



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Caracterización molecular y detección de genes de resistencia bacteriana de *Escherichia coli*, aisladas de muestras clínicas en pacientes con infecciones del tracto urinario en Hospitales de la ciudad de Loja-Ecuador.

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Carrillo Sarmiento, Diana Carolina

DIRECTOR: Baculima Peña, Daysi Eliana, Mg.

CO- DIRECTOR: Costoya Seco, Liliana, PhD.

LOJA- ECUADOR

2015

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Mg.

Daysi Eliana Baculima Peña

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **“Caracterización molecular y detección de genes de resistencia bacteriana de *Escherichia coli*, aisladas de muestras clínicas en pacientes con infecciones del tracto urinario en Hospitales de la ciudad de Loja-Ecuador.”** realizado por **Carrillo Sarmiento Diana Carolina** ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2015

f)

Mg. Daysi Eliana Baculima Peña.

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo **Carrillo Sarmiento Diana Carolina** declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “**Caracterización molecular y detección de genes de resistencia bacteriana de *Escherichia coli*, aisladas de muestras clínicas en pacientes con infecciones del tracto urinario en Hospitales de la ciudad de Loja-Ecuador.**”, del Título **Bioquímico Farmacéutico**, siendo **Mg. Daysi Eliana Baculima Peña** directora y **Liliana Costoya Seco** co-directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f.
Diana Carolina Carrillo Sarmiento
C.I: 1105674988

DEDICATORIA

Este logro lleno de sacrificio, esfuerzo, tristezas, alegrías y sobre todo lleno de amor y pasión por un compromiso quiero dedicarlo primeramente a Dios, por ser mi guía, mi infalible amigo y único testigo de mi lucha diaria.

A mi pilar esencial, mis padres René y Cecilia; en especial a mi madre porque sé que parte de sus sueños se cumplen hoy, junto con los míos.

Y a usted que siempre está junto a mí, a pesar de su ausencia siento la alegría mutua de este logro.

Diana Carolina.

AGRADECIMIENTO

Un pensamiento de gratitud hacia el cielo, a mi Dios por darme la sabiduría y la fortaleza necesaria para emprender este largo camino del conocimiento y junto a él a mis ángeles más preciados por saber interceder por mí y llenarme de incalculables bendiciones en los momentos difíciles de mi vida.

A mis padres, hermano y a él, por creer en mí y brindarme todo el apoyo y vigor necesarios para continuar aun cuando creía que parte de mis sueños jamás se cumplirían.

A Nathaly, Johana y Andrea, por brindarme su amistad incondicional y hacer que todo sea posible para todas. Gracias por ser parte de mi equipo de trabajo hasta el final!

Por último, mi más sincero agradecimiento a cada una de las personas que supieron compartir sus conocimientos y experiencias a lo largo de toda mi carrera, en especial a mi directora de tesis Mg. Eliana Baculima y co-directora PhD. Liliana Costoya Seco, por toda la confianza, el tiempo, paciencia y dedicación con la que tutelaron mi presente trabajo de investigación.

Diana Carolina.

“No hay secretos para el éxito.

Este se alcanza preparándose,

Trabajando arduamente y

Aprendiendo del fracaso”.

Collin Powell

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	I
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I.....	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1 Escherichia coli	6
1.1.1 Características generales.	6
1.1.2 Clasificación Filogenética.....	7
1.1.3 Patotipos.....	7
1.1.3.1 <i>Escherichia coli</i> diarreagénicas (DEC).....	7
1.1.3.1.1 Lesión A/E.	8
1.1.3.1.1.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatógenicas (EPEC).....	8
1.1.3.1.1.2 <i>Escherichia coli</i> verotoxigénicas (VTEC).....	8
1.1.3.1.2 Sin lesión A/E.	9
1.1.3.1.2.1 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénicas (ETEC).....	9
1.1.3.1.2.2 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasivas (EIEC).....	9
1.1.3.1.2.3 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	9
1.1.3.1.2.4 <i>Escherichia coli</i> con adherencia difusa (DAEC).	10
1.1.3.2 <i>Escherichia coli</i> extraintestinales (ExPEC).....	10
1.1.3.2.1 <i>Escherichia coli</i> uropatógenicas (UPEC).....	10
1.1.3.2.2 <i>Escherichia coli</i> meningitis neonatal (NMEC).....	10
1.1.3.2.3 <i>Escherichia coli</i> patógenas aviares (APEC).	10
1.1.3.3 <i>Escherichia coli</i> comensales.	11
1.2. Escherichia coli uropatógenicas	11
1.2.1 Características Generales.....	11
1.2.1.1 Patogenia.	11
1.2.1.2 Incidencia y Prevalencia.	12
1.2.1.3 Estatus ExPEC.	13

