Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Eje de Microbiología

Título de la tesis:

‘’Estudio de la resistencia a quinolonas en cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE, aisladas de infecciones urinarias.’’

Título para obtener:

Licenciado en Biomedicina

Alumna:

Miranda Herrera Urióstegui

Directora de tesis:

D.C Rosa del Carmen Rocha Gracia

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Puebla, Puebla., febrero 2020

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES Y ACADÉMICOS

A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, por ser mi alma máter, por estos años de esfuerzos, aprendizajes y logros.

Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas** de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por el apoyo que brindan a los alumnos de Biomedicina con los laboratorios, las aulas y los excelentes docentes que nos forman en el área de la investigación científica y tecnológica.

A la **Licenciatura en Biomedicina**, porque simplemente es lo que siempre quise estudiar y hoy puedo decir con orgullo que soy una Biomédica en continua formación.

Al **Hospital ISSSTEP**, por la donación de las cepas incluidas en esta tesis, las cuales son la base de todo el trabajo y estudio.

A la **D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, por permitirme ser parte del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad y por todos estos años en los que me ha brindado no sólo las herramientas necesarias para desenvolverme profesionalmente, sino también, la confianza y apoyo como asesora de tesis.

A la **D.C. Patricia Lozano Zaraín**, por ser también mi asesora en este camino de la tesis, por todas sus enseñanzas y atenciones.

A la **D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández**, por su apoyo, correcciones y enseñanzas durante mi formación como biomédica en el CICM-BUAP.

A la **D.C. Claudia Martínez de la Peña** por las dos materias que me impartió durante mi formación académica, que sin duda son y serán aprendizajes que siempre prevalecerán; también, gracias por todo su apoyo durante este proceso de titulación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- **A mis padres**

Angie y Julio

Ustedes son todo en mi vida, son el más grande ejemplo que tengo de lucha, esfuerzo, humildad, perseverancia y honestidad. Gracias por todo el apoyo, por creer en mí y por su amor. Este logro, más que mío, es de ustedes.

- **A mi hermana**

Diana María

Por echarme porras, por estar conmigo siempre, por tu amor, amistad y complicidad. Este también es un logro tuyo, te amo.

- **A mi abuela**

Teresita

Por tu amor, por tus preocupaciones, por siempre pedir por mí bienestar, por quererme tanto, gracias abuela por estar en todas las etapas de mí vida.

- **A mis tías, primas y tíos**

Porque estuvieron conmigo en todo este camino, porque se interesaban en mis avances y me apoyaban como la familia unidad que somos.

- **A mis amigas**

Dianis, Ady, Pau Morales, Andi Panes, Andi Vázquez, Kare, por su amistad, lealtad, consejos, apoyo y cariño, esto es recíproco.

- **A Alejandro**

Porque, aunque llegaste en una etapa de mi vida de altas y bajas, de estrés y cambios, me has devuelto la confianza en mí misma, me motivas, me escuchas, me cuidas y me apoyas siempre, gracias por estar estos meses conmigo, por tu paciencia y por tu amor.

- **A mis compañeros del laboratorio**

Por su amistad, por el compañerismo, por las enseñanzas y el apoyo con los experimentos, por ser parte de esta increíble etapa.

CONTENIDO

Índice de figuras	**6**
Índice de tablas	**7**
índice de gráficas	**8**
Resumen	**10**
Introducción	**11**
Infecciones de vías urinarias	**11**
Escherichia coli	**12**
Antibióticos β-lactámicos	**12**
Clasificación	**14**
Mecanismo de acción	**15**
Quinolonas	**16**
Mecanismo de acción	**16**
Antecedentes generales	**18**
Mecanismos de resistencia a los antibióticos	**20**
Resistencia a los β-lactámicos	**18**
β-lactamasas de Espectro Extendido	**20**
TEM	**22**
SHV	**23**
CTX-M	**23**
OXA	**24**
AmpC	**24**
Resistencia a las quinolonas	**25**
Proteínas Qnr	**26**
Enzima Aac (6')-Ib-cr	**26**
Bombas de eflujo	**26**
QepA	**27**
OqxAB	**27**
Antecedentes específicos	**28**

Planteamiento del problema	**29**
Justificación	**29**
Objetivos	**30**
Objetivo general	**30**
Objetivos específicos	**30**
Diseño de la investigación	**31**
Diseño del estudio	**31**
Ubicación espacio-temporal	**31**
Muestreo	**31**
Definición de población	**31**
Selección de la muestra	**31**
Criterios de inclusión	**32**
Criterios de exclusión	**32**
Criterios de eliminación	**32**
Diseño y tipo de muestreo	**32**
Tamaño de la muestra	**32**
Definición de las variables y escalas	**32**
Método de recolección de datos	**33**
Recursos humanos	**33**
Recursos materiales	**33**
Recursos financieros	**34**
Bioética	**34**
Materiales y métodos	**34**
Esquema de trabajo	**35**
Resultados	**47**
Discusión	**64**
Conclusiones	**67**
Perspectivas	**68**
Anexos	**69**
Bibliografía	**76**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Estructura química de los betalactámicos (Suárez & Gudiol, 2009).	13
2	Estructura química de las quinolonas (Aldred *et al*., 2014).	17
3	Esquema de trabajo para la realización del antibiograma	37
4	Esquema de trabajo para determinar la producción fenotípica de BLEE's	40
5	**A)** Crecimiento bacteriano en agar MacConkey y **B)** Crecimiento bacteriano en agar EMB-Levine, de las cepas de urocultivos del ISSSTEP	49
6	Amplificación del gen *uidA*	52
7	Determinación del perfil de resistencia por el método de Kirby-Baüer en una cepa de *E. coli del* ISSSTEP	53
8	Prueba de difusión de doble disco	56
9	Amplificación del gen ctx-m	59
10	Amplificación del gen *shv*	59
11	Amplificación del gen *tem*	60
12	Amplificación del gen *oxa*	60
13	Amplificación del gen *aac(6')-Ib-cr*	62
14	Amplificación del gen *qnrA*	63
15	Amplificación del gen *qepA*	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Diversos esquemas de clasificación y representantes de las enzimas β-lactamasas de espectro extendido, según Ambler y Bush-Jacoby	20,21,22
2	Perfil de resistencia de acuerdo con el antibiótico evaluado y el diámetro del halo de inhibición	37,38
3	Oligonucleótidos utilizados en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad-CICM para la amplificación de genes de resistencia	41
4	Componentes y cantidades para cada PCR	42,43
5	Condiciones para las PCR de cada gen	43,44,45,46
6	Datos de las cepas aisladas de urocultivos en pacientes del ISSSTEP	47,48
7	Resultados de las pruebas bioquímicas de las 73 cepas	50,51,52
8	Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de urocultivos de *E. coli*	73
9	Cepas de urocultivos del ISSSTEP con efecto positivo (sinergismo) en la prueba de difusión con doble disco	56,57
10	Amplificación de los genes que codifican para la producción de BLEE's en los aislados de urocultivos del ISSSTEP	74
11	Amplificación de los genes de resistencia a quinolonas en los aislados de urocultivos del ISSSTEP	75

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica	Título	Página
1	Servicios Hospitalarios	49
2	Perfil de susceptibilidad a los 20 antibióticos de diferentes familias en las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes del ISSSTEP	55
3	Resultados de Fenotipo BLEE en las 73 cepas de urocultivos de *E. coli*	57
4	Porcentaje de efecto sinérgico de las 32 cepas de E. coli de urocultivos del ISSSTEP, a los antibióticos ensayados en la prueba de difusión con doble disco	58
5	Amplificación mediante PCR de los genes codificantes para BLEE's, en las 32 cepas de urocultivos	61
6	Amplificación mediante PCR de los genes PMQR, en las 32 cepas de urocultivos	64

LISTA DE ABREVIATURAS

aac(6')-Ib-cr	Gen que codifica para la acetilasa Aac(6')-Ib resistente a ciprofloxacino
AMP	Ampicilina
AMC	Amoxicilina con Ácido Clavulánico
AmpC	β-lactamasa que confiere resistencia a Ampicilina
AN	Amikacina
ATM	Aztreonam
BET	Bromuro de Etidio
BHI	Medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón
BLEE	β-lactamasa de Espectro Extendido
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínicos
CTX	Cefotaxima
CTX-M	β-lactamasa que codifica para cefalosporinasas
E. coli	*Escherichia coli*
EMB	Medio de cultivo Eosina Azul de Metileno
et. al.	Otros colaboradores
FEP	Cefepime
FOX	Cefoxitina
GM	Gentamicina
gyrA	Gen que codifica para la girasa bacteriana
IPM	Imipenem
LIA	Agar Hierro Lisina
MC	Medio de cultivo MacConkey
MEM	Meropenem
$MgCl_2$	Cloruro de Magnesio
MH	Medio de cultivo Müeller Hinton
MIO	Medio de cultivo Movilidad Indol Ornitina
NA	Ácido Nalidíxico
NaCl	Cloruro de Sodio
OXA	β-lactamasa que confiere resistencia a Oxacilina
parC	Gen que codifica para la topoisomerasa IV
PBP	Proteínas de Unión a Penicilina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qepA	Gen que codifica para la bomba QepA
qnrA	Gen que codifica para la proteína QnrA
qnrB	Gen que codifica para la proteína QnrB
SHV	β-lactamasa derivada de la contracción ''Sulfhidril-Variable''
STX	Trimetoprim con Sulfametoxazol
TE	Tetraciclina
TEM	Enzima β-lactamasa
TSA	Medio de cultivo Soya Tripticaseína
TSI	Agar Hierro Triple Azúcar

1. RESUMEN

Las Infecciones de Vías Urinarias (IVU's) representan una de las enfermedades más comunes en la población a nivel mundial. Las bacterias son los microorganismos mayormente aislados, siendo *Escherichia coli* el principal patógeno responsable de estas infecciones. En la actualidad se sabe que *E. coli* presenta una co-resistencia hacia antibióticos β-lactámicos y quinolonas, por lo cual, resulta de gran interés la búsqueda y estudio de cepas multidrogorresistentes en muestras de pacientes con infección de vías urinarias, para contar con bases epidemiológicas que permitan optimizar los cuadros de tratamiento en el Sector Salud y controlar la diseminación de genes de resistencia.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la resistencia a quinolonas de cepas de *Escherichia coli* productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), aisladas de muestras de pacientes con infecciones urinarias de un hospital de tercer nivel de la ciudad de Puebla, Puebla, México.

Se trabajó con cepas aisladas de muestras de urocultivos de pacientes con infecciones de vías urinarias. Se realizó el re-aislamiento y las pruebas bioquímicas para la confirmación de género y especie bacteriana *Escherichia coli*, de las cepas de urocultivos. Se realizó la técnica de antibiograma Kirby Baüer, usando los antibióticos recomendados en el CLSI, también se determinó la producción de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) con la prueba fenotípica de difusión con doble disco. Se llevó a cabo la extracción del templado de DNA por el método hervido, de las cepas resistentes a CTX en el antibiograma y productoras de BLEE's. Se realizó la detección de genes de resistencia por PCR, los productos de PCR fueron corridos usando la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 1% y visualizados por medio del fotodocumentador. 73 cepas fueron identificadas como *Escherichia coli* y de estas 32 fueron positivas al fenotipo BLEE. Los aislados mostraron un perfil de 40% y 70% de resistencia a β-lactámicos y a quinolonas, respectivamente. El 87.5% (28) de las cepas de *E. coli* portaron el gen $bla_{CTX\text{-}M}$, 78.1% (25) el gen bla_{TEM} y 53.1% (17) el gen bla_{OXA}. En cuanto a los genes de resistencia a quinolonas, el gen que codifica para la *aac(6')-Ib-cr* fue el más frecuentemente encontrando 31.2% (10), después le sigue el gen *qnrB* 25% (8), y los genes *oqxA* y *oqxB* en 9.3% (3) de las cepas.

Los resultados nos indican altos niveles de resistencia a los antibióticos, en especial a la familia de los β-lactámicos y las quinolonas. Resaltamos la importancia de realizar las pruebas genotípicas para entender los mecanismos de resistencia que estas cepas han adquirido y su probable diseminación a otras bacterias patógenas, de la misma o diferente especie.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Infecciones de vías urinarias

Las Infecciones de Vías Urinarias (IVU's) se definen como la presencia de cierta cantidad de microorganismos patógenos en la orina (Hernández *et al.,* 2016), habiendo o no sintomatología en el hospedero. Constituyen al grupo de infecciones bacterianas que afectan con mayor frecuencia a la población a nivel mundial (Flores *et al.,* 2015), por lo que se consideran un problema social grave ya que interfieren en la productividad de las personas y generan altos costos a nivel hospitalario (Bartoletti *et al.,* 2016).

Se reportan más casos de IVU's en las mujeres que en los hombres (Smelov *et al.,* 2016); sin embargo, existen múltiples causas para el desarrollo de estas infecciones, entre estas, algunas alteraciones del tracto genitourinario y deficiencias funcionales del sistema inmunitario (Koves & Wullt, 2016).

Diferentes clasificaciones han sido propuestas para mejorar el manejo y el tratamiento de estas infecciones. Comúnmente las infecciones urinarias se clasifican en complicadas y no complicadas según si el paciente refiere alguna anormalidad anatómica o fisiológica del tracto urinario, aunque casi todas las IVU's entran en la categoría de no complicadas (Smelov *et al.,* 2016). También, dependiendo de si el paciente indica manifestaciones de la enfermedad, las IVU's se dividen en asintomáticas o sintomáticas, estas últimas a su vez se categorizan en orden de gravedad como síndrome uroséptico (más complicado), infección de vías urinarias altas o pielonefritis (infección en riñones), e infecciones de vías urinarias bajas o cistitis (infección en vejiga) (Terlizzi *et al.,* 2017*)*.

La patogénesis de las IVU's empieza con la contaminación del área periuretral, posteriormente hay una colonización de los uréteres y de ahí las bacterias migran hacia la vejiga y/o riñones (Terlizzi *et al.,* 2017*)*. Se trata de infecciones tratables y la selección de la terapia antimicrobiana depende de la bacteria patógena responsable, el historial clínico del paciente y la información que arrojen las pruebas microbiológicas previamente realizadas, como el urocultivo con antibiograma.

Los microorganismos causantes de las infecciones de vías urinarias mayormente aislados son las bacterias que pertenecen a la familia de las enterobacterias y al grupo de las Gram-negativas en general (Köves & Wullt, 2016), siendo *Escherichia coli* el principal patógeno responsable tanto de las IVU's no complicadas (70-95% de los casos) como de las complicadas (Bartoletti *et al.,* 2016).

2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria con forma de bacilo, anaerobio facultativo, que forma parte de la microbiota intestinal de humanos y animales, pero también, es capaz de causar infecciones y sobrevivir a los mecanismos de defensa del organismo y a la acción de los antibióticos debido a la gran cantidad de factores de virulencia y genes de resistencia que ha adquirido evolutivamente. Algunos de estos factores, como las Islas de Patogenicidad (PAI) o los sistemas para la captación de hierro, son útiles para la identificación y clasificación de los diferentes filogrupos de *E. coli* asociados a infecciones urinarias (Terlizzi *et al*., 2017*).*
Los β-lactámicos, las quinolonas y los aminoglucósidos continúan siendo los antibióticos más usados para el tratamiento de infecciones urinarias causadas por *E. coli*; sin embargo, se han demostrado altos niveles de resistencia a dichos antimicrobianos en cepas aisladas de pacientes hospitalizados y ambulatorios, reduciendo las alternativas de tratamiento y representado uno de los mayores retos de Salud Pública tanto en México como en muchos otros países.

2.3 Antibióticos β-lactámicos

Los antibióticos β-lactámicos representan una de las primeras elecciones para el tratamiento de muchas infecciones bacterianas, como las infecciones de vías urinarias, debido a sus bajos niveles de toxicidad, su amplio espectro de actividad y a su acción bactericida (Bush & Bradford, 2016).

El anillo β-lactámico es la estructura química principal que caracteriza a dicha familia de antibióticos; este confiere el mecanismo de acción y según los radicales y cadenas lineales a los cuales está unido se forman los distintos grupos de β-lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de las β-lactamasas (Figura 1).

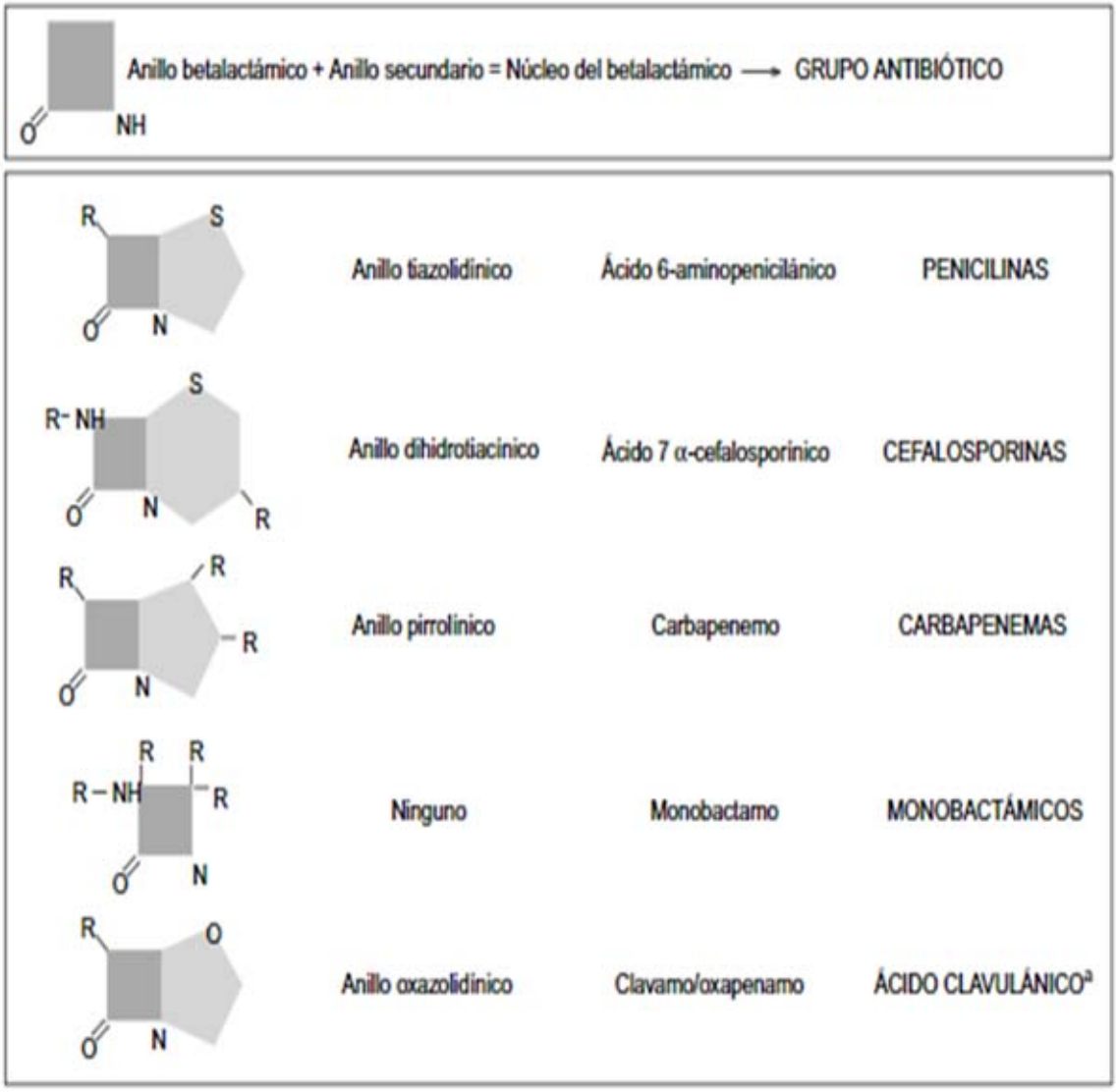


Figura 1. Estructura química de los betalactámicos (Suárez & Gudiol, 2009).

