Se identificó en Colombia la presencia de elementos genéticos móviles como el integrones clase 1 (37.5%) e integron clase 2 (7.0%) en aislamientos *E. coli* de circulación comunitaria.

Se identificó en Colombia la presencia en aislamientos de *E. coli* causantes de ITU adquirida en la comunidad pertenecientes a los grupos filogenéticos B2, D y B1, relacionados con el clon pandémico ST131 con y sin la adquisición de BLEE tipo CTX-M 15, así como los repostados en otros países del mundo

7. Bibliografía

1. Nicolas-Chanoine, M.H., et al., Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*, 2008. **61**(2): p. 273-81.
2. Vicente, D. and E. Perez-Trallero, [Tetracyclines, sulfonamides, and metronidazole]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **28**(2): p. 122-30.
3. Cerquetti, M., et al., First report of plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrS1 in an *Escherichia coli* strain of animal origin in Italy. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(7): p. 3112-4.
4. Seputiene, V., et al., Prevalence of trimethoprim resistance genes in *Escherichia coli* isolates of human and animal origin in Lithuania. *J Med Microbiol*. **59**(Pt 3): p. 315-22.
5. Pitout, J.D., et al., Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother*, 2005. **56**(1): p. 52-9.
6. Valenzuela de Silva, E.M., et al., Detection of CTX-M-1, CTX-M-15, and CTX-M-2 in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bogota, Colombia. *J Clin Microbiol*, 2006. **44**(5): p. 1919-20.
7. Marquez, C., et al., Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(10): p. 3417-25.
8. Gupta, V., An update on newer beta-lactamases. *Indian J Med Res*, 2007. **126**(5): p. 417-27.
9. Donaldson, H., et al., Evaluation of the VITEK 2 AST N-054 test card for the detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* with CTX-M phenotypes. *J Antimicrob Chemother*, 2008. **62**(5): p. 1015-7.
10. Nasim, K., et al., New method for laboratory detection of AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, 2004. **42**(10): p. 4799-802.
11. Wiles, T.J., R.R. Kulesus, and M.A. Mulvey, Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*, 2008. **85**(1): p. 11-9.
12. Svanborg, C., et al., Uropathogenic *Escherichia coli* as a model of host-parasite interaction. *Curr Opin Microbiol*, 2006. **9**(1): p. 33-9.
13. Rodriguez-Angeles, G., [Principal characteristics and diagnosis of the pathogenic groups of *Escherichia coli*]. *Salud Publica Mex*, 2002. **44**(5): p. 464-75.
14. Smith, J.L., P.M. Fratamico, and N.W. Gunther, Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis*, 2007. **4**(2): p. 134-63.
15. Johnson, J.R. and T.A. Russo, Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*, 2005. **295**(6-7): p. 383-404.
16. Klemm, P., et al., Molecular characterization of the *Escherichia coli* asymptomatic bacteriuria strain 83972: the taming of a pathogen. *Infect Immun*, 2006. **74**(1): p. 781-5.
17. Blanco, M., et al., [Virulence factors and O serogroups of *Escherichia coli* as a cause of community-acquired urinary infections]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 1995. **13**(4): p. 236-41.
18. Lloyd, A.L., D.A. Rasko, and H.L. Mobley, Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2007. **189**(9): p. 3532-46.
19. Martinez, J.J., et al., Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J*, 2000. **19**(12): p. 2803-12.
20. Mahmood, A., et al., Role of intestinal surfactant-like particles as a potential reservoir of uropathogenic *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1523**(1): p. 49-55.
21. Kuehn, M.J., et al., P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature*, 1992. **356**(6366): p. 252-5.
22. Feria, C., et al., Distribution of papG alleles among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from different species. *FEMS Microbiol Lett*, 2001. **202**(2): p. 205-8.

23. Goyal, A., et al., Cellular response induced by a galactose-specific adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* in INT-407 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2009. **55**(3): p. 378-87.
24. Durand, E., et al., Structural biology of bacterial secretion systems in gram-negative pathogens--potential for new drug targets. *Infect Disord Drug Targets*, 2009. **9**(5): p. 518-47.
25. Mulvey, M.A., Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*, 2002. **4**(5): p. 257-71.
26. Servin, A.L., Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 2005. **18**(2): p. 264-92.
27. Nowicki, B., R. Selvarangan, and S. Nowicki, Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J Infect Dis*, 2001. **183 Suppl 1**: p. S24-7.
28. Warren, J.W., et al., Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Clin Infect Dis*, 1999. **29**(4): p. 745-58.
29. Ho, P.L., et al., Community emergence of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamases among urinary *Escherichia coli* from women. *J Antimicrob Chemother*, 2007. **60**(1): p. 140-4.
30. Goyal, A., et al., Extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* & associated risk factors. *Indian J Med Res*, 2009. **129**(6): p. 695-700.
31. Bean, D.C., D. Krahe, and D.W. Wareham, Antimicrobial resistance in community and nosocomial *Escherichia coli* urinary tract isolates, London 2005-2006. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2008. **7**: p. 13.
32. Drlica, K. and X. Zhao, DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997. **61**(3): p. 377-92.
33. Nordmann, P., [Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*]. *Pathol Biol (Paris)*, 2006. **54**(1): p. 7-9.
34. Quiroga, M.P., et al., Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including *aac*(6')-Ib-cr, and a novel allele, *qnrB10*, associated with *ISCR1* in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(12): p. 4466-70.
35. Li, X.Z., Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *Int J Antimicrob Agents*, 2005. **25**(6): p. 453-63.
36. Yamane, K., et al., New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *QepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(9): p. 3354-60.
37. Blahna, M.T., et al., The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada. *J Antimicrob Chemother*, 2006. **57**(4): p. 666-72.
38. Li, M., et al., Crystal structure of the transcriptional regulator *AcrR* from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 2007. **374**(3): p. 591-603.
39. Tafur, J. and P.J. Mills, Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms. *Photomed Laser Surg*, 2008. **26**(4): p. 323-8.
40. Vignoli, R., et al., [Genetic environment of CTX-M-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalized patients in Uruguay]. *Rev Argent Microbiol*, 2006. **38**(2): p. 84-8.
41. Jacoby, G.A. and L.S. Munoz-Price, The new beta-lactamases. *N Engl J Med*, 2005. **352**(4): p. 380-91.
42. Perez, F., et al., The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol*, 2007. **7**(5): p. 459-69.
43. Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros, A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995. **39**(6): p. 1211-33.
44. Giske, C.G., et al., Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother*, 2009. **63**(1): p. 1-4.