2.3.1 Clasificación

- Penicilinas: Fueron los primeros antibióticos descubiertos en el año de 1929, se trata de compuestos de origen natural derivados del hongo *Penicillium notatum.* En la actualidad existen también de origen semisintético y sintético, como la penicilina V, pero todas las penicilinas poseen en su estructura un núcleo base que es el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) (Cué & Morejón, 1998).
- Cefalosporinas: Son antibióticos semisintéticos derivados de la cefalosporina C, compuesto de origen natural sintetizado por el hongo *Cefhalosporium acremonium.* Las cefalosporinas poseen un núcleo base de ácido 7-aminocefalosporánico y se clasifican en cuatro generaciones según su actividad antibacteriana y el orden de aparición en el mercado. Las cefalosporinas de primera generación, como la cefazolina, se introdujeron en los años ochenta para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias productoras de penicilinasas; sin embargo, la rápida aparición de β-lactamasas tipo TEM-1 redujo su efectividad (Bush & Bradford, 2016), haciendo necesaria la síntesis de nuevas cefalosporinas resistentes a la hidrólisis de estas enzimas. La cefoxitina es una cefalosporina de segunda generación que presenta actividad contra las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE's) (Bush & Bradford, 2016). Las cefalosporinas de tercera y cuarta generación se conocen como cefalosporinas de amplio espectro ya que tienen mejor estabilidad contra las β-lactamasas de tipo TEM y SHV (Cué & Morejón, 1998; Bush & Bradford, 2016).
- Carbapenémicos: Los carbapenémicos son otro grupo de β-lactámicos con espectro amplio, son semisintéticos y los más usados en la práctica clínica son el imipenem y el meropenem. Son los antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones por bacterias resistentes a penicilinas y cefalosporinas, teniendo estabilidad contra la mayorías de las BLEE, excepto con las carbapenemasas (Bush & Bradford, 2016).
- Monobactámicos: Este grupo de betalactámicos se producen de manera sintética y su uso es más limitado a bacterias aerobias Gram negativas. El aztreonam es el único antibiótico de este grupo aprobado para su uso en la

clínica y resulta estable contra algunas cepas productoras de múltiples β-lactamasas (Bush & Bradford, 2016).

- Inhibidores de las β-lactamasas: Solos no poseen actividad antibacteriana, se usan junto a una penicilina o cefalosporina para que los antibióticos puedan ejercer su efecto bactericida sobre las bacterias productoras de β-lactamasas, evitando la resistencia de estas cepas. El primer inhibidor de β-lactamasas estudiado fue el ácido clavulánico; a partir de éste se sintetizaron nuevos inhibidores, con el mismo mecanismo de acción y un espectro de actividad similar, el sulbactam y el tazobactam (Bush & Bradford, 2016).

2.3.2 Mecanismo de acción de los β-lactámicos

La pared celular confiere estabilidad a las bacterias y es necesaria para que estas sobrevivan en los diferentes ambientes hipotónicos e hipertónicos del organismo humano. Su síntesis se lleva a cabo en 3 etapas: I) la elaboración de los precursores del peptidoglucano, II) el transporte de los precursores del citoplasma hacia la membrana bacteriana y III) la estructuración de la pared celular por acción de las proteínas de unión a penicilina, también conocidas como PBP's por sus siglas en inglés. Las PBP's son las enzimas encargadas de catalizar la última etapa de síntesis de la pared celular bacteriana, cumplen la función de transpeptidasas enlazando moléculas de N-acetil murámico y N-acetil glucosamina, principales componentes del peptidoglucano (Calvo & Martínez 2008; Bonomo, 2017). Las PBP's son diferentes en cada especie bacteriana y se clasifican de acuerdo con su masa molecular y al substrato al cual son afines. Los antibióticos β-lactámicos ejercen su actividad bactericida al unirse covalentemente a las PBP's, debido a que tienen una estructura similar al sitio que estas enzimas reconocen, interrumpiendo así la formación de la pared celular bacteriana. La muerte de la bacteria ocurre debido al bloqueo de la acción de una o más PBP's (Bush & Bradford, 2016).

2.4 Quinolonas

Las quinolonas son antibióticos bactericidas con un amplio espectro de actividad, siendo efectivas tanto en patógenos Gram positivos como Gram negativos. Las quinolonas son usadas para el tratamiento de un gran número de enfermedades, como las infecciones de vías urinarias, infecciones de la piel, neumonías y enfermedades de transmisión sexual (Aldred *et al*., 2014).

El primer miembro de esta familia de antibióticos, el ácido nalidíxico, fue descubierto en el año de 1962 por George Lesher y colaboradores. Aunque el uso del ácido nalidíxico se limitó al tratamiento de infecciones de vías urinarias, la aparición de cepas bacterianas resistentes fue más rápida de lo esperado por lo que tuvieron que sintetizar otros compuestos a partir de este, añadiendo un átomo de flúor en la posición C6 y otros sustituyentes en el C7 del núcleo estructural, nombrando a estas nuevas moléculas como fluoroquinolonas (Hooper & Jacoby, 2016; Aldred *et al*., 2014).

Entre las fluoroquinolonas más conocidas y usadas en la clínica tenemos, en orden ascendente según el año de aparición, a la norfloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina (Figura 2). Aun cuando son antibióticos muy usados en la práctica clínica su eficacia se ve afectada por los mecanismos de resistencia bacteriana, como la transferencia de plásmidos, y su rápida propagación (Hooper & Jacoby, 2016).

2.4.1 Mecanismo de acción de las quinolonas

El sitio blanco de las quinolonas son las topoisomerasas del tipo II: la DNA girasa y la topoisomerasa tipo IV (Hooper & Jacoby, 2016), siendo la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos el mecanismo de acción de esta familia de antibióticos.

Las topoisomerasas tipo II son heterotetrámeros que participan en los procesos de replicación del DNA; la DNA girasa está conformada por dos subunidades GyrA y

dos GyrB, y la topoisomerasa IV está conformada también por dos subunidades ParC y dos ParE (Wang, 1996).

Estas enzimas se encargan de realizar cortes en la cadena molde, para que se lleve a cabo la síntesis del material genético y de volver a sellar esos cortes, utilizando ATP como fuente de energía. La DNA girasa además se encarga de introducir los superenrollamientos negativos en la molécula de DNA (Levine *et al*., 1998). Las subunidades GyrA y ParC son homólogas y contienen residuos catalíticos de tirosina, que se unen covalentemente al extremo 5' del DNA durante las reacciones de corte y ligación. Las subunidades GyrB y ParE también son homólogas y en ellas se encuentra el sitio de unión del ATP esencial para la catálisis enzimática (Aldred *et al.*, 2014; Hooper & Jacoby, 2016).

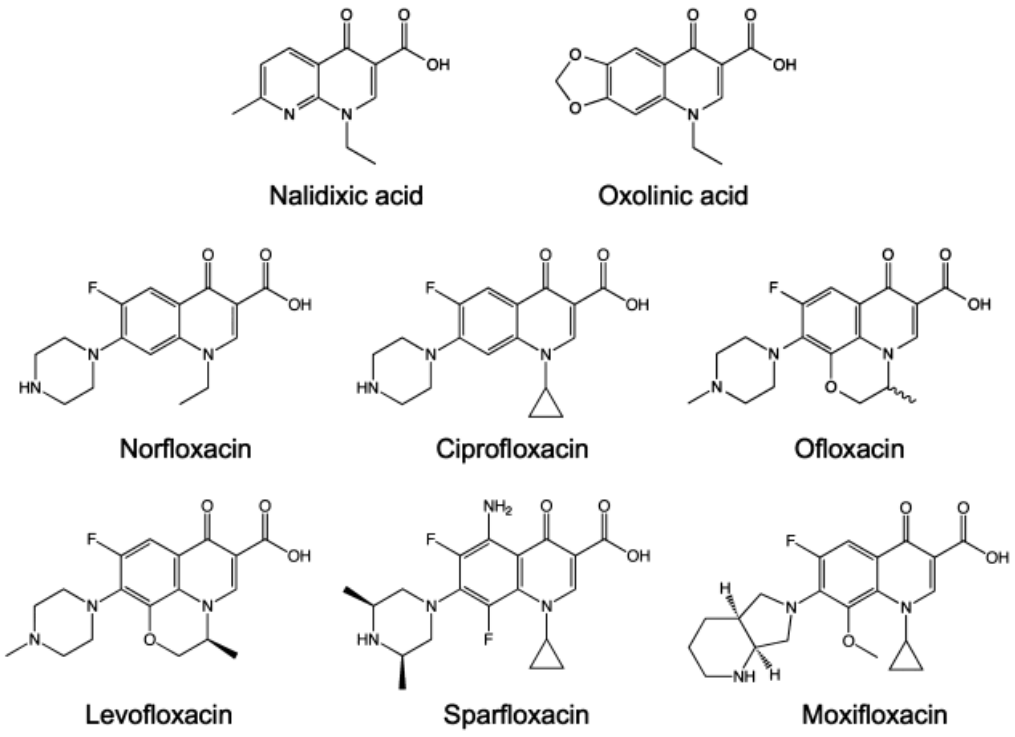


Figura 2. Estructura química de las quinolonas (Aldred *et al*., 2014).

Las quinolonas se unen al complejo enzima-DNA, cerca del sitio activo de la proteína e intercalándose entre esta y el DNA, evitando que la enzima lleve a cabo

la ligación de los extremos previamente escindidos y dando lugar a moléculas de DNA fracturadas. Las dobles hélices rotas activan los mecanismos de reparación celular, pero, si la respuesta es incompleta se provoca la lisis bacteriana (Drlica *et al*. 2008; Hooper & Jacoby, 2016).

3. ANTECEDENTES GENERALES

3.1 Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Algunas bacterias poseen en su genoma de forma natural genes que les confieren la capacidad de resistir a la acción de cierto tipo de antibiótico, esta particularidad se denomina resistencia intrínseca y un ejemplo lo encontramos en especies de bacterias Gram negativas resistentes al antibiótico vancomicina. Sin embargo, la resistencia antibiótica también puede ser extrínseca, esto se da por mutaciones en los genes cromosómicos bacterianos o por la adquisición de genes de resistencia de otras bacterias a través de los mecanismos de transferencia horizontal, los cuales son conjugación, transformación y transducción (Blair *et al.,* 2015).

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos se han clasificado en: 1) alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana por reducción en la expresión de porinas o por la activación de bombas de eflujo que expulsan al antibiótico hacia el espacio extracelular; 2) mutaciones genéticas del sitio blanco que reducen la afinidad con el antibiótico; 3) producción de enzimas que degradan al antibiótico (Blair *et al*., 2015).

Estudiar y determinar cuáles mecanismos de resistencia están presentes en las cepas provenientes de muestras clínicas resulta interesante y de gran ayuda, ya que así se logra combatir las infecciones provocadas por estos microorganismos y se evitan brotes de resistencia bacteriana en la población.

3.2 Resistencia a los β-lactámicos

Aproximadamente el 50% de los antibióticos mayormente empleados a nivel mundial pertenecen a la familia de los β-lactámicos; sin embargo, la resistencia bacteriana para este grupo va en incremento (Rahman *et al*., 2018).
Se considera a una bacteria como resistente cuando es capaz de sobrevivir en presencia de altas concentraciones de un antibiótico; y cuando la bacteria resiste a la acción de más de uno se denomina multidrogo-resistente (MDR). Las mutaciones en las PBP's, la baja permeabilidad de la membrana celular bacteriana, la sobrexpresión de bombas de eflujo y la producción de enzimas que modifican o degradan al antibiótico son los mecanismos de resistencia mejor estudiados para los β-lactámicos, siendo este último el principal mecanismo de resistencia utilizado por las bacterias (, sobre todo por las Gram negativas (Falagas & Karageorgopoulos, 2009; Bonomo, 2017).

Las β-lactamasas, como su nombre lo indica, son enzimas hidrolíticas capaces de romper el enlace amida del anillo β-lactámico, evitando la acción antibacteriana; y son inhibidas por los inhibidores de β-lactamasas como el tazobactam, el ácido clavulánico y el sulbactam.

Se reconocen más de 900 tipos de β-lactamasas de distintas especies bacterianas (Rahman *et al*., 2018). Debido al gran número de β-lactamasas identificadas y para facilitar su estudio se han clasificado con base a su estructura primaria, llamada clasificación molecular de Ambler, y también según sus características funcionales conocida como la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush & Jacoby, 2010).
El esquema molecular de Ambler clasifica a dichas enzimas en 4 clases: A, B, C y D. Las clases A, C y D agrupan a las β-lactamasas que poseen un centro activo de serina en su estructura y se conocen como serín β-lactamasas; mientras que la clase B son metalo β-lactamasas ya que necesitan al menos un ion Zinc en su centro activo para llevar a cabo su actividad (Bush & Jacoby, 2010). Por otra parte, la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros las coloca en grupos que van del 1 al 4 según sus perfiles de substrato (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos,

carbapenémicos) e inhibición (ácido clavulánico, tazobactam, sulbactam) (Bonomo, 2017):

- El grupo 1 son enzimas de tipo cefalosporinasas, clase C de Ambler., son resistentes a la acción del ácido clavulánico y tienen afinidad por el aztreonam.
- El grupo 2 incluye a las β-lactamasas de las clases moleculares A y D, se dividen en 12 subgrupos y son inhibidas por el ácido clavulánico.
- El grupo 3 incluye a las metalo- β-lactamasas, clase B de la clasificación de Ambler, las cuales son resistentes al tazobactam y ácido clavulánico.
- El grupo 4 no está bien caracterizado.

3.3 β-lactamasas de Espectro Extendido

Las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE's) son producto de mutaciones de las primeras β-lactamasas, que, a diferencia de estas, las BLEE's poseen un espectro amplio de hidrólisis para oximino-cefalosporinas (cefalosporinas de tercera y cuarta generación) y monobactámicos; además de que algunas poseen poca sensibilidad a inhibidores de β-lactamasas y carbapenémicos (Tabla 1). Recientemente las BLEE's se clasificaron en tres grupos (Rahman *et al*., 2018):

1) BLEE's clase A: Son las β-lactamasas que se encuentran más comúnmente en los aislados clínicos, incluyendo a CTX-M, TEM y SHV, y que se transfieren horizontalmente entre las bacterias.
2) BLEE's clase M (Miscelánea): Se dividen en las β-lactamasas de clase C, AmpC, mediadas por plásmidos y las β-lactamasas de clase D.
3) BLEE's CARBA: Son las carbapenemasas y a su vez se dividen en los subgrupos CARBA -A, -B y -D.

La producción de enzimas β-lactamasas es debida a la expresión de genes cromosómicos o plasmídicos que se diseminan fácilmente entre las bacterias Gram negativas, siendo estas enzimas su principal mecanismo de resistencia.

Tabla 1. Diversos esquemas de clasificación y representantes de las enzimas β-lactamasas de espectro extendido, según Ambler y Bush-Jacoby.

Clasificación molecular de Ambler	Grupo de Bush-Jacoby (2009)	Substrato / Blanco	Perfil de Inhibición		Ejemplo
			Ac. clavulánico	Tazobactam	
A	2a	Penicilinas	Sí	No	PC-1
	2b	Penicilinas/ algunas cefalosporinas de 1ª generación	Sí	No	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactámicos	Sí	No	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PET-1, VEB-1
	2br	Penicilinas	No	No	TEM-30, SHV-10
	2ber	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactámicos	No	No	TEM-50
	2c	Carbanicilinas	Sí	No	PSE-1, CARB-3
	2ce	Carbanicilinas, cefepime	Sí	No	RTG-4
	2e	Betalactámicos de espectro extendido	Sí	No	CepA
	2f		Cambia	No	KPC-2, 1M1-1, SME-1
B	3a	Carbapenémicos	No	Sí	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, NDM-1

	3b	Carbapenémicos	No	Sí	CphA, Sfh-1
C	1	Cefalosporinas	No	No	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
	1e	Cefalosporinas	No	Sí	GC1, CMY-37
D	2d	Cloxacilina	Cambiante	No	OXA-1, OXA-10
	2de	Cefalosporinas de espectro extendido	Cambiante	No	OXA-11, OXA-15
	2df	Carbapenémicos	Variable	No	OXA-23, OXA-48

(Rahman *et al.,* 2018)

Las BLEE's fueron identificadas en bacterias aisladas a partir de muestras clínicas en la década de los 80's y son producto de mutaciones aminoacídicas de las primeras β-lactamasas, TEM y SHV. Los genes que codifican estas enzimas son movilizados dentro de plásmidos conjugativos y son transferidos entre bacterias patógenas (Falagas & Karageorgopoulos, 2009).

3.3.1 TEM

TEM es una β-lactamasa ampliamente distribuida entre las bacterias Gram negativas, siendo responsable de aproximadamente el 90% de la resistencia a ampicilina que estas bacterias expresan (Rahman *et al*., 2018).

La primer TEM reportada se aisló de una muestra clínica de *Escherichia coli* en 1965, se identificó como TEM-1 y confería resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera generación. Poco después se describió la β-lactamasa TEM-2 la cual tenía cambios en la secuencia de aminoácidos y del punto isoeléctrico, pero el mismo perfil de substrato y mecanismo de acción que TEM-1.

Se han descrito 183 variantes derivadas de las primeras TEM, con cambios y mutaciones en la secuencia de aminoácidos (Seyedjavadi et al., 2016).

3.3.2 SHV

Las β-lactamasas SHV (sulfhidril variable) son enzimas mediadas por genes presentes en plásmidos, aunque, en algunas especies de *Klebsiella* estos genes forman parte de su cromosoma y les confieren un poco más del 20% de la resistencia a ampicilina (Tzouvelekis et al., 1999). En el año de 1983 se identificó SHV-2 presente en una cepa de *Klebsiella ozaenae,* la cual le confería resistencia a ampicilina; esta enzima es derivada de las mutaciones en la estructura aminoacídica de SHV-1 por cambios de una glicina por una serina en la posición 238 (Rahman *et al*., 2018).

Para SHV se han reportado 134 variantes distintas (Seyedjavadi *et al*., 2016), algunas con fenotipos de resistencia a β-lactámicos de amplio espectro como cefotaxima, ceftazidima e inhibidores de β-lactamasas.

3.3.3 CTX-M

Las enzimas CTX-M representan a la familia de β-lactamasas más encontrada en distintas especies bacterianas debido a su fácil diseminación plasmídica. Tienen un perfil de hidrólisis para cefalosporinas de amplio espectro y son sensibles a los inhibidores de β-lactamasas (Rahman *et al*., 2018). Las CTX-M no provienen de enzimas existentes ni de mutaciones, como las variantes de TEM y SHV, sino que se propone que fueron adquiridas de cepas de *Kluyvera sp*. por transferencia horizontal (Rossolini *et al*., 2008). Son enzimas pertenecientes a la clase A de Ambler y tienen características de BLEE. Se han reportado alrededor de 172 variantes de CTX-M, clasificándolas según su secuencia aminoacídica en 5 grupos (Cantón *et al.,* 2006; Rossolini *et al*., 2008).

- Grupo 1: CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -23, -28
- Grupo 2: CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, Toho-1
- Grupo 3: CTX-M-8

- Grupo 4: CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -18, -19, -21, Toho-2
- Grupo 5: CTX-M-25

Las variantes CTX-M-14 y CTX-M-15 son de amplia distribución a nivel mundial, estas se encuentran codificadas por plásmidos transferibles principalmente entre enterobacterias (Rahman *et al*., 2018). La β-lactamasa CTX-M-15 se usa como marcador epidemiológico, para identificar cepas multirresistentes en todo el mundo, debido a que se transfiere rápidamente entre las bacterias a través de elementos movilizables que normalmente portan otros genes de resistencia hacia antibióticos como las quinolonas y aminoglucósidos (Cortés, 2012).

3.3.4 OXA

Son enzimas capaces de hidrolizar oxacilina y cloxacilina, confieren a las bacterias la resistencia a ampicilina y cefalotina, y son pobremente inhibidas por el ácido clavulánico (Cortés, 2012). Pertenecen a la clase D y al grupo funcional 2d; son comunes entre las especies de *Pseudomonas* y menos frecuentes entre las enterobacterias. Las primeras OXA identificadas no poseen actividad contra cefalosporinas por lo que no se consideran BLEE's; en cambio OXA-10 y sus derivados (OXA-11, -14, -16, -17, -19, -15, -18, -28,-31, -32, -35 y -45) sí presentan un perfil BLEE, hidrolizando (débilmente) cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam (Rahman *et al*., 2018).

3.3.5 AmpC

Las AmpC son serin- β-lactamasas pertenecientes al grupo funcional 1. Su nombre indica la resistencia que confiere al antibiótico ampicilina y su codificación cromosomal, AmpC.

Algunas enterobacterias y algunos bacilos no fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa*, producen las AmpC de forma natural; por eso se explica la resistencia inducible de estas bacterias hacia ciertos antibióticos como las aminopenicilinas, cefalosporinas de primera generación, cefamicinas e inhibidores de β-lactamasas.

En cambio, *E. coli, Acinetobacter baumanii* y *Shigella* expresan la AmpC de forma constitutiva, esto significa que la secretan todo el tiempo, pero a niveles tan bajos que no se produce una resistencia significativa. Aunque cuando existen mutaciones en el promotor del gen se produce una sobrexpresión de la enzima y por lo tanto la bacteria se hace resistente a la mayoría de los β-lactámicos (Cortés, 2012).

Las enzimas plasmídicas de tipo AmpC se diseminan rápido entre las cepas productoras de β-lactamasas, siendo la cefamicinasa CMY-2 la más reportada en aislados de *E. coli* (Cortés, 2016).

3.4 Resistencia a Quinolonas

La resistencia de las enterobacterias hacia las quinolonas en pacientes con infecciones de vías urinarias, tanto hospitalizados como ambulatorios, era casi irreal (<1%) a mediados de los 90's; la resistencia a ciprofloxacino fue aumentando lentamente, de 1.2% en 1998 a 2.5% en 2001, siendo >20% para el 2009. En la actualidad, la resistencia a las quinolonas entre las cepas de uropatógenos aisladas de la comunidad y hospitalarias es muy variable, sobre todo porque algunas de estas producen BLEE's. En las cepas aisladas de pacientes con infecciones urinarias no complicadas, adquiridas en la comunidad y no productoras de BLEE's, la resistencia a las fluoroquinolonas es ≤10% y >70% en las BLEE positivas; y para las cepas de IVU's complicadas productoras de BLEE'S >90% (Dalhoff, 2012).

Los mecanismos de resistencia a quinolonas se clasifican en cromosómicos y plasmídicos. La resistencia cromosómica a su vez se divide en dos tipos: alteraciones de las enzimas que son blanco para las quinolonas (DNA girasa y topoisomerasa IV) y/o la disminución de la permeabilidad de la membrana bacteriana; y son transferidos de manera vertical, esto es, hacia la células hijas después de la fisión binaria bacteriana. Por lo contrario, los mecanismos de resistencia plasmídicos se transfieren de forma horizontal y entre diferentes especies bacterianas; y para las quinolonas estos son: la expresión de proteínas

que impiden su unión con el sitio blanco (Qnr), la producción de enzimas que las degradan (aac(6')-Ib-cr) y/o la expresión de bombas de eflujo que las transportan hacia afuera de la bacteria (QepA, OqxA y OqxB) (Cortés, 2012).

3.4.1 Proteínas Qnr

Las proteínas Qnr son codificadas por los genes *qnr* y pertenecen a la familia de pentapéptidos repetidos, llamadas así por la repetición en tándem de cinco aminoácidos. Estas proteínas compiten con el DNA por la unión a la DNA girasa, de este modo, al estar unida la proteína Qnr con la DNA girasa, no se forma el complejo con el DNA y tampoco se une la quinolona. Se han identificado cerca de 100 variantes de los genes *qnr* y se han clasificado en 5 subfamilias diferentes: *qnrA, qnrB, qnrC, qnrD* y *qnrS* (Aldred *et al*, 2014; Salah *et al*., 2019).

3.4.2 Enzima Aac(6')-Ib-cr

La aac(6')-Ib-cr es una variante de la enzima aminoglucósido acetiltransferasa, aac(6')-Ib, responsable de la resistencia a la familia de los aminoglucósidos. La nueva enzima además confiere resistencia a algunas fluoroquinolonas debido a dos mutaciones puntuales de la secuencia nucleotídica: Trp102Arg y Asp179Tyr. La enzima lleva a cabo la acetilación del nitrógeno del sustituyente del C7 del anillo piperazinil presente en ciprofloxacino, norfloxacino y algunos aminoglucósidos, anulando la actividad antibacteriana (Aldred *et al.,* 2014).

3.4.3 Bombas de eflujo

La resistencia a quinolonas por expresión de bombas de eflujo representa otro de los mecanismos mediados por plásmidos. Diferentes proteínas han sido identificadas y estudiadas como parte de este mecanismo de resistencia: OqxA, OqxB y QepA (Aldred *et al.,* 2014).

3.4.4 QepA

La bomba de eflujo QepA fue descrita en Japón en el 2007, presente en un aislado de *Escherichia coli* resistente a fluoroquinolonas, β-lactámicos y aminoglucósidos. El gen *qepA* era transportado por un plásmido que además portaba genes de resistencia *bla*$_{CTX-M12,}$ *mphA y rmtB,* los cuales codifican para enzimas de tipo cefotaximasas, aminoglucósido fosfotranferasas y guanina metiltranferasas, respectivamente.

QepA es una proteína perteneciente a la familia de las MFS (major facilitator superfamily), de 511 aminoácidos y 14 segmentos transmembranales. Su función es reducir moderadamente la concentración de quinolonas como norfloxacino y ciprofloxacino, bombeándolas hacia el exterior de la célula bacteriana. No posee sensibilidad para quinolonas hidrofílicas como el levofloxacino, ni para derivados hidrófobos como el ácido nalidíxico.

3.4.5 OqxAB

La bomba de eflujo OqxAB es codificada por genes localizados en plásmidos de aproximadamente 52 kb que, además de conferir resistencia a fluoroquinolonas, portan genes de resistencia para otros antibióticos. Este mecanismo de resistencia a quinolonas fue descrito en cepas de *Escherichia coli* aisladas de porcinos, confiriendo resistencia al compuesto quinoxaline-di-N-oxide olaquindox (promotor de crecimiento en cerdos) (Kim *et al*., 2009).

El gen *oqxA* codifica para una proteína de 391 aminoácidos (OqxA), mientras que el gen *oqxB* codifica para una proteína de 1050 aminoácidos (OqxB). Estas bombas de eflujo muestran una similitud con otro tipo de bombas, como MexE y Mexf (Cortés, 2012).

Los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas confieren bajos niveles de resistencia a las bacterias, sin embargo, se pueden diseminar rápidamente, facilitando la aparición de cepas super resistentes (Ramírez-Castillo, *et al.,* 2018).

4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

En 2010, Romero y cols., caracterizaron genes de resistencia a BLEE en 45 cepas de enterobacterias (*E. coli*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.*) procedentes de cinco laboratorios (incluidos dos hospitales) de la Ciudad de Puebla. Encontró que el 77.78% amplificó para BLEE tipo CTX-M, el 71.11% para TEM, el 51.11% AmpC, 35.56% SHV, 15.56% OXA-1 y 6.67% para TLA-1 (Romero, 2010).

Rocha y cols., en 2010 reportaron por primera vez a una cepa de *E. coli* de origen clínico con resistencia plasmídica a quinolonas que contiene el gen *qepA*. Esta cepa de *E. coli* C1550 mostró un fenotipo de multirresistencia y fue positiva a producción de BLEE, se le detectaron los genes que codifican para las betalactamasas *CTX-M15 y TEM-1b*; fue clasificada en el grupo filogenético D. La cepa contenía, además del gen *qepA*, otros genes de resistencia a antibióticos *(drf2d, drfA1, sat2 y aadA1)* y se demostró que dicho gen estaba incluido en un plásmido conjugativo de tipo IncF (Rocha-Gracia *et al*., 2010).

Paniagua-Contreras*, et al*., en 2015 mostraron que de las 194 muestras de *E. coli* aisladas de urocultivos de pacientes de la Unidad de Médica Familiar #64 del IMSS de la Ciudad de México, México, el 96.9% eran cepas multidrogorresistentes. También confirmaron reportes previos, como el de Molina-López, J. et al., 2011; sobre que el serotipo de *E. coli* uropatógena 025 es el más frecuente en la Ciudad de México.

En 2018 Ramírez-Castillo y cols., analizaron 110 aislados de infecciones de vías urinarias y determinaron los genes de resistencia antibacteriana presentes en

cada una de las cepas. Encontraron que los genes *bla*$_{CTX-M}$, los genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos (PMQR) y las mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) estaban presentes en las cepas tanto de pacientes hospitalizados como ambulatorios, así como en hombres y mujeres. Así mismo, se demostró que los aislados con resistencia a quinolonas presentan una alta prevalencia a *bla*$_{CTX-M}$, en comparación a los aislados sensibles a quinolonas (21% vs 5.2%, p= 0.012) (Ramírez-Castillo *et al*., 2018).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los genes que codifican para las BLEE's son transportados en plásmidos que generalmente portan genes de resistencia para otras familias de antibióticos, como las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos. La importancia de estudiar la resistencia antimicrobiana presente en cepas aisladas de pacientes hospitalizados y de la comunidad generará conocimiento sobre los mecanismos de resistencia que se pueden estar diseminando entre la población, y con ello poder dar información al sector salud y pueda ser utilizada como base para actualizar los esquemas de tratamiento y reducir los costos que se generan por la alta demanda de atención a la salud derivada de infecciones urinarias provocadas por bacterias como *Escherichia coli.*

6. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones en vías urinarias representan la tercera causa de morbilidad en todos los grupos de edad, de las cuales *E. coli* es responsable en un 80% de los casos. Existen cepas de *E. coli* multirresistentes distribuidas en todo el mundo.

A nivel mundial se ha reportado la co-resistencia hacia antibióticos β-lactámicos y quinolonas, codificadas en el mismo elemento genético movilizable; sin embargo, en México existen escasos reportes al respecto; es por lo que resulta de gran

importancia el estudio de *E. coli* productora de BLEE y resistente a quinolonas, en muestras de población del estado de Puebla, con la finalidad de conocer su distribución local e informar al médico su presencia**.**

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

- Estudiar la resistencia a quinolonas de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), aisladas de muestras de orina de pacientes con infecciones urinarias.

7.2 Objetivos específicos

- Aislar e identificar cepas de *Escherichia coli* a partir de orina de pacientes con infección urinaria.
- Determinar la sensibilidad a antimicrobianos y el fenotipo de la producción de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en las cepas de *E. coli*.
- Identificar genes que codifican la producción de BLEE tipo CTX-M, SHV, TEM, así como AmpC y OXA en los aislamientos de *E. coli.*
- Identificar genes plasmídicos que codifican para resistencia a quinolonas: *qnrA, qnrB, aac(6´)-lb-cr, oqxA, oqxB y qepA* en los aislamientos de *E. coli.*

8. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

8.1 Diseño del estudio

El presente estudio es de tipo transversal y descriptivo. Se realizó un análisis de forma experimental de las características fenotípicas y genotípicas de resistencia de las cepas identificadas como *E. coli* aisladas de muestras de orina de pacientes del Hospital ISSSTEP. La colección de muestras se llevó a cabo de abril de 2016 a marzo de 2017. Los resultados obtenidos se relacionaron con los resultados genotípicos de las pruebas realizadas.

8.2 Ubicación espacio-temporal

La tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad perteneciente al área de Microbiología Médica del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

8.3 Muestreo

Las cepas fueron donadas por el Hospital ISSSTEP de la ciudad de Puebla, Puebla, México.

8.3.1 Definición de población

En el estudio se analizaron 73 cepas de *Escherichia coli*, aisladas de urocultivos tomadas de rutina, de 70 personas de edades de los 0 a los 87 años, de pacientes hospitalizados.

8.3.2 Selección de la muestra

Para este estudio únicamente se tomaron en consideración las cepas de *E. coli* aisladas de muestras de orina de pacientes cursando con IVU.

8.3.3 Criterios de selección de la muestra

8.3.3.1 Criterios de inclusión

En este estudio únicamente se incluyeron las cepas de *E. coli* aisladas de orina.

8.3.3.2 Criterios de exclusión

No se incluyeron las cepas diferentes a *E. coli* provenientes de muestras de orina.

8.3.3.3 Criterios de eliminación

Para este estudio fueron eliminadas las cepas que estaban contaminadas.

8.3.4 Diseño y tipo de muestreo

Muestreo probabilístico aleatorio y observacional, sin importar las condiciones, la edad o el género de las personas.

8.3.5 Tamaño de la muestra

Se obtuvieron 73 cepas de *Escherichia coli* aisladas de urocultivos.

8.4 Definición de las variables y escalas de medición

Personas: Las muestras fueron de urocultivos de pacientes que cursaron con una infección de las vías urinarias y acudieron al Hospital ISSSTEP en la ciudad de Puebla, Puebla, México, en el periodo comprendido de abril a 2016 a marzo de 2017.

Microbiológicas: Perfiles de sensibilidad a 20 antibióticos. La medición se basa en los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI,2018) catalogando a las cepas como: Resistentes, de Resistencia Intermedia y

Sensibles. Identificación fenotípica de las cepas que producen Betalactamasas de Espectro Extendido. Identificación de genes de resistencia mediante PCR y secuenciación.

8.5 Método de recolección de datos

Los datos de las cepas de urocultivos se ordenaron en una computadora con el programa de Excel, por medio de tablas en las que se capturaron y ordenaron por el número de cepa, nombre del paciente (confidencial), edad, género, servicio hospitalario, tipo de muestra, especie bacteriana y los resultados obtenidos de las pruebas fenotípicas y genotípicas ensayadas.

8.6 Recursos humanos

Alumna: Miranda Herrera Urióstegui y D.C Rosa del Carmen Rocha Gracia, directora de tesis y responsable del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad. D.C Edwin Barrios Villa auxiliar del laboratorio.

8.7 Recursos materiales

- Medio de cultivo MacConkey ® Bioxon.
- Medio de cultivo EMB Levine ® Bioxon.
- Medio de cultivo TSA ® Bioxon.
- Medio de cutivo Muller Hinton ® Bioxon.
- Medio de cultivo TSI ® Bioxon.
- Medio de cultivo LIA ® Bioxon.
- Medio de cultivo MIO ® Bioxon.
- Medio de cultivo Citrato de Simmons ® Bioxon.
- Medio de cultivo Urea ® Bioxon.