45. Rodriguez-Bano, J., et al., *Escherichia coli* producing SHV-type extended-spectrum beta-lactamase is a significant cause of community-acquired infection. *J Antimicrob Chemother*, 2009. **63**(4): p. 781-4.
46. Tzouvelekis, L.S. and R.A. Bonomo, SHV-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des*, 1999. **5**(11): p. 847-64.
47. Falagas, M.E. and D.E. Karageorgopoulos, Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect*, 2009. **73**(4): p. 345-54.
48. Humeniuk, C., et al., Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. **46**(9): p. 3045-9.
49. Bauernfeind, A., H. Grimm, and S. Schweighart, A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, 1990. **18**(5): p. 294-8.
50. Bonnet, R., Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(1): p. 1-14.
51. Radice, M., et al., Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. **46**(2): p. 602-4.
52. Mendonca, N., et al., Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(6): p. 1946-55.
53. Su, L.H., et al., An epidemic of plasmids? Dissemination of extended-spectrum cephalosporinases among *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008. **52**(2): p. 155-68.
54. Stokes, H.W. and R.M. Hall, A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol*, 1989. **3**(12): p. 1669-83.
55. Collis, C.M., et al., Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol*, 1993. **9**(1): p. 41-52.
56. Partridge, S.R., et al., Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. **45**(4): p. 1263-70.
57. Di Conza, J.A. and G.O. Gutkind, [Integrons: gene collectors]. *Rev Argent Microbiol*. **42**(1): p. 63-78.
58. Mazel, D., Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol*, 2006. **4**(8): p. 608-20.
59. Radstrom, P., et al., Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *J Bacteriol*, 1994. **176**(11): p. 3257-68.
60. Marquez, C., et al., Recovery of a functional class 2 integron from an *Escherichia coli* strain mediating a urinary tract infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. **52**(11): p. 4153-4.
61. Hansson, K., et al., IntI2 integron integrase in Tn7. *J Bacteriol*, 2002. **184**(6): p. 1712-21.
62. Collis, C.M., et al., Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol*, 2002. **184**(11): p. 3017-26.
63. Manges, A.R., et al., Endemic and epidemic lineages of *Escherichia coli* that cause urinary tract infections. *Emerg Infect Dis*, 2008. **14**(10): p. 1575-83.
64. Johnson, J.R., et al., Global molecular epidemiology of the O15:K52:H1 extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* clonal group: evidence of distribution beyond Europe. *J Clin Microbiol*, 2002. **40**(6): p. 1913-23.
65. Phillips, I., et al., Epidemic multiresistant *Escherichia coli* infection in West Lambeth Health District. *Lancet*, 1988. **1**(8593): p. 1038-41.
66. Olesen, B., et al., Cluster of multiresistant *Escherichia coli* O78:H10 in Greater Copenhagen. *Scand J Infect Dis*, 1994. **26**(4): p. 406-10.
67. Pitout, J.D., et al., Community-wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the Calgary health region. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(6): p. 2844-9.

68. Coque, T.M., et al., Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis*, 2008. **14**(2): p. 195-200.
69. Oteo, J., et al., Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int J Antimicrob Agents*, 2009. **34**(2): p. 173-6.
70. Cerquetti, M., et al., Ciprofloxacin-resistant, CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 clone in extraintestinal infections in Italy. *Clin Microbiol Infect*.
71. Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen, Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*, 2000. **66**(10): p. 4555-8.
72. Bonacorsi, S.P., et al., Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. *Infect Immun*, 2000. **68**(4): p. 2096-101.
73. Adamus-Bialek, W., et al., (CGG)₄-based PCR as a novel tool for discrimination of uropathogenic *Escherichia coli* strains: comparison with enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *J Clin Microbiol*, 2009. **47**(12): p. 3937-44.
74. Monstein, H.J., et al., Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS*, 2007. **115**(12): p. 1400-8.
75. Lanz, R., P. Kuhnert, and P. Boerlin, Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol*, 2003. **91**(1): p. 73-84.
76. Koljalg, S., et al., Persistence of *Escherichia coli* clones and phenotypic and genotypic antibiotic resistance in recurrent urinary tract infections in childhood. *J Clin Microbiol*, 2009. **47**(1): p. 99-105.
77. Versalovic, J., T. Koeuth, and J.R. Lupski, Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(24): p. 6823-31.
78. Clermont, O., et al., Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother*, 2009. **64**(2): p. 274-7.
79. Dhanji, H., et al., Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* and its CTX-M-15-like extended-spectrum beta-lactamases. *Int J Antimicrob Agents*. **36**(4): p. 355-8.
80. Nowrouzian, F.L., et al., Phylogenetic group B2 *Escherichia coli* strains from the bowel microbiota of Pakistani infants carry few virulence genes and lack the capacity for long-term persistence. *Clin Microbiol Infect*, 2009. **15**(5): p. 466-72.
81. Lee, M.Y., et al., Dissemination of ST131 and ST393 community-onset, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clones causing urinary tract infections in Korea. *J Infect*. **60**(2): p. 146-53.
82. Jakobsen, L., et al., Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. *Int J Food Microbiol*. **142**(1-2): p. 264-72.
83. Gordon, D.M. and A. Cowling, The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*, 2003. **149**(Pt 12): p. 3575-86.
84. Daniels, I.R. and S.R. Zaman, Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens. *JAMA*, 1999. **282**(4): p. 325-6.
85. Johnson, J.R., et al., *Escherichia coli* sequence type ST131 as an emerging fluoroquinolone-resistant uropathogen among renal transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother*. **54**(1): p. 546-50.
86. Peirano, G., M. Costello, and J.D. Pitout, Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from the Chicago area: high prevalence of ST131 producing CTX-M-15 in community hospitals. *Int J Antimicrob Agents*. **36**(1): p. 19-23.