- Medio de cultivo Fenilalanina ® Bioxon.
- Sensidiscos con antibióticos

8.8 Recursos Financieros

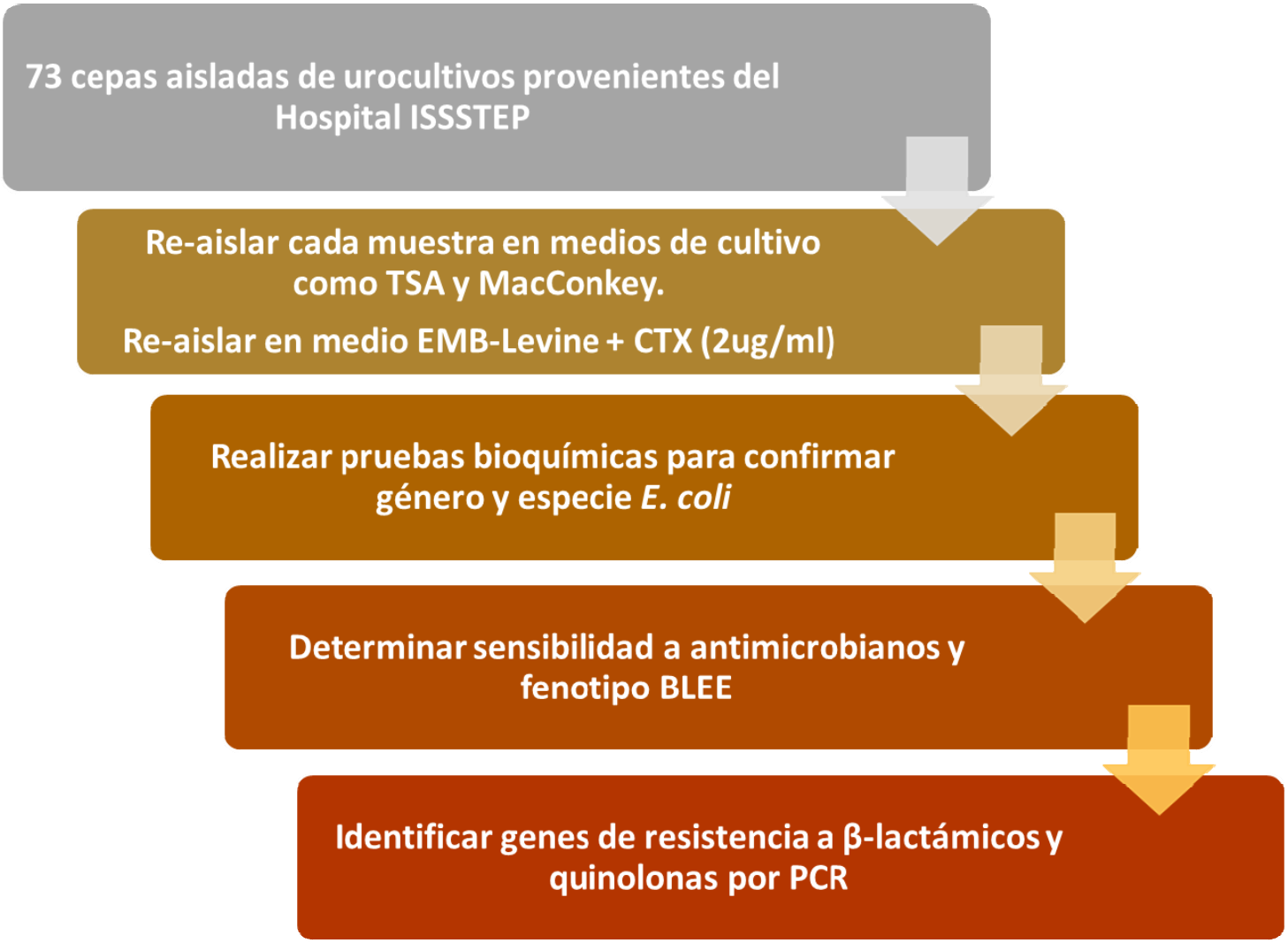
Este trabajo fue financiado por el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP y por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de posgrado de la BUAP mediante el proyecto aprobado con referencia 100182644/VIEP2019. También fue financiado por el proyecto CONACyT CB-2017-2018 A1-S-22136.

8.9 Bioética

El presente estudio se llevó a cabo con cepas aisladas de cultivos de orina tomados de forma rutinaria a pacientes Hospital ISSSTEP en la ciudad de Puebla, no se utilizaron muestras clínicas. Los datos de los pacientes se mantuvieron en anonimato. El protocolo para este estudio fue aprobado por el comité de ética e investigación del Hospital ISSSTEP (004/2015EXT).

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Esquema de trabajo



9.2 Aislamiento de las cepas de urocultivos

Las cepas que se utilizaron en este trabajo procedieron de muestras de urocultivos de pacientes del Hospital ISSSTEP de la ciudad de Puebla, Puebla, México; recolectadas en el periodo de abril de 2016 a marzo de 2017. Las cepas se registraron con un número consecutivo en el cepario interno del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad-CICM, anotando los datos hospitalarios de cada una de las cepas. Posteriormente para el re-aislamiento de las cepas se tomó una asada de los aislado provenientes del hospital y se resembró en medio TSA (Bioxon ®) por estría cruzada, las placas se incubaron por 20-24 horas a 37°C. Tras el periodo de incubación, se recolectó todo el

crecimiento y se resuspendió en viales de 1 mL con caldo BHI (Bioxon ®) adicionado con glicerol (Bio-Rad ®) al 10% (vol/vol). Las cepas se guardaron a -70°C para su posterior estudio.

9.3 Confirmación de género y especie

Como primer filtro, las cepas se sembraron por estría cruzada en los medios de cultivo Levine EMB Agar, Levine EMB Agar + CTX (2ug/ml) y MacConkey Agar y se incubaron a 37°C por 20-24 horas. Las cepas que no presentaron morfología colonial típica de *E. coli* en el agar Levine EMB / MacConkey fueron descartadas de este estudio.

Las cepas que crecieron en agar MacConkey y EMB Levine/CTX se resembraron por estría cruzada en placas de agar TSA (Bioxon ®), y también se incubaron por 20-24 horas a 37°C; pasado el tiempo, se realizó la identificación de las cepas por género y especie mediante pruebas bioquímicas con las indicaciones del método de Cowan y Steel (Barrow, 2004), específicas para Enterobacterias: Agar Hiero Triple Azúcar (TSI), Agar Hierro Lisina (LIA), Movilidad Indol Ornitina (MIO), Citrato (CIT), Urea de Christensen (URE) Fenilalanina (FEN). Los resultados se compararon con los esquemas de identificación señalados por Cowan y Steel en el manual de Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias Importancia Clínica de MacFaddin (MacFaddin, 2003), utilizando la clasificación taxonómica propuesta en la 2° edición *de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Brenner *et al*., 2005).

9.4 Determinación de perfil de resistencia

Esta técnica se utilizó para determinar fenotípicamente la susceptibilidad que tienen las bacterias a ciertos antibióticos. Se ensayaron 20 antibióticos de diferentes familias, como: β-lactámicos, Quinolonas, Aminoglucósidos, Nitrofuranos, Cloranfenicoles, Tetraciclinas, entre otras.

Para el antibiograma se implementó el método de Kirby-Baüer y se siguieron las especificaciones del Manual de Estándares para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (2017- 2018) del CLSI.

- Procedimiento

A partir de un cultivo de 18-24 horas en agar TSA, con el asa bacteriológica se tomaron de entre 3 a 5 colonias bien aisladas y con la misma morfología, y se inocularon en un tubo con solución salina isotónica (SSI) (al 0.85% (masa/volumen) de NaCl), se agitó bien para resuspender la muestra. Posteriormente se ajustó la turbidez de la suspensión bacteriana con un estándar de 0.5 con base en la escala de McFarland, que es equivalente a 1.5 x 10^8 UFC/mL. Siguiente a esto, se impregnó un hisopo de algodón estéril con la suspensión y se inocularon placas de agar Müeller Hinton (Bioxon ®), por la técnica de estriado ‘‘en césped’’, empezando en la parte superior de la placa y deslizando el hisopo sobre la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándolo por último sobre la periferia del agar, de esta forma se aseguró que toda la siembra fuese uniforme.

Después, se colocaron los sensidiscos impregnados con los antibióticos (Bio-Rad ®), esto se hizo con ayuda de una pinza estéril, asegurando el contacto del sensidisco con la superficie. Se colocaron 7 discos por placa. Las placas se incubaron de forma invertida a 37°C por un lapso de 18-20 horas. Finalmente se midieron los halos de inhibición y se compararon los valores con los establecidos para enterobacterias por el CLSI (CLSI 2017-2018); se determinó si las cepas son sensibles, intermedias o resistentes a cada antibiótico evaluado (Figura 3) (Tabla 2).

La prueba se realizó utilizando como control a la cepa *E. coli* ATCC611, que es sensible a todos los antibacterianos evaluados.

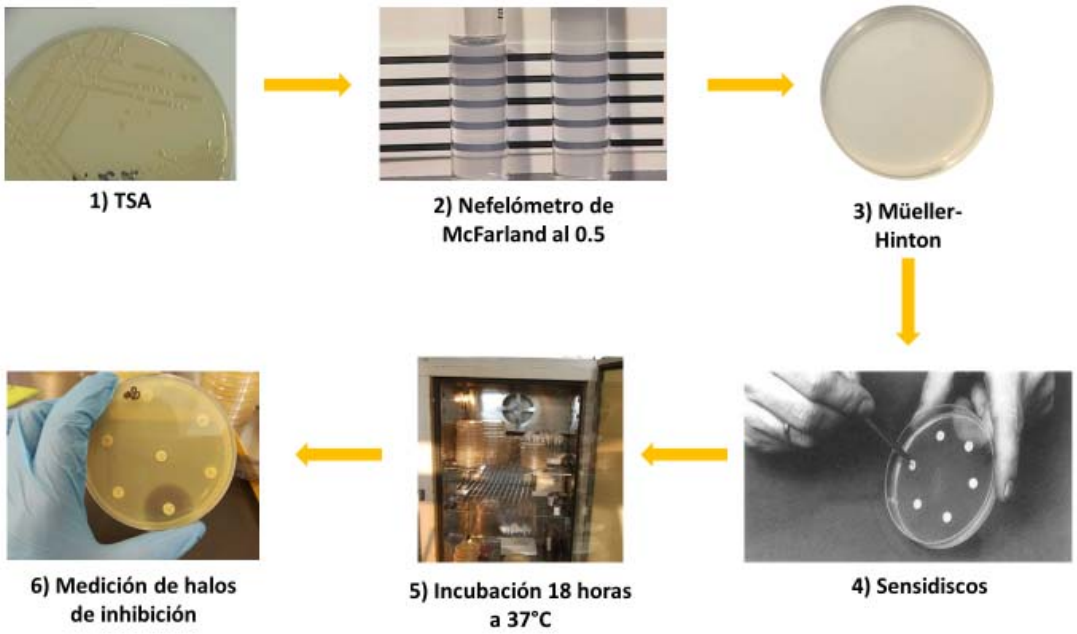


Figura 3. Esquema de trabajo para la realización del antibiograma

Tabla 2. Perfil de resistencia de acuerdo con el antibiótico evaluado y el diámetro del halo de inhibición

Familia	Antibiótico		Concentración (µg)	S	I	R
β-lactámicos	Ampicilina	AMP	10	≥17	14-16	≤13
	Amoxicilina con Ácido Clavulánico	AMC	20/10	≥18	14-17	≤13
	Cefoxitina	FOX	30	≥18	15-17	≤14
	Ceftazidima	CAZ	30	≥21	18-20	≤17
	Cefotaxima	CTX	30	≥26	23-25	≤22
	Ceftriaxona	FOX	30	≥23	20-22	≤19
	Cefepime	FEP	30	≥25	-	≤18

	Aztreonam	ATM	30	≥21	18-20	≤17
	Imipenem	IPM	10	≥23	20-22	≤19
	Meropenem	MEM	10	≥23	20-22	≤19
Quinolonas	Ciprofloxacina	CIP	5	≥21	16-20	≤15
	Ácido Nalidíxico	NA	30	≥19	14-18	≤13
Aminoglucósidos	Gentamicina	GM	10	≥15	13-14	≤12
	Amikacina	AN	30	≥17	15-16	≤14
Tetraciclinas	Tetraciclina	TE	30	≥15	12-14	≤11
Otros	Trimetoprim con Sulfametoxazol	SXT	1.25/23.75	≥16	11-15	≤10
	Cloranfenicol	C	30	≥18	13-17	≤12
	Colistina	COL	-	-	-	-
	Fosfomicina	FOS	200	≥16	13-15	≤12
	Nitrofurantoína	NIT	300	≥17	15-16	≤14

R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible

Fuente: CLSI, 2017-2018

9.5 Detección fenotípica de BLEE's

La detección de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE's) se realizó fenotípicamente mediante la prueba de difusión con doble disco. Esta prueba consiste en un antibiograma convencional, al centro de la placa se colocó un sensidisco impregnado con un inhibidor de BLEE's (AMC, SB o TZ) y alrededor, a una distancia aproximada de 20 mm, se colocaron los discos impregnados con un β-lactámico: CTX, CAZ, FEP y ATM. Si la cepa era productora de BLEE's se observaba un sinergismo entre el inhibidor de la β-lactamasa y el antibiótico β-lactámico, debido a que la estructura del inhibidor es muy semejante a la del

antibiótico, la enzima se unía irreversiblemente al inhibidor, sin hidrolizar al antibiótico; esto daba un fenotipo semejante a una ‘‘cola de pescado’’ entre el disco del inhibidor y el disco del β-lactámico.

- Procedimiento

Esta técnica se realizó de la misma manera que el antibiograma convencional, es decir, de un cultivo de 18 a 24 horas en agar TSA, con el asa bacteriológica se tomaron de entre 3 a 5 colonias bien aisladas y con la misma morfología, y se inocularon en un tubo con solución salina isotónica (SSI) (al 0.85% (masa/volumen) de NaCl), se agitó bien para resuspender la muestra. Posteriormente se ajustó la turbidez de la suspensión bacteriana con un estándar de 0.5 con base en la escala de McFarland, que es equivalente a 1.5 x 10^8 UFC/mL. Siguiente a esto, se impregnó un hisopo de algodón estéril con la suspensión y se inocularon placas de agar Müeller Hinton (Bioxon ®), por la técnica de estriado ‘‘en césped’’, empezando en la parte superior de la placa y deslizando el hisopo sobre la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándolo por último sobre la periferia del agar para de esta forma conseguir que toda la siembra fuese uniforme.

Se colocaron los sensidiscos de antibióticos, situando un disco de Amoxicilina/Ácido clavulánico (concentración de 20/10 µg) a una distancia de 20 mm de discos con carga estándar (30 µg) de Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ), Cefepime (FEP) y Aztreonam (ATM), asegurando que cada disco estuviera en contacto directo con el medio. Finalmente, las placas se incubaron de forma invertida a 37°C por 18 horas, pasando el lapso, se leyeron los resultados midiendo el diámetro de los halos de inhibición y la producción del fenotipo de ‘‘cola de pescado’’ (Figura 4).

Tanto para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por antibiograma como para el fenotipo BLEE, se usó como control la cepa de E. coli C1550 (Rocha-Gracia *et al*., 2010).

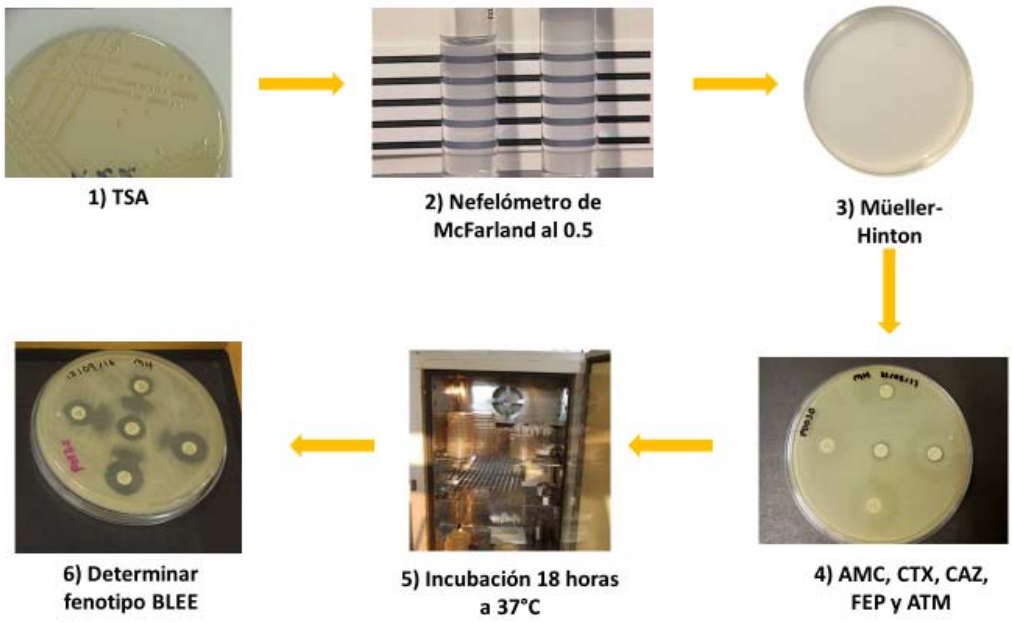


Figura 4. Esquema de trabajo para determinar la producción fenotípica de BLEE's

9.6 Identificación de genes de resistencia a β-lactámicos y quinolonas por PCR y secuenciación

Se realizó la extracción de DNA de las cepas que presentaron perfil de resistencia tanto a β-lactámicos como a Quinolonas y producción de BLEE's. Se empleó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y se utilizaron primers previamente diseñados y probados en el laboratorio (Tabla 3), para la identificación de los genes que codifican para β-lactamasas de tipo: bla*ctx-m,* bla*shv,* bla*tem,* bla*oxa y ampC*, así como para los genes plasmídicos de resistencia a quinolonas: *qnrA, qnrB, aac(6´)-Ib-cr, oqxA, oqxB* y *qepA*. Posteriormente se hizo electroforesis para observar los productos amplificados y el gel se fotodocumentó.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad-CICM para la amplificación de genes de resistencia

Gen	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplificado (pb)	Referencia
***bla*$_{CTX-M}$ Grupo 1**	***CTX-M13U***	GGTTAAAAAATCACTGCGYC	**843**	**Briñas, et al., 2005**
	CTX-M13D	TTGGTGACGATTTTAGCCGC		
***bla*$_{TEM-1}$**	***TEM1-F***	AGAGTATGAGTATTCAACATT	**837**	**Hansen et al., 2004**
	TEM-2R	ATCTCAGCGATCTGTCTAT		
***bla*$_{SHV}$**	***SHV-F***	CACTCAAGGATGTATTGTG	**883**	**Pitout, et al., 1998**
	SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTCG		
***bla*$_{CMY-2}$**	***CMY-2F***	GCCGTTATCTACCAGGGAAAA	**986**	**Stapleton, et al., 1999**
	CMY-2R	TTTTCAAGAATGCGCCAG		
***bla*$_{OXA}$**	***oxa1Ps-F***	ACACAATACATATCAACTTCGC	**814**	**Steward, 2001**
	oxa1Ps-R	AGTGTGTTTAGAATGGTGATC		
qnrA	***QnrAm-F***	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	**580**	**Cattoir, et al., 2007**
	QnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
qnrB	***QnrB-F***	GGCATTGAAATTCGCCACTG	**264**	**Cattoir, et al., 2007**
	QnrB-R	TTTGCYGYYCGCCAGTCGAA		
QepA	***qepA-F***	CGTGTTGCTGGAGTCCTTC	**403**	**Cattoir ,et. *al.*, 2008**
		GGACATCTACGGCTTCTTCG		
	qepA-R	CTGCAGGTACTGCGTCATG		
		CATGACGCAGTACCTGCAG		
OqxA	***OqxA-F***	CTCGGCGCGATGATGCT	**392**	**Kim et al., 2009**
	OqxA-R	CCACTCTTCACGGGAGACGA		
OqxB	***OqxBs-F***	TTCTCCCCCGGCGGGAAGTAC	**512**	**Kim et al., 2009**
	OqxBa2-R	CTCGGCCATTTTGGCGCGTA		
Aac(6')-Ib	***aac (6')-Ib-F***	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	**482**	**Park et al., 2006**
	aac (6')-Ib-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		

- Procedimiento

1) Extracción de DNA por el método hervido: El templado de DNA bacteriano se extrajo por el método físico de la ebullición, con la cual se produce la ruptura celular, permitiendo la salida del contenido celular que queda en suspensión. A partir de un cultivo masivo en agar TSA de 24 horas, se recogió una asada y se suspendió en 500 µl de agua inyectable estéril, se homogeneizó con vórtex y se colocó durante 15 minutos en un baño con agua hirviendo. Después se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos; con una pipeta se retiró el sobrenadante y se colocó en un tubo Eppendorf nuevo y estéril. Se midió la concentración de DNA y se guardó a -20°C.
2) La concentración y pureza del DNA se determinó con ayuda del NanoDrop (programa NanoDrop 3.0.0), el cual lee la absorbancia que presenta la muestra a 260 nm. La lectura a 260 nm indica la concentración de DNA teniendo en cuenta que 1 unidad de densidad óptica equivale a 50 µg/mL de DNA de doble hebra. Se consideró un rango de 200 a 400 ng/uL para poder utilizar los templados en las PCR.
3) Se realizó el mix para la PCR agregando por separado cada uno de los componentes que se enlistan a continuación con sus respectivas concentraciones y cantidades (Tabla 4).

Tabla 4. Componentes y cantidades para cada PCR

Material	Concentración inicial	Vol (µl)	Concentración final
Agua		6.4	
Buffer	10X	1	1x
MgCl2	25mM	1	2.5 mM
DNTP's	10Mm	0.4	0.4 mM
Oligo F	25µM	0.3	0.75 µM
Oligo R	25µM	0.3	0.75 µM
Taq	5 U/µL	0.1	0.5 U
DNA	100 ng/µL	0.5	5 ng/µL

Volumen final		10	

9.6.1 Condiciones para las PCR

Las condiciones de reacción que se emplearon se muestran en la Tabla 5. Para cada PCR se utilizaron controles de referencia: como control positivo se usó el DNA proveniente del lisado bacteriano de las cepas que poseen el gen de interés ya secuenciado; y como control negativo se utilizó la misma mezcla de la reacción, pero sin DNA, en su lugar se colocó el volumen correspondiente de agua libre de nucleasas.

9.6.2 Visualización de los productos de PCR

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% en una cámara de electroforesis con TAE 1X, a 100 Voltios, junto con un marcador de peso molecular O' Gene Ruler (Fermentans ®, de un rango de 100 a 3000 pb). Después los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (BET) 0.5 g/L durante 30-40 segundos y se destiñeron en un recipiente con agua destilada por 5 a 10 minutos. Para visualizar los fragmentos de DNA, los geles se fotografiaron en un digitalizador de imágenes ChemiGenius (GenSnapfromSynGene).

Tabla 5. Condiciones para las PCR de cada gen

Oligonucleótidos (Secuencia 5'-3)	Condiciones de amplificación	Tamaño (pb)
***bla*$_{CTX-M}$ grupo 1** CTX-M13U: GGTTAAAAAATCACTGCGYC CTX-M13D: TTGGTGACGATTTTAGCCGC	94ºC 5 min. 1c 94°C 50 seg 50°C 40 seg 35c 68°C 1 min 68°C 5 min 1 c	**843**

***bla*$_{TEM-1}$** TEM1-F: AGAGTATGAGTATTCAACATT TEM-2R: ATCTCAGCGATCTGTCTAT	95°C 3 min 1c 95°C 1 min 45°C 1 min 30c 72°C 5 min 72°C 10 min 10°C/-	**837**
***bla*$_{SHV}$** SHV-F: CACTCAAGGATGTATTGTG SHV-R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	96ºC 15 seg. 1c 96°C 15 seg 52°C 15 seg 24c 72°C 2 min 72°C 3 min 1 c	**883**
***bla*$_{CMY-2}$** CMY-2F: GCCGTTATCTACCAGGGAAAA CMY-2R: TTTTCAAGAATGCGCCAG	95ºC 3 min. 1 ciclo 95ºC 30 seg. 53ºC 30 seg. 30 ciclos 72ºC 30 seg. 72ºC 3 min. 1 ciclo	**986**
***bla*$_{OXA}$** oxa1 Ps- F: ACACAATACATATCAACTTCGC oxa1 Ps- R: AGTGTGTTTAGAATGGTGATC	95ºC 5 min. 1c 95°C 1 min 55°C 30 seg 35c 72°C 90 seg 72°C 10 min 1 c	**814**
qnrA QnrAm-F: AGAGGATTTCTCACGCCAGG	95ºC 5 min. 1c 95°C 1 min	**580**

QnrAm-R: TGCCAGGCACAGATCTTGAC	55°C 1 min 40c 72°C 1 min 72°C 7 min 1 c	
qnrB QnrB-F: GGCATTGAAATTCGCCACTG QnrB-R: TTTGCYGYYCGCCAGTCGAA	95ºC 5 min. 1c 95°C 1 min 56°C 1 min 35c 72°C 1 min 72°C 7 min 1 c	**264**
QepA qepA-F: CGTGTTGCTGGAGTCCTTC GGACATCTACGGCTTCTTCG qepA-R: CTGCAGGTACTGCGTCATG CATGACGCAGTACCTGCAG	96ºC 1 min. 1c 96°C 1 min 60°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 5 min 1 c	**403**
OqxA OqxA-F: CTCGGCGCGATGATGCT OqxA-R: CCACTCTTCACGGGAGACGA	94ºC 5 min. 1c 94°C 15 seg 45°C 30 seg 35c 72°C 1 min 72°C 7 min 1 c	**392**
OqxB OqxBs-F: TTCTCCCCCGGCGGGAAGTAC OqxBa2-R: CTCGGCCATTTTGGCGCGTA	94ºC 5 min. 1c 94°C 45 seg 64°C 45 seg 32c 72°C 1 min 72°C 7 min 1 c	**512**

Aac(6')-Ib aac (6')-Ib-F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA aac (6')-Ib-R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	94ºC 5 min. 1c 94°C 45 seg 60°C 45 seg 20c 72°C 45 seg 72°C 5 min 1 c	**482**

9.6.3 Análisis de datos

El análisis de datos se realizó mediante una tabla en la que se compararon las características fenotípicas, los perfiles de resistencia a los antibióticos y los genes de resistencia presentes, y se estudió la posible relación entre todos estos factores.

9.6.4 Diseño estadístico

Estadistica descriptiva

10. RESULTADOS

Objetivo 1. Confirmación de género y especie bacteriana de *E. coli* de las cepas aisladas de urocultivos

Nos donaron un total de 73 cepas aisladas de pacientes con infecciones de vías urinarias del Hospital ISSSTEP, las cuales fueron trabajadas de abril del 2016 a agosto de 2019. Algunas de las cepas fueron aisladas del mismo paciente, los datos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 6) (Gráfica 1).

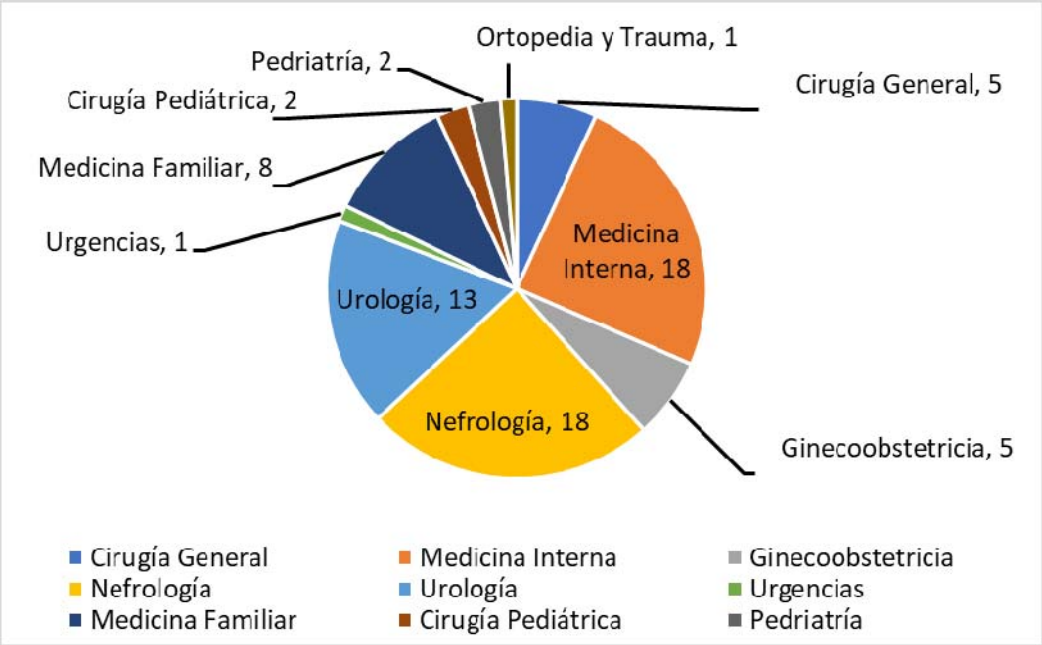
Tabla 6. Datos de las cepas aisladas de urocultivos en pacientes del ISSSTEP

No. de cepa	Género	Edad (años)	Servicio Hospitalario	Tipo de muestra
P-001	H	53	Cirugía General	Urocultivo
P-004	M	80	Medicina Interna	Urocultivo
P-007	M	36	Cirugía General	Urocultivo
P-008	M	68	Medicina Interna	Urocultivo
P-009	M	73	Ginecoobstetricia	Urocultivo
P-0010	M	87	Nefrología	Urocultivo
P-0012	M	21	Nefrología	Urocultivo
P-0013	M	47	Urología	Urocultivo
P-0016	M	53	Ginecoobstetricia	Urocultivo
P-0017	M	7	Cirugía Pediátrica	Urocultivo
P-0018	M	73	Medicina Interna	Urocultivo
P-0019	M	85	Medicina Familiar	Urocultivo
P-0020	H	84	Medicina Interna	Urocultivo
P-0022	M	84	Urgencias	Urocultivo
P-0024	M	82	Nefrología	Urocultivo
P-0025	M	63	Urología	Urocultivo
P-0026	M	68	Medicina Interna	Urocultivo
P-0028	H	80	Cirugía General	Urocultivo
P-0030	M	42	Cirugía General	Urocultivo
P-0031	M	50	Urología	Urocultivo
P-0033	M	73	Medicina Familiar	Urocultivo
P-0034	M	61	Urología	Urocultivo
P-0035	H	80	Urología	Urocultivo
P-0036	M	52	Ginecoobstetricia	Urocultivo
P-0037	H	71	Urología	Urocultivo
P-0039	H	57	Nefrología	Urocultivo
P-0040	H	68	Urología	Urocultivo
P-0042	M	85	Medicina Interna	Urocultivo
P-0043	M	56	Cirugía General	Urocultivo
P-0044	M	61	Urología	Urocultivo
P-0046	H	81	Nefrología	Urocultivo
P-0049	H	65	Urología	Urocultivo
P-0052	M	81	Medicina Interna	Urocultivo
P-0055	M	74	Medicina Interna	Urocultivo
P-0057	M	76	Medicina Interna	Urocultivo
P-0059	M	71	Nefrología	Urocultivo
P-0060	M	74	Medicina Interna	Urocultivo
P-0061	M	55	Nefrología	Urocultivo

P-0063	H	71	Nefrología	Urocultivo
P-0064	H	31	Nefrología	Urocultivo
P-0065	H	71	Urología	Urocultivo
P-0066	H	64	Urología	Urocultivo
P-0067	M	45	Medicina Familiar	Urocultivo
P-0068	M	57	Nefrología	Urocultivo
P-0071	H	68	Nefrología	Urocultivo
P-0076	H	87	Nefrología	Urocultivo
P-0077	M	79	Nefrología	Urocultivo
P-0078	H	73	Urología	Urocultivo
P-0079	M	82	Medicina Interna	Urocultivo
P-0080	M	45	Ginecoobstetricia	Urocultivo
P-0081	M	70	Nefrología	Urocultivo
P-0082	M	78	Medicina Interna	Urocultivo
P-0083	M	70	Medicina Interna	Urocultivo
P-0084	M	82	Ortopedia y trauma	Urocultivo
P-0085	M	70	Nefrología	Urocultivo
P-0086	M	10	Pediatría	Urocultivo
P-0088	H	78	Medicina Interna	Urocultivo
P-0089	M	87	Nefrología	Urocultivo
P-0090	M	78	Medicina Interna	Urocultivo
P-0091	M	68	Ginecoobstetricia	Urocultivo
P-0092	M	50	Medicina Familiar	Urocultivo
P-0094	H	62	Urología	Urocultivo
P-0095	M	69	Nefrología	Urocultivo
P-0096	M	77	Medicina Interna	Urocultivo
P-0097	M	67	Medicina Familiar	Urocultivo
P-0098	M	49	Nefrología	Urocultivo
P-0099	H	80	Medicina Familiar	Urocultivo
P-0100	M	66	Medicina Interna	Urocultivo
P-0101	M	0	Cirugía Pediátrica	Urocultivo
P-0102	M	82	Medicina Familiar	Urocultivo
P-0103	M	9	Medicina Familiar	Urocultivo
P-0104	M	5	Pediatría	Urocultivo
P-0105	M	79	Medicina Interna	Urocultivo

Nota: Las cepas que se marcan con el mismo color corresponden al mismo paciente

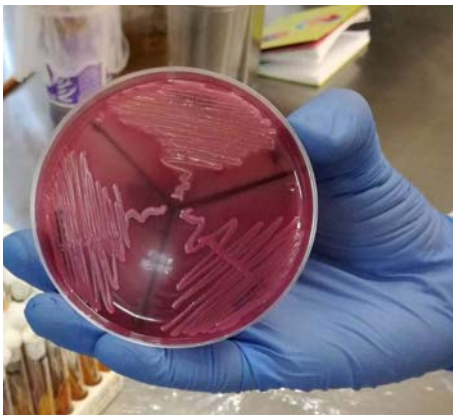
M: Mujer H: Hombre



Gráfica 1. Áreas Hospitalarias de donde provenían pacientes a los que se les aislaron las cepas de *E. coli*

Las 73 cepas fueron sembradas en Agar MacConkey, EMB-Levine y EMB-Levine adicionado con 2 µg/mL de Cefotaxima (CTX), que es la concentración recomendada por el CLSI para la preselección de bacterias con posible producción de BLEE.

A)



B)

Figura 5. A) Crecimiento bacteriano en agar MacConkey y B) Crecimiento bacteriano en agar EMB-Levine, de las cepas de urocultivos del ISSSTEP.

E. coli tiene una morfología característica en estos medios de cultivo, es por lo que se emplean para su identificación; en el agar MacConkey las colonias crecen circulares de color rosa o morado, mientras que en el agar EMB-Levine las colonias crecen de color verde metálico (Figura 5). A la par, a las 73 cepas de urocultivos se les realizaron las pruebas de metabolismo bioquímico (mencionadas en material y métodos) para confirmar el género y especie bacteriana; algunas no mostraron las características fenotípicas de *E. coli*, por lo que se tuvo que confirmar la especie bacteriana por PCR amplificando el gen *uidA*, el cual codifica para una Beta-glucoronidasa específica de dicha especie (Tabla 7) (Figura 6).

Tabla 7. Resultados de las pruebas bioquímicas de las 73 cepas de *E. coli*

No. de cepa	Medio EMB Levine	Medio EMB Levine + 2 µg/mL CTX	Medio MacConkey	TSI	H_2S	GAS	LIA	M	I	O	Cit	Urea	FA	Bacteria identificada
P001	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	-	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P004	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
***P007**	-	-	Lac (-)	K/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P008	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
***P009**	-	-	Lac (-)	K/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0010	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	-	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0012	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0013**	-	-	Lac (-)	A/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0016	+	Sin crecimiento	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0017	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0018**	-	-	Lac (-)	A/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0019**	-	-	Lac (-)	K/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0020**	-	-	Lac (-)	K/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0022	+	Sin crecimiento	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0024**	-	-	Lac (-)	A/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0025	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0026	+	+	Lac(+)	A/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0028	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	-	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0030**	-	-	Lac (-)	A/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0031	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0033**	-	-	Lac (-)	K/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0034	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0035	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*

P0036	+	+	Lac(+)	A/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0037	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0039	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	-	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0040	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0042**	-	Sin crecimiento	Lac (-)	A/A	-	-	K/A	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0043**	-	-	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	-	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0044	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	-	-	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0046	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	-	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0049	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0052**	-	-	Lac (-)	A/A	-	-	K/A	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0055	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0057	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	-	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0059	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0060	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0061	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0063**	-	-	Lac (-)	A/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0064**	-	-	Lac (+)	K/A	-	-	K/K	-	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0065**	-	-	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0066**	-	-	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0067	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0068	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0071	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	-	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0076	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0077	+	+	Lac (+)	K/A	-	-	K/K	-	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0078**	-	-	Lac (-)	A/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0079	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0080	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	-	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0081	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	-	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0082	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0083	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	-	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0084	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	-	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0085	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0086	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0088	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	-	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0089	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0090	+	+	Lac (+)	A/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0091**	-	-	Lac (-)	A/A	-	+	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0092	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0094	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0095	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	-	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0096	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/A	-	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*

***P0097**	-	-	Lac (-)	A/A	-	+	K/A	-	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0098	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0099**	-	-	Lac (-)	A/A	-	-	K/K	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
***P0100**	-	-	Lac (-)	A/A	-	+	K/A	+	+	+	-	-	-	*Escherichia coli*
P0101	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0102	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/A	-	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0103	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0104	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*
P0105	+	+	Lac (+)	A/A	-	+	K/K	+	+	-	-	-	-	*Escherichia coli*

***:** Cepas a las que se les realizó la amplificación del gen *uidA* por PCR para confirmar especie bacteriana.

+: Positivo; -: Negativo; Lac (+/-): Lactosa positiva/negativa; TSI: Agar hierro triple azúcar; A/A= ácido; K/K= básico; GAS: producción de gas; H_2S: ácido sulfhídrico; LIA: agar hierro lisina; M: movilidad; I: indol; O: ornitina; Cit: citrato; Urea; FA: fenilalanina;

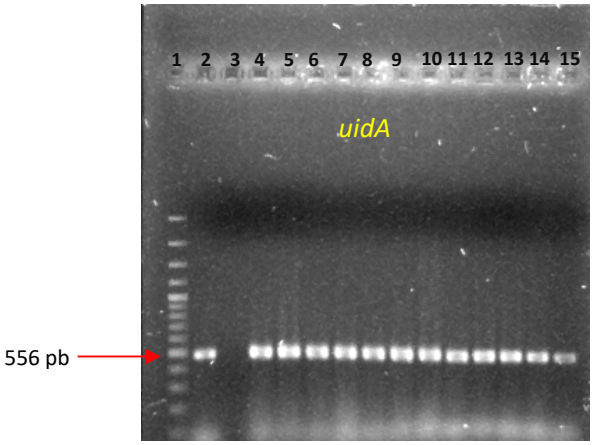


Figura 6. Amplificación del gen *uidA*. Carril 1: marcador, **2:** control positivo (C4433), **3:** control negativo, **4:** P007, **5**: P009, **6:** P0013, **7:** P0018, **8:** P0019, **9:** P0020, **10:** P0030, **11:** P0063, **12:** P0078, **13:** P0091, **14:** P0097, **15:** P0099

Objetivo 2. Determinar la sensibilidad a antimicrobianos y el fenotipo de la producción de β-lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en las cepas de *E. coli*.