87. Peirano, G. and J.D. Pitout, Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents*. **35**(4): p. 316-21.
88. Mantilla, J.R., et al., [Molecular characterization of an outbreak caused by CTX-M-12-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Colombian hospital's neonatal intensive care unit]. *Biomedica*, 2006. **26**(3): p. 408-14.
89. Villegas, M.V., et al., CTX-M-12 beta-lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(2): p. 629-31.
90. Gonzalez-Mejia, E.B., et al., [Resistance to cefepime in *Enterobacter cloacae* isolates from hospitals in Bogota, Colombia]. *Rev Salud Publica (Bogota)*, 2006. **8**(2): p. 191-9.
91. Rogers, B.A., H.E. Sidjabat, and D.L. Paterson, *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother*. **66**(1): p. 1-14.
92. Johnson, J.R., et al., Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(7): p. 2733-9.

Anexo A. Perfiles de resistencia en aislamientos de E.coli intestinales y extraintestinales

Nº de antibióticos		Intestinales N= 47(%)	Extraintestinales N=86 (%)
1	AMP	4 (8.5%)	TET 11 (12.7%)
	TET	4(8.5%)	AMP 3 (3.4%)
	AMK	1 (2.1%)	AMK 2 (2.3%)
	CIP	1 (2.1%)	TSX 2 (2.3%)
2	AMK, TET	3 (6.3%)	CIP 1 (1.1%)
	AMP,TET	6 (12.7%)	GEN 1 (1.1%)
			AMP, TSX 4 (4.6%)
			AMP,TET 2 (2.3%)
			AMK, TSX 1 (1.1%)
			AMK, TET 1 (1.1%)
3	AMK, CIP, TET	1 (2.1%)	AMP, CIP 1 (1.1%)
	AMK, TSX, TET	1 (2.1%)	AMP, TET 1 (1.1%)
	CIP TET AMP	7 (14.8%)	AMK, TSX, TET 7 (8.1%)
			CIP, GEN, AMP 2 (2.3%)
			CIP TET AMP 2 (2.3%)
			AMP TSX TET 2 (2.3%)
4	CIP, TET, AMP , GEN	4 (8.5%)	TET TSX CIP 1 (1.1%)
	CIP, TET, AMP ,STX	2 (4.2%)	CIP GEN TET 1 (1.1%)
	CIP, TET, AMP ,CTX	1 (2.1%)	
5	CIP, TET, AMP ,STX, GEN	1 (2.1%)	CIP, TET, AMP ,STX 10 (11.1%)
			CIP, TET, AMK ,STX 2 (2.3%)
			GEN, TET, AMK ,STX 2 (2.3%)
			CIP, TET, AMP ,STX 1 (1.1%)
6	CIP, TET, AMP ,STX, CAX, CAZ	1(2.1%)	CIP, TET, AMP ,STX, GEN 8 (9.3%)

TET: tetraciclina, **AMP:** ampicilina, **TSX:** trimetoprim/sulfametoxazol, **CIP:** ciprofloxacina, **GEN:** gentamicina, **AMK:** amikacina, **CAZ:** ceftazidime y **CTX:** cefotaxime. El porcentaje fue calculado respect al n de cada subgrupo.