A las 73 cepas de *Escherichia coli* se les determinó el perfil de resistencia por el método de Kirby-Baüer (Figura 7), como se explica en material y métodos.

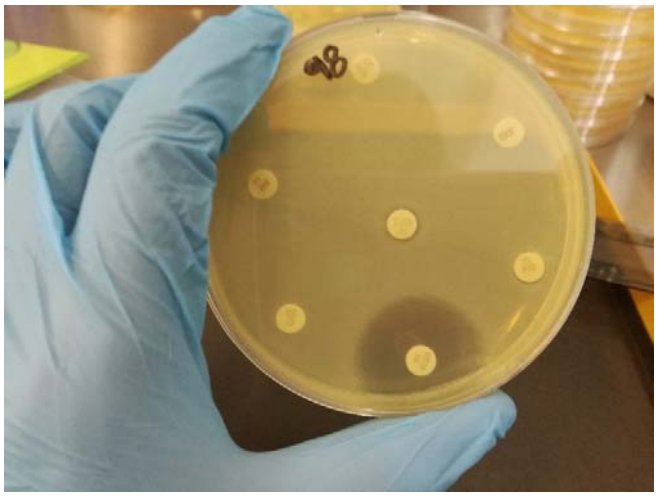


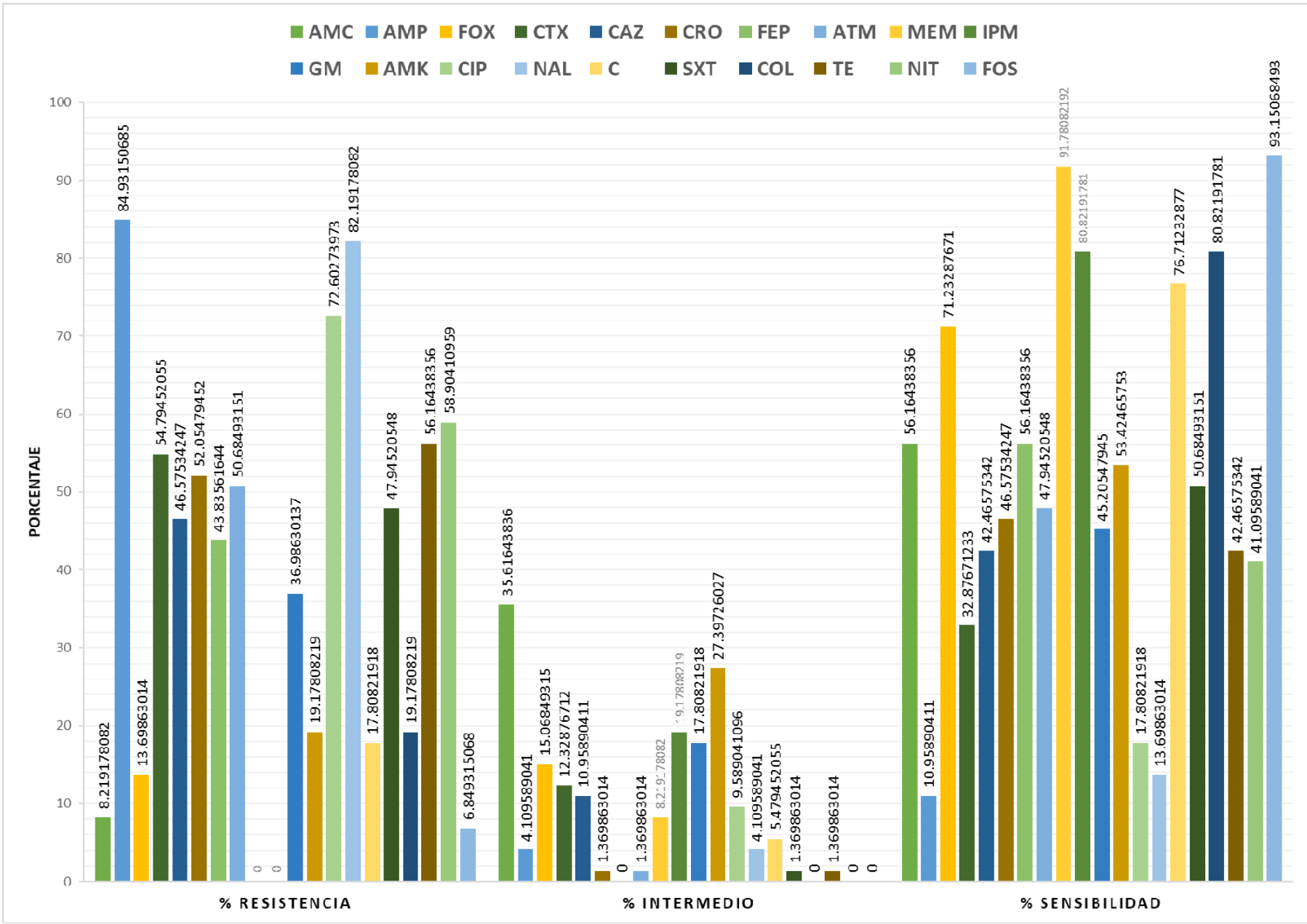
Figura 7. Determinación del perfil de resistencia por el método de Kirby-Baüer en una cepa de *E. coli* aislada de urocultivo proveniente de un paciente del ISSSTEP

Los niveles de resistencia a la familia de los β-lactámicos fueron altos principalmente para 4 antibióticos: AMP, CTX, CRO y ATM (84.9, 54.79, 52.0 y 50.6%, respectivamente); sin embargo, para CAZ, FEP y FOX fueron menores (46.5, 43.8 y 13.7%, respectivamente).

Se obtuvo una resistencia antibiótica elevada para la familia de las quinolonas, 71.2% a CIP y 82.1% a NAL. El porcentaje de resistencia a los aminoglucósidos GM y AMK fue de 36.9 y 19.1%, respectivamente. En cuanto a los antibióticos pertenecientes a otras familias, la resistencia fue de 58.9% para NIT, 56.1% para TE, 47.9% para SXT y 17.8% para C.

Los niveles de resistencia fueron bajos para AMC y FOS, 8.2 y 6.8%. Todas las cepas fueron sensibles a IMP y MEM.

Se observó que aproximadamente el 95.8% (70/73) de las cepas de *E. coli* provenientes del ISSSTEP presentaron multirresistencia (resistencia a 2 o más miembros de dos o más familias distintas de antibióticos) (Tabla 8, anexos) (Gráfica 3).


AMC
AMP
FOX
CTX
CAZ
CRO
FEP
ATM
MEM
IPM
GM
AMK
CIP
NAL
C
SXT
COL
TE
NIT
FOS
PORCENTAJE
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
8.219178082
84.93150685
13.69863014
54.79452055
46.57534247
52.05479452
43.83561644
50.68493151
0
0
36.98630137
19.17808219
72.60273973
82.19178082
17.80821918
47.94520548
19.17808219
56.16438356
58.90410959
6.849315068
35.61643836
4.109589041
15.06849315
12.32876712
10.95890411
1.369863014
0
1.369863014
8.219178082
19.17808219
17.80821918
27.39726027
9.589041096
4.109589041
5.479452055
1.369863014
0
1.369863014
0
0
56.16438356
10.95890411
71.23287671
32.87671233
42.46575342
46.57534247
56.16438356
47.94520548
91.78082192
80.82191781
45.20547945
53.42465753
17.80821918
13.69863014
76.71232877
50.68493151
80.82191781
42.46575342
41.09589041
93.15068493
% RESISTENCIA
% INTERMEDIO
% SENSIBILIDAD

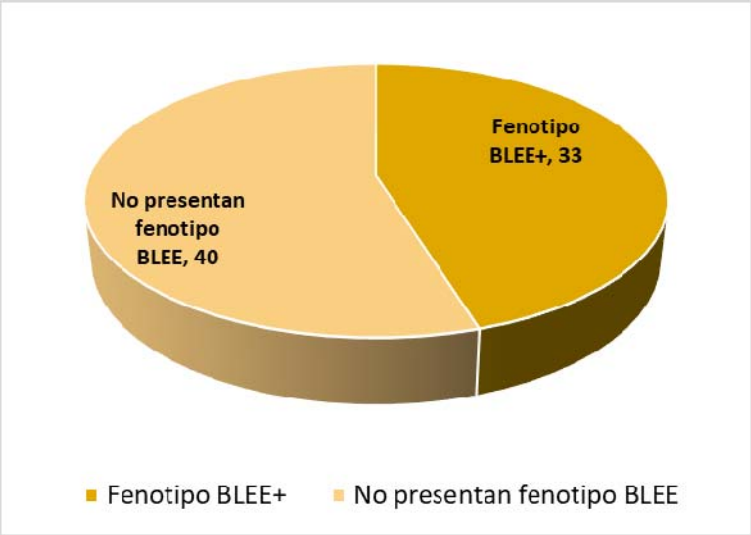
Gráfica 2. Perfil de susceptibilidad a los 20 antibióticos de diferentes familias en las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes del ISSSTEP. AMC: Amoxicilina con Ácido Clavulánico; AMP: Ampicilia; FOX: Cefoxitina; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; CRO: Ceftriaxona; FEP: Cefepime; ATM: Aztreonam; MEM: Meropenem; IPM: Imipenem; GM: Gentamicina; AMK: Amikacina; CIP: Ciprofloxacino; NAL: Ácido Nalidíxico; C: Cloranfenicol; SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol; COL: Colistina; TE: Tetraciclina; NIT: Nitrofurantoína; FOS: Fosfomicina.

Fenotipo BLEE

Al mismo tiempo en que se realizó la determinación de la susceptibilidad a los antibióticos (antibiogramas) se hizo la caracterización fenotípica de BLEE's a las 73 cepas de *E. coli*, por la técnica de difusión de doble disco, empleando los antibióticos AMC, CTX, CAZ, FEP y ATM (Figura 8).

Figura 8. Prueba de difusión de doble disco. Se observa el efecto sinérgico entre los β-lactámicos y el inhibidor de β-lactamasas, evidencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE

De las 73 cepas de *E. coli*, 32 (43.8%) presentaron el fenotipo de producción de BLEE (Gráfica 3), siendo 16 de estas (50%) positivas al sinergismo con los 4 antibióticos de la prueba. El porcentaje del efecto sinérgico fue de 65.6, 75, 81.2 Y 84.3% para CAZ, CTX, ATM y FEP, respectivamente (Gráfica 4).

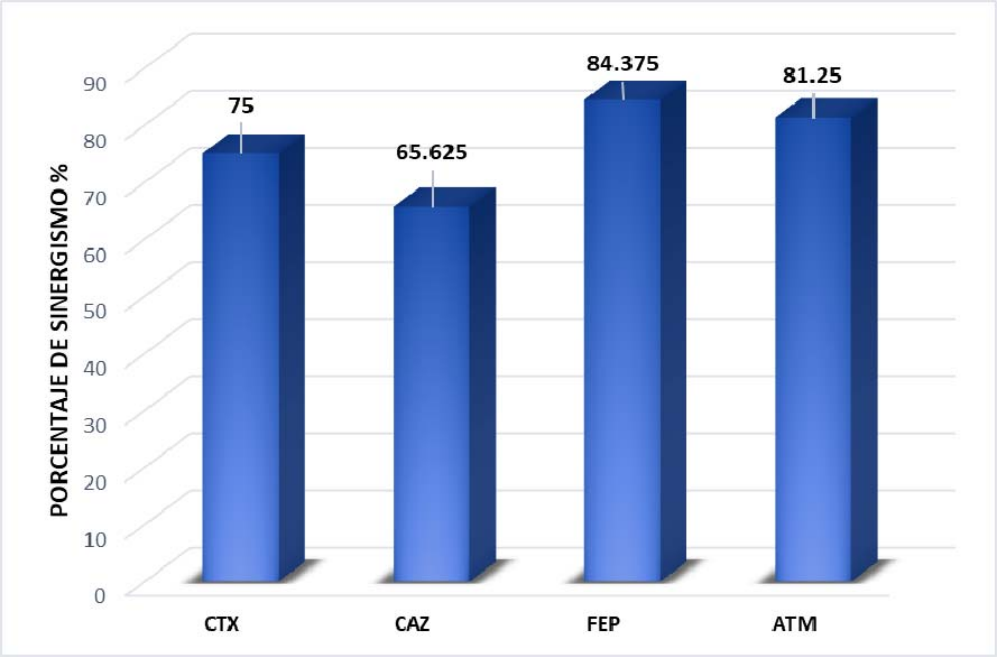


Gráfica 3. Resultados de Fenotipo BLEE en las 73 cepas de urocultivos de *E. coli*

Tabla 9. Cepas de urocultivos del ISSSTEP con efecto positivo (sinergismo) en la prueba de difusión con doble disco.

No. de cepa	Bacteria identificada	BLEEs
P-001	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM
P-007	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM
P-008	***Escherichia coli***	CAZ
P-009	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM
P-0012	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM
P-0017	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM
P-0025	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM
P-0028	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM
P-0031	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM
P-0035	***Escherichia coli***	CAZ, FEP, ATM
P-0036	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM
P-0037	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM
P-0039	***Escherichia coli***	CAZ, FEP, ATM
P-0040	***Escherichia coli***	CTX,ATM
P-0046	***Escherichia coli***	CTX,FEP,ATM
P-0055	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM
P-0059	***Escherichia coli***	CTX
P-0061	***Escherichia coli***	CTX,ATM
P-0063	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM

P-0066	***Escherichia coli***	CTX,FEP,ATM
P-0076	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM
P-0079	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM
P-0081	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM
P-0083	***Escherichia coli***	FEP
P-0084	***Escherichia coli***	FEP,ATM
P-0085	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,ATM
P-0086	***Escherichia coli***	FEP
P-0088	***Escherichia coli***	FEP
P-0094	***Escherichia coli***	CTX,CAZ,FEP,ATM
P-0095	***Escherichia coli***	CAZ,FEP
P-0096	***Escherichia coli***	CTX,FEP,ATM
P-0098	***Escherichia coli***	CTX,FEP,ATM



Gráfica 4. Porcentaje de efecto sinérgico de las 32 cepas de E. coli de urocultivos del ISSSTEP, a los antibióticos ensayados en la prueba de difusión con doble disco

Objetivo 3. Identificar genes que codifican la producción de BLEE tipo CTX-M, SHV, TEM, así como AmpC y OXA en los aislamientos de *E. coli.*

Se utilizó la técnica de PCR para amplificar los genes $bla_{CTX\text{-}M}$, bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{OXA}, $bla_{cmy\text{-}2}$, de las cepas que mostraron multirresistencia a los antibióticos β-lactámicos y fenotipo BLEE positivo, siendo un total de 32 reacciones para cada gen (Gráfica 5).

A continuación, se muestran amplificados de los genes codificantes para BLEE's en algunas cepas, se hizo el corrimiento de las muestras por electroforesis en geles de agarosa al 1%:

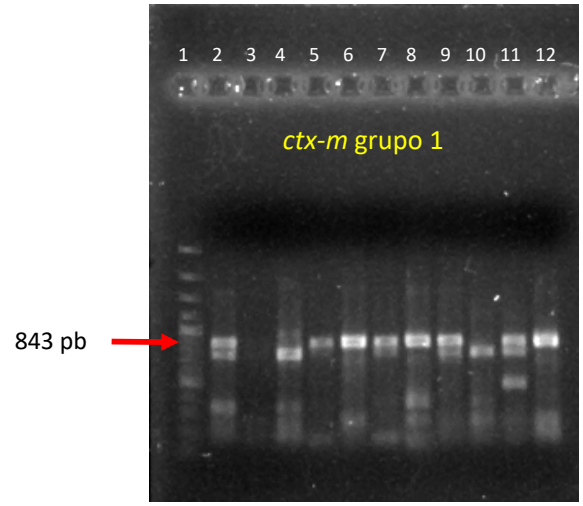


Figura 9. Amplificación del gen *ctx-m*. Carril 1: Marcador, **2:** Control positivo (C1550), **3:**Blanco, **4:**P001, **5:**P007, **6:**P008, **7:** P009, **8:**P0012, **9:**P0017, **10**:P0025, **11:**P0028, **12:**P0031

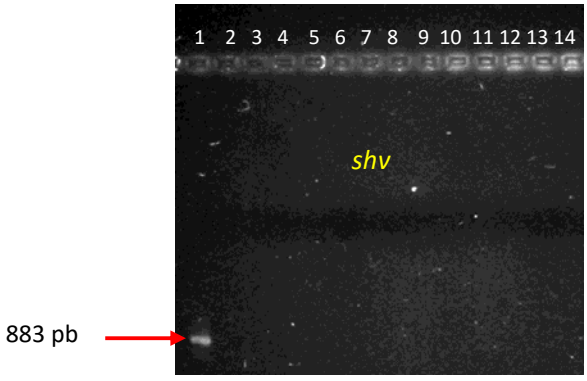


Figura 10. Amplificación del gen *shv*. Carril 1:Control positivo (C4430), **2:**Blanco, **3:** P001, **4:**P007, **5:**P008, **6:**P009, **7:** P0012, **8:**P0017, **9:**P0025, **10**:P0028, **11:**P0031, **12:**P0035

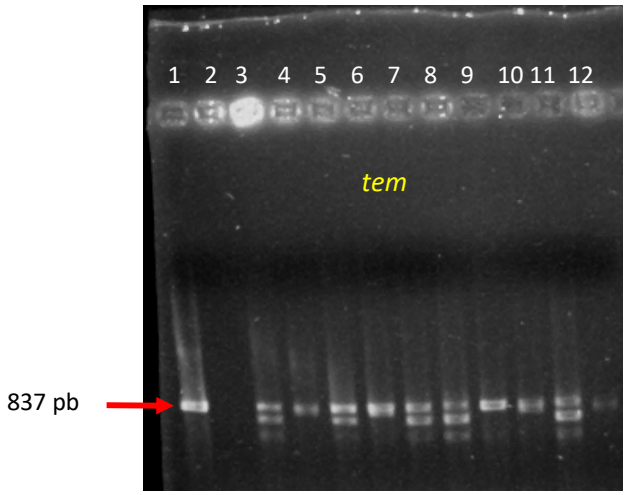


Figura 11. Amplificación del gen *tem*. Carril 1: Control positivo (C1550), **2:**Blanco, **3:** P0012, **4:**P0017, **5:**P0025, **6:**P0028, **7:** P0036, **8:**P0061, **9:**P0076, **10**:P0085, **11:**P0094, **12:**P0096

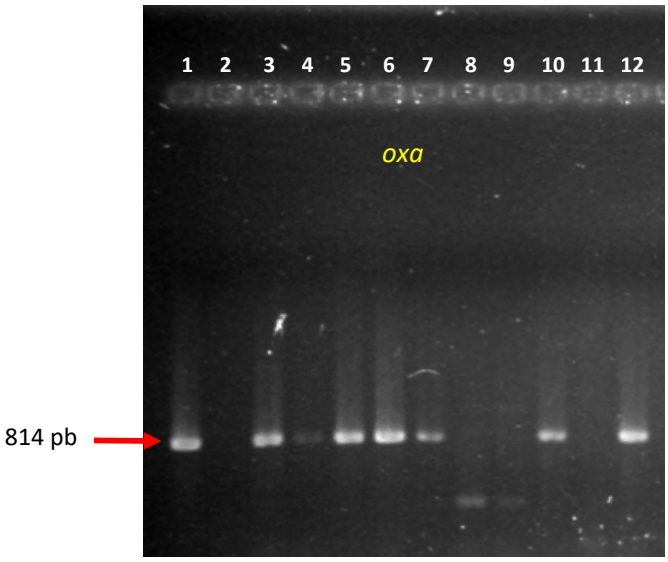
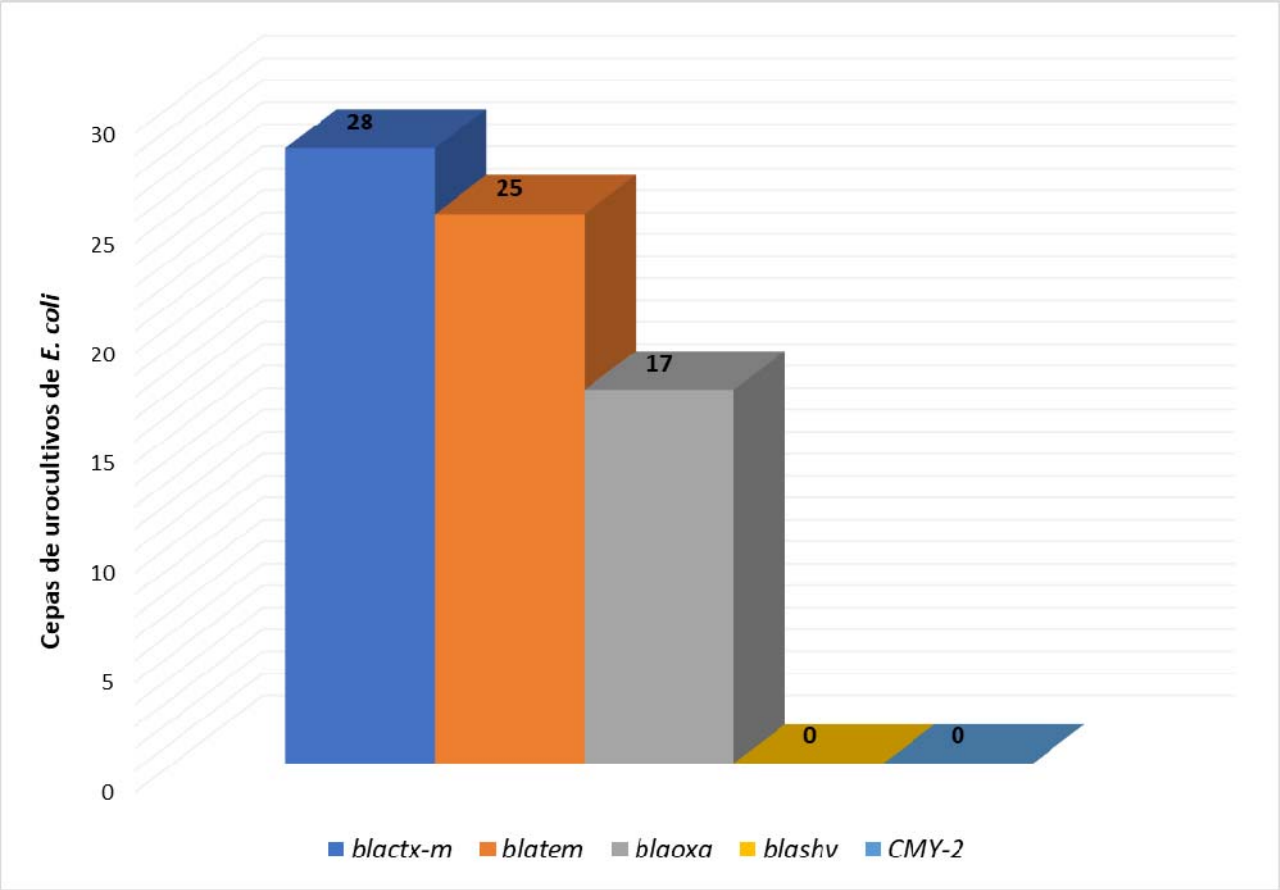


Figura 12. Amplificación del gen *oxa*. Carril 1:Control positivo (C1550), **2:**Blanco, **3:** P0031, **4:**P0035, **5:**P0036, **6:**P0037, **7:** P0039, **8:**P0040, **9:**P0046, **10**:P0055, **11:**P0059, **12:**P0061



Gráfica 5. Amplificación mediante PCR de los genes codificantes para BLEE´s, en las 32 cepas de urocultivos.

Objetivo 4. Identificar genes plasmídicos que codifican para resistencia a quinolonas: *qnrA, qnrB, aac(6´)-Ib-cr, oqxA, oqxB y qepA* en los aislamientos de *E. coli.*

Se utilizó la técnica de PCR para amplificar los genes *qnrA*, *qnrB*, *aac(6')-Ib-cr, oqxA*, *oqxB* y *qepA* de las cepas que mostraron multirresistencia a los antibióticos β-lactámicos y a las quinolonas, amplificando las mismas 32 cepas que para las BLEE.

A continuación, se muestran amplificados de los genes codificantes para quinolonas en algunas cepas, se hizo el corrimiento de las muestras por electroforesis en geles de agarosa al 1%:

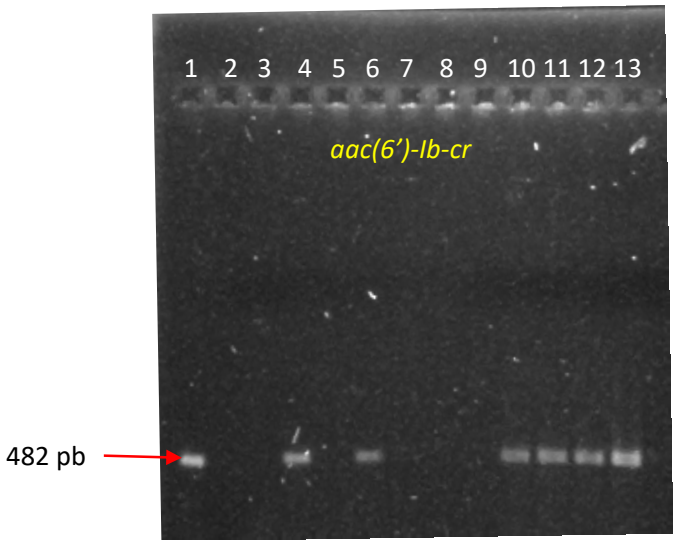


Figura 13. Amplificación del gen *aac(6')-Ib-cr.* **Carril 1**:Control positivo (C23), **2:**Blanco, **3:** P001, **4:**P007, **5:**P008, **6:**P009, **7:** P0012, **8:**P0017, **9:**P0040, **10**:P0025, **11:**P0035, **12:**P0036 **13:**P0037

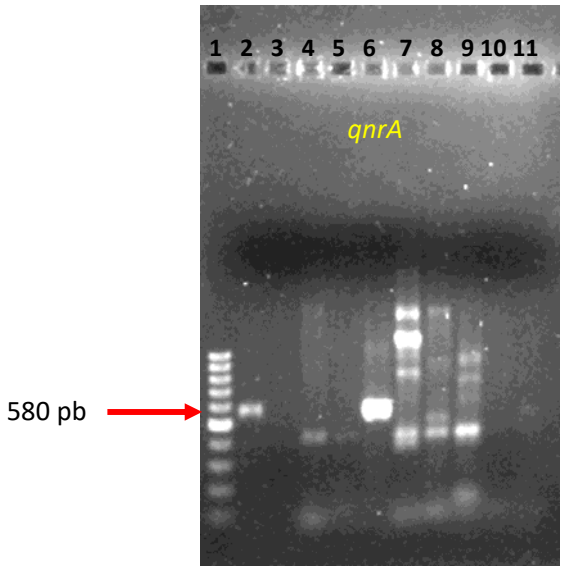


Figura 14. Amplificación del gen *qnrA*. Carril 1:Marcador, **2:** Control positivo, **3:** Blanco, **4:**P001, **5:**P007, **6:**P008, **7:** P0037, **8:**P0040, **9:**P0076, **10**:P0085, **11:**P0098

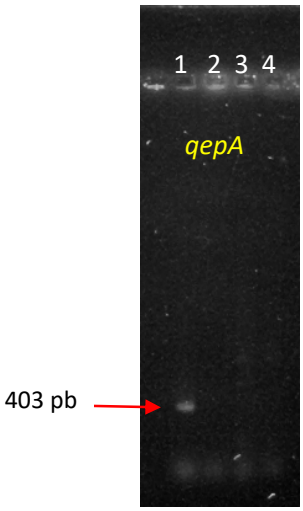
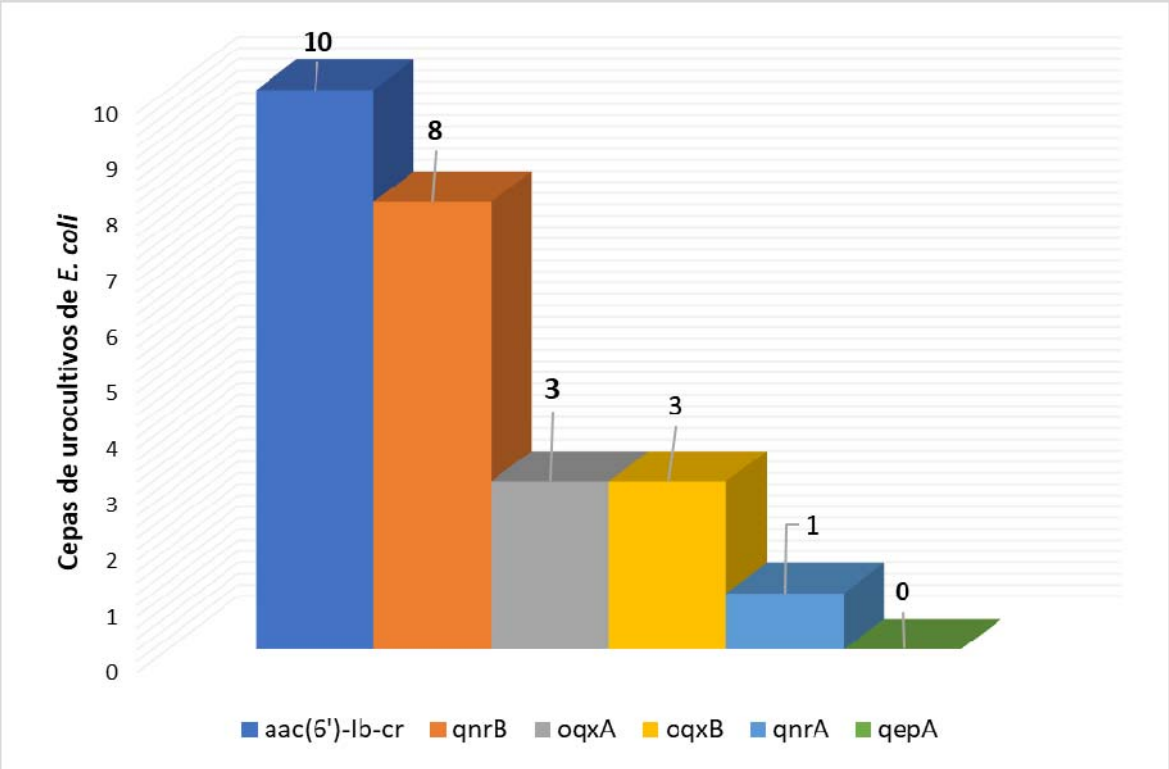


Figura 15. Amplificación del gen *qepA*. Carril 1:Control positivo (C1550), **2:**Blanco, **3:** P001, **4:**P0085



Gráfica 6. Amplificación mediante PCR de los genes PMQR, en las 32 cepas de urocultivos

11. DISCUSIÓN

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en un tema relevante debido a que, a nivel mundial, se reportan un gran número de casos de infecciones por microorganismos patógenos que sobreviven a la acción antibiótica; sin embargo, en nuestro país, la información epidemiológica sobre los casos de infecciones por bacterias multirresistentes es escasa.

En el presente trabajo se estudiaron algunos aspectos fenotípicos y genotípicos de 73 cepas de *E.coli* de pacientes del Hospital ISSSTEP, en la ciudad de Puebla, Puebla, México. Inicialmente se hizo la identificación para confirmar la especie bacteriana *E. coli*, debido a que es el principal patógeno responsable de las Infecciones de Vías Urinarias y el reservorio más frecuente de genes productores de BLEE y resistencia a quinolonas.

En este estudio se reportó mayor prevalencia de IVU's en mujeres que en hombres; no obstante, para ambos grupos el rango de edad más reportado fue de 60 a 80 años. Estudios previos, como el de Paniagua-Contreras, *et al*. en el 2015, mostraron que un 97% de las cepas expresaban un fenotipo multidrogo-resistente (MDR); mientras que Ramírez-Castillo, *et al.* en 2018, mostraron que el 63% de los aislados era MDR. En este estudio se determinó que el 90.4% de las cepas de urocultivos presentaron el fenotipo MDR. Es importante saber que la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos puede cambiar según el área geográfica y el cuadro de tratamiento que cada hospital maneje.

70 de los 73 cepas (95.9%) crecieron en el medio de cultivo EMB-Levine adicionado con Cefotaxima (2 μg/mL), siendo un primer screening para determinar las posibles cepas multi-resistentes.

El perfil de resistencia de las 73 cepas resultó elevado principalmente para las familias de los β-lactámicos y las quinolonas. La resistencia a los β-lactámicos se encontró por arriba del 40% (excepto FOX), y en el caso de la Ampicilina fue de aproximadamente el 85%. Para las quinolonas y la nitrofurantoína, los niveles de resistencia se encontraron por arriba del 70 y 58%, respectivamente. Con esto se demuestra un porcentaje significativo de resistencia a los antibióticos que forman parte del esquema básico de tratamiento en los hospitales de México. Aunado a esto, se encontró que 33 de las 73 cepas presentaron un fenotipo BLEE positivo; no obstante, una de estas cepas resultó susceptible a las quinolonas, por lo que no fue tomada en cuenta para la búsqueda de los genes de resistencia debido a que no cumple con el objetivo de este estudio, que es: cepas con fenotipo BLEE positivo y resistencia a quinolonas.

Estos datos llaman la atención si tomamos en cuenta que se trata de muestras de pacientes hospitalizados e inmunocomprometidos, por lo que se vuelven más susceptibles a contraer infecciones causadas por bacterias capaces de adquirir fácilmente los genes de resistencia presentes en el medio.

Para confirmar los resultados anteriores, se hizo la detección genotípica de betalactamasas de tipo CTX-M, TEM, SHV, OXA y CMY-2 en los 32 aislados de *E.*

coli con fenotipo BLEE positivo. Se encontró que 28 de las cepas amplificaron el gen bla_{CTX-M}, 25 el gen bla_{TEM} y 17 el gen $bla_{OXA.}$ También fueron detectados los genes plasmídicos de resistencia a quinolonas: *aac(6')-Ib-cr, qnrA, qnrB, qepA, oqxA* y *oqxB*. Al igual que en un estudio previo, de Silva-Sánchez et al. en 2013, en este estudio se encontró que el gen plasmídico de resistencia a quinolonas más común entre los aislados del ISSSTEP fue el de la *aac(6')-Ib-cr*, presente en 10 de las cepas. Le siguen los genes *qnrB, oqxA* y *oqxB* presentes en 8, 3 y 3 de las cepas, respectivamente. El gen *qepA* no fue identificado en las cepas del presente estudio. Se encontró que una de las cepas amplificó el gen *qnrA*; sin embargo, este dato tendrá que ser corroborado mediante la secuenciación.

Se observó una asociación entre los genes *aac(6')-Ib-cr* , bla_{CTX-M} y bla_{OXA}, ya que las cepas que expresaron los genes de betalactamasas bla_{CTX-M} y bla_{OXA} también amplificaron el gen que codifica para la acetilasa Aa(6')-Ib-cr; además, siete de estas cepas también tuvieron la betalactamasa TEM.

12. CONCLUSIONES

- Se logró identificar y caracterizar cepas de *E. coli* multidrogo-resistentes y productoras de BLEE en aislados de urocultivos de pacientes con infecciones urinarias del Hospital ISSSTEP, en la ciudad de Puebla, Puebla, México.
- Por la técnica de Kirby-Baüer se encontró que más del 40% de las cepas aisladas de urocultivos fueron resistentes a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación.
- Más del 90% de las cepas de urocultivo incluidas en este estudio mostraron multidrogo-resistencia.
- La producción del fenotipo de BLEE fue del 43.8% (32/73).
- Con base en los resultados de la PCR, el gen $bla_{CTX\text{-}M}$ del grupo 1 fue el más prevalente en las cepas de urocultivos (87.5%), advirtiendo la presencia de alguna cefotaximasa. También se obtuvieron amplificados para los genes que codifican betalactamasas de tipo TEM (78.1%) y OXA (53.1%).
- Existe una asociación entre los genes de resistencia a β-lactámicos y a quinolonas, ya que se demostró la presencia de los genes plasmídicos $bla_{CTX\text{-}M}$ y *aac(6')-Ib-cr* en algunas cepas de urocultivos con fenotipo de BLEE.
- En este estudio se encontró que las cepas de *E. coli* aisladas de urocultivos poseen genes plasmídicos de resistencia a quinolonas como *aac(6')-Ib-cr, qnrB, oqxA* y oqxB. Los más frecuentes fueron aac(6')-Ib-cr encontrado en un 31.25% de las cepas, qnrB en 25% de las cepas, oqxA y oqxB en 9.3% de las cepas.

PERSPECTIVAS

- Confirmar mediante la secuenciación del gen completo la presencia de los genes que codifican la producción de β-lactamasas: CTX-M, TEM y OXA, en las cepas de *E. coli* más relevantes.
- Secuenciar el gen plasmídico de resistencia a quinolonas *aac(6')-Ib-cr* mediante la secuencia del gen completo en las cepas de *E. coli.*
- Secuenciar los genes plasmídicos de resistencia a quinolonas *qnrA*, *qnrB, oqxA* y *oqxB* mediante la secuencia del gen completo en las cepas de *E. coli*.
- Buscar genes filogenéticos y algunos genes de virulencia específicos de *E. coli*, mediante PCR.

ANEXOS

1) Pruebas parala identificación bioquímica de *Escherichia coli.*

Criterios de Cowan &Steel para *E. coli*

Criterios	Resultados
Forma	Bacilar
Crecimiento aerobio	+
Crecimiento anaerobio	+
Movilidad	+/-
Catalasa	+
Oxidasa	-
Fermentación de glucosa	+
Producción de ácido a partir de glucosa	+

2) Fundamento de pruebas bioquímicas

Agar Hierro Triple Azúcar (TSI)

Es un medio de cultivo empleado para la identificación y diferenciación de bacterias con base en la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y la producción de gas y/o ácido sulfhídrico. En este medio el rojo de fenol es el indicador de pH, por fermentación de azúcares se producen ácidos que se detectan por medio del indicador, el cual vira a color amarillo en medio ácido.

Para identificar a *E. coli*, un cambio de color a rojo en la superficie y amarillo en el fondo se considera como una prueba ‘’Alcalino/Ácido’’, lo que significa únicamente la fermentación de glucosa; un cambio en todo el tubo a amarillo ‘’Ácido/Ácido’’ se considera como la fermentación de glucosa y lactosa; y por último el tubo de color rojo o sin cambio de color se considera como la ausencia de fermentación de glucosa y lactosa ‘’Alcalino/Alcalino’’. La producción de gas se observa cuando se forman burbujas en el medio, ya sea en el fondo o a la mitad del tubo. La

producción de Ácido Sulfhídrico (SH_2) se observa con la pigmentación de color negro del medio.

Agar de Hierro y Lisina (LIA)

Medio de cultivo utilizado para diferenciar microorganismos con base en la descarboxilación/desaminación de la lisina y en la producción de ácido sulfhídrico. En este medio la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo de la bacteria, la glucosa es el carbohidrato fermentable y la lisina el sustrato utilizado para detectar la presencia de enzimas descarboxilasa y desaminasa. El púrpura de bromocresol es el indicador de pH, el cual es amarillo a pH igual o menor a 2.5 y color violeta a pH mayor o igual a 6.8.

En *E. coli* prueba es positiva a la descarboxilación de la lisina si el pico de flauta es púrpura y el extremo inferior también es púrpura con SH_2 o sin él; el resultado es negativo cuando se produce un color amarillo o no se observa un cambio de coloración del medio. La diseminación de lisina se consideró como un pico de flauta rojo y el extremo inferior del tubo amarillo, una prueba negativa no genera el color rojo en el pico de flauta. La producción positiva de SH2 se observa cuando se produce un cambio de color negro en el fondo del tubo

Movilidad Indol Ornitina (MIO)

Medio usado para la identificación de enterobacterias con base en su movilidad, producción de indol y actividad descarboxilasa de ornitina. Es un medio de cultivo semisólido, color púrpura transparente a ligeramente opalescente. La dextrosa es el hidrato de carbono fermentable, la ornitina es el sustrato para la detección de la enzima ornitina descarboxilasa y el púrpura de bromocresol es el indicador de pH

En *E. coli* la movilidad se considera positiva la migración del crecimiento desde la línea de siembra y difusión del medio, lo que produce turbidez en medio del tubo, un resultado negativo refleja un crecimiento únicamente a lo largo de la línea de siembra; la prueba de indol se realiza agregando 3 gotas del reactivo de Kovac's al tubo con la prueba, la formación de un anillo rojo en la superficie del medio indica un resultado positivo, si no se observa dicho anillo rojo el resultado es

negativo; la lectura de la ornitina descarboxilasa se realiza visualizando un color púrpura oscuro, la descarboxilación negativa muestra un cambio de coloración del medio a amarillo.

Agar Citrato

Medio de cultivo utilizado para la identificación de enterobacterias con base en la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía. El medio preparado tiene un color verde.

El metabolismo del citrato se realiza en aquellas bacterias que poseen la enzima citrato permeasa, a través del ciclo de tricarboxílicos, el desdoblamiento del citrato progresivamente a oxalacetato y piruvato. Este último en presencia de un medio alcalino da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos y entonces el medio vira a un color azul y es el indicativo de la citrato permeasa (MacFaddin, 2003).

La lectura de esta prueba es positiva si en la superficie del medio se observa crecimiento del microorganismo y un cambio a color azul intenso; *E. coli* la prueba de citrato debe ser negativa y esto es que no se presenta ningún cambio de coloración del medio.

Agar Urea

Medio utilizado para diferenciar microorganismos con base en la actividad de la enzima ureasa. Principalmente se utiliza para la identificación de bacterias que hidrolizan la urea como *Proteus spp.* o estafilococos.

Un resultado positivo es la generación de un color rosa-rojo intenso en el pico de flauta y/o en el interior del agar, resultado de la producción de la enzima ureasa; un resultado negativo no genera cambio de color. *E. coli* resulta negativa a esta prueba.

Agar Fenilalanina

Medio de cultivo utilizado para identificar a *Morganella morgani* y *Proteus spp*., con base en la presencia de la enzima fenilalanina desaminasa.

En este medio el aminoácido fenilalanina sufre desaminación oxidativa catalizada por la enzima fenilalanina desaminasa. Para la lectura se agregan 3gotas de reactivo para fenilalanina desaminasa, como resultado positivo se observa la formación de un color verdoso en la superficie del medio, una prueba negativa no presenta cambio de color.

Tabla 8. Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de urocultivos de *E. coli*

	INHIBIDOR	BETALACTÁMICOS									AMINOGLUCÓSIDOS		QUINOLONAS						
No. de cepa	AMC	AMP	FOX	CTX	CAZ	CRO	FEP	ATM	MEM	IPM	GM	AMK	CIP	NAL	C	SXT	COL	TE	NIT	FOS
P-001	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S
P-004	I	R	I	S	S	S	SDD	S	S	I	I	I	R	R	S	S	S	R	R	S
P-007	I	R	S	R	R	R	R	R	S	I	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S
P-008	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R	S
P-009	I	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	I	R	R	R	R	S	R	S	S
P-0010	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	S
P-0012	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S
P-0013	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	R	S
P-0016	I	R	S	R	I	S	SDD	S	S	S	S	S	S	I	S	R	S	R	R	S
P-0017	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	S	I	R	R	S	S	R	S	S	S
P-0018	I	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S
P-0019	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S
P-0020	I	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S
P-0022	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S
P-0024	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	R	R	S
P-0025	I	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	R	R	S	S	S	S
P-0026	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	I	R	R	S	S	S	R	R	S
P-0028	S	R	S	R	I	S	SDD	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
P-0030	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S
P-0031	I	R	S	R	I	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S
P-0033	S	R	I	I	I	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S
P-0034	S	I	S	S	S	S	S	S	I	I	S	I	S	S	S	S	R	S	R	S
P-0035	I	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S
P-0036	I	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S
P-0037	I	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R	I	R	R	S	S	S	R	S	S
P-0039	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R
P-0040	S	R	S	R	I	R	SDD	R	S	S	R	S	I	R	S	R	S	R	S	S
P-0042	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
P-0043	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S
P-0044	S	R	S	S	S	S	S	S	I	I	R	I	I	R	S	R	R	R	R	S
P-0046	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	I	S	S	R	R	R	S	R	R	R
P-0049	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	R	S	R	R	S
P-0052	I	R	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	S
P-0055	I	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	I	R	S	R	R	S
P-0057	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
P-0059	S	R	I	R	S	R	SDD	S	I	I	R	I	R	R	S	R	S	R	R	R
P-0060	I	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
P-0061	I	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	S	S	S	S	S	S
P-0063	S	R	S	R	R	R	R	R	I	I	I	I	R	R	S	S	S	R	S	S
P-0064	S	R	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
P-0065	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S
P-0066	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	I	R	R	R	S	S	S	S	R	S
P-0067	I	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S
P-0068	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	S
P-0071	R	R	R	R	R	R	SDD	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S
P-0076	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	S	S	S	S	S
P-0077	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	I	S	S	S	S	R	S
P-0078	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
P-0079	S	R	I	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
P-0080	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
P-0081	S	R	S	R	I	R	SDD	I	S	S	I	I	I	R	I	R	R	S	S	S
P-0082	I	R	I	S	S	S	S	S	S	S	I	I	R	R	S	S	R	R	S	S
P-0083	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S
P-0084	I	R	I	R	R	R	R	R	S	S	I	S	R	R	S	S	S	R	S	R
P-0085	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	I	R	R	R	S	S	R	S	S
P-0086	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	I	R	R	R	S	R	S	S	S	S
P-0088	I	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	R	R	S	R	R	R	R	S
P-0089	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	S	R	R	S	R	S	R	S	S
P-0090	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	I	I	R	S	S	R	S	R	S
P-0091	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	S
P-0092	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
P-0094	I	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S
P-0095	I	R	I	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S
P-0096	S	R	I	R	R	R	SDD	R	S	S	S	R	R	R	I	S	R	I	S	S
P0097	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	S
P-0098	S	R	S	R	R	R	R	R	S	I	R	I	R	R	R	R	S	R	S	S
P-0099	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
P-0100	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	S
P-0101	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	R	R	R	S
P-0102	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	S
P-0103	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
P-0104	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	R	S
P-0105	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	R	R	S	R	S	S	S	S

S: Sensible, SDD: Sensible dependiente de dosis, I: Intermedio, R: Resistente

Tabla 10. Amplificación de los genes que codifican para la producción de BLEE's en los aislados de urocultivos del ISSSTE

Cepa	*bla*$_{CTX-M}$ grupo 1	*bla*$_{TEM}$	*bla*$_{OXA}$	*bla*$_{SHV}$	*bla*$_{CMY-2}$
P-001	-	+	+	-	-
P-007	+	-	+	-	-
P-008	+	+	-	-	-
P-009	+	-	+	-	-
P-0012	+	+	-	-	-
P-0017	+	+	+	-	-
P-0025	-	+	+	-	-
P-0028	+	+	+	-	-
P-0031	+	+	+	-	-
P-0035	+	+	+	-	-
P-0036	+	+	+	-	-
P-0037	+	+	+	-	-
P-0039	+	-	+	-	-
P-0040	+	+	-	-	-
P-0046	+	-	-	-	-
P-0055	+	+	+	-	-
P-0059	-	+	-	-	-
P-0061	+	+	+	-	-
P-0063	+	-	-	-	-
P-0066	+	-	-	-	-
P-0076	+	+	-	-	-
P-0079	+	+	-	-	-
P-0081	+	-	-	-	-
P-0083	+	+	+	-	-
P-0084	+	+	-	-	-
P-0085	+	+	+	-	-
P-0086	+	+	+	-	-
P-0088	+	+	-	-	-
P-0094	+	+	+	-	-
P-0095	+	+	-	-	-
P-0096	-	+	-	-	-
P-0098	+	+	-	-	-

+ : Amplificación del gen - : No amplificó el gen

Tabla 11. Amplificación de los genes de resistencia a quinolonas en los aislados de urocultivos del ISSSTEP

Cepa	acc(6')	qepA	qnrA	qnrB	oqxA	oqxB
P-001	-	-	-	+	+	-
P-007	+	-	-	-	-	-
P-008	-	-	+	+	-	-
P-009	+	-	-	-	-	-
P-0012	-	-	-	-	-	-
P-0017	-	-	-	-	-	-
P-0025	+	-	-	-	-	-
P-0028	-	-	-	+	-	-
P-0031	-	-	-	-	-	-
P-0035	+	-	-	-	-	+
P-0036	+	-	-	-	-	-
P-0037	+	-	-	+	-	-
P-0039	+	-	-	-	-	+
P-0040	-	-	-	+	-	+
P-0046	-	-	-	-	-	-
P-0055	+	-	-	-	-	-
P-0059	-	-	-	-	-	-
P-0061	-	-	-	-	-	-
P-0063	-	-	-	-	-	-
P-0066	-	-	-	-	-	-
P-0076	-	-	-	-	-	-
P-0079	-	-	-	-	-	-
P-0081	-	-	-	+	-	-
P-0083	-	-	-	-	-	-
P-0084	-	-	-	-	-	-
P-0085	-	-	-	-	-	-
P-0086	+	-	-	-	-	-
P-0088	-	-	-	-	-	-
P-0094	+	-	-	+	+	-
P-0095	-	-	-	-	+	-
P-0096	-	-	-	-	-	-
P-0098	-	-	-	+	-	-

+ : Amplificación del gen - : No amplificó el gen

13. BIBLIOGRAFÍA

- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry* 53 (10), 1565-1574
- Bartoletti, R., Cai, T., Wagenlehner, F., & Naber, K. (2016). Treatment of Urinary Tract Infections and Antibiotic Stewardship. *European Urology Supplements*, 15, 81-87
- Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., & Piddock, L.J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature*. 13, 42-51.
- Bonomo, R. A. (2017). β-Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7: a025239.
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(8), a025247.
- Calvo, J. & Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(1): 44–52
- Cortés, G.; (2012). Caracterización de la resistencia a β-lactámicos y Quinolonas en aislamientos de muestras clínicas.
- Cortés, G.; (2016). Caracterización de la resistencia antimicrobiana y tipificación molecular de cepas de *Escherichia* coli aisladas de diferentes hospederos en Puebla, México.
- Cué, M. & Morejón, M. (1998). Antibacterianos de Acción Sistémica. Parte I. Antibióticos Betalactámicos. *Rev Cubana Med Gen Integr*, 14(4): 347-61.
- Dalhoff, A. (2012). Resistance surveillance studies: a multifaceted problem—the fluoroquinolone example. *Springer*, 40, 239-242.
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J., & Zhao, X. (2008). Quinolone-Mediated Bacterial Death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 385-392.

- Falagas, M.E., & Karageorgopoulos, D.E. (2009). Extended-spectrum β-lactamase-producing organisms. *Journal of Hospital Infection*, 73, 345-354
- Flores, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiology*, 13(5), 269–284
- Garza-Ramos U. et al. (2007). SHV-type Extended-spectrum β-lactamase (ESBL) are encoded in related plasmids from enterobacteria Clinical isolates from Mexico. *Salud Pública de México*. 49:415-421
- Hernández, J.A., Martínez, V. I., Radilla, R. B., Silva, J., Vences, A., & Castro, N. (2016). Characterization of *Escherichia coli* clinical isolates causing urinary tract infections in the community of Chilpancingo, Mexico. *International Microbiology,* 19, 209-215
- Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2016). Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(9), a025320.
- Kim, H.B., Wang, M., Park, C.H., Kim, E., Jacoby, G.A., & Hooper, D.C. (2009). *oqxAB* Encoding Multidrug Efflux Pump in Human Clinical Isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), p.3582-3584.
- Köves, B. & Wullt, B. (2016). The Roles of the Host and the Pathogens in the Urinary Tract Infections. *European Urology Supplements*, 15, 88-94.
- Levine, C., Hiasa, H., & Marians, K.J. (1998). DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochimica et Biophysica Acta Elsevier*, 1400, 29-43.
- Mazen S. Bader, Mark Loeb & Annie A. Brooks (2016). An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance, Postgraduate Medicine

- Paniagua-Contreras GL, *et al*., (2015) Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* (2015).
- Rahman,S., Ali, T., Ali, I., Khan N.A., Han B., & Gao, J. (2018). The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *BioMed Research International*, 2018, 14 pages.
- Ramírez-Castillo, FY., Moreno-Flores, AC., Avelar-González, FJ., Márquez-Díaz, F., Harel, J., & Guerrero-Barrera, AL. (2018). An evaluation of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates in urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico: cross-sectional study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 17(34), 1-13.
- Rocha-Gracia, R., Ruiz, E., Romero-Romero, S., Lozano-Zarain, P., Somalo, S., Palacios, JM., Caballero, P., & Torres, C. (2010). Detection of the plasmid-borne quinolone resistance determinant *qepA1* in a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strain from Mexico. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1-3.
- Rodríguez-Baño J., Gutiérrez-Gutiérrez B., Machuca I., Pascual A. (2018). Treatment of infections caused by extended-spectrum-betalactamase-, AmpC-, and carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* 31: e00079-17
- Romero-Romero, S. (2010). Tesis de Licenciatura. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos β-lactámicos mediada por β-lactamasas de Espectro Extendido en cepas de enterobacterias aisladas de distintos nichos ecológicos. CICM-ICUAP. BUAP.
- Salah, F.D., Soubeiga, S.T., Ouattara, A.K. et al. (2019). *Antimicrob Resist Infect Control* 8: 104.

- Seyedjavadi, S.S., Gourdarzi, M., & Sabzehali, F. (2016). Relation between *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$ and *bla*$_{CTX-M}$ genes and acute urinary tract infections. *Journal of Acute Disease*, 5(1), 71-76.
- Silva-Sánchez J, Cruz-Trujillo E, Barrios H, Reyna-Flores F, Sánchez-Pérez A, *et al*. (2013) Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Genes in Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Pediatric Clinical Isolates in Mexico. *PLoS ONE* 8(10):e77968.
- Smelov, V., Naber, K., & Bjerklund T. E. (2016). Improved Classification of Urinary Tract Infection: Future Considerations. *European Urology Supplements*, 15, 71-80
- Suárez, C. & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(2), 116-129
- Terlizzi ME., Gribaudo, G. and Maffei ME. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front. Microbiol*.8: 1566.
- Wang, J. C., Berger, J. M., Gamblin, S. J., & Harrison, S. C. (1996). Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature,* 379, 225-232.