1.2.1.4 Factores de Virulencia expuestos por UPEC	13
1.2.1.4.1 <i>Factores de Virulencia de Superficie</i>	14
1.2.1.4.2 <i>Factores de virulencia producidos dentro de la célula</i>	15
1.2.1.5 Epidemiología	16
1.2.2 <i>Escherichia coli</i> uropatogénica (UPEC) en Ecuador	17
1.3 Resistencia Bacteriana	17
1.3.1 Antibióticos de uso en UTIs.....	19
1.3.2 Mecanismos de Resistencia de <i>E. coli</i>	19
1.3.3 Genes de Resistencia Antibiótica de <i>E. coli</i>	20
CAPÍTULO II.....	22
METODOLOGÍA.....	22
2.1. Material de estudio	23
2.2 Cultivo para el aislamiento de cepas	23
2.3 Extracción de ADN	23
2.4 Reacciones de Amplificación de ADN por PCR	24
2.4.1 Determinación del Grupo Filogenético mediante PCR.....	25
2.4.2 Determinación de los Genes de Resistencia mediante PCR.....	26
2.5 Análisis Estadístico	27
CAPÍTULO III.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
3.1 Determinación del Grupo Filogenético	29
3.2 Caracterización y detección de los Genes de Resistencia Antibiótica	31
3.3 Caracterización y detección de genes complementarios	32
CONCLUSIONES.....	35
RECOMENDACIONES.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Figura 1. Árbol para determinar el grupo filogenético de una cepa de <i>E. coli</i> mediante el uso de los resultados de la amplificación por PCR de los genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y <i>tspE</i>	25
Gráfica 1. Clasificación del Grupo Filogenético de las Cepas Uropatogénicas.....	30
Gráfica 2. Incidencia de los genes de resistencia antibiótica mediada por betalactamasas.....	31
Gráfica 3. Frecuencia de los genes que confieren una mayor resistencia bacteriana a <i>E. coli</i>	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de virulencia de <i>E. coli</i> Uropatogénica de superficie.....	15
Tabla 2. Factores de virulencia de <i>E. coli</i> Uropatogénica exportados desde el interior de la célula.....	15
Tabla 3. Condiciones de Amplificación (PCR).....	24
Tabla 4. Genes para la determinación del grupo filogenético.....	26
Tabla 5. Genes de resistencia bacteriana.....	26
Tabla 6. Genes complementarios.....	27
Tabla 7. Relación grupo filogenético y factores de virulencia de resistencia antibiótica.....	34

ABREVIATURAS

AMP: ampicilina

APEC: *Escherichia coli* patogénica aviar (por su denominación en inglés *avian pathogenic Escherichia coli*)

AE: anclaje y borrado (por su denominación en inglés *attaching and effacing*)

BLEE: Betalactamasas de Espectro Extendido (o ESBL por su denominación en inglés *extended spectrum betalactamase*)

CIP: ciprofloxacino

DAEC: *Escherichia coli* adherente-difusa (por su denominación en inglés *Diffuse-adherence*)

DEC: *Escherichia coli* diarreagénicas (por su denominación en inglés *Diffuse-adhering Escherichia coli*)

DNA: Acido Desoxirribonucleico (por su denominación en inglés *Deoxyribonucleic acid*)

dNTP: nucleósidos trifosfato (por su denominación en inglés *nucleoside triphosphate*)

ExPEC: *Escherichia coli* patógena extraintestinal (por su denominación en inglés *extraintestinal pathogenic E. coli*)

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa (por su denominación en inglés *Enteraggregative Escherichia coli*)

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva (por su denominación en inglés *Enteroinvasive Escherichia coli*)

EMB Agar: Agar azul de metileno (por su denominación en inglés *Eosin methylene blue agar*)

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogénica (por su denominación en inglés *Enteropathogenic E. coli*)

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénica (por su denominación en inglés *Enterotoxigenic Escherichia coli*)

IESS: Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social

INEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos

LB BROTH BASE: (por su denominación en inglés *Lennox L Broth Base*)

LREC: Laboratorio de Referencia *Escherichia coli*.

LT: Termolábiles (por su denominación en inglés *heat-labile*)

MJEG: Maternidad Julia Ester González

MSP: Ministerio de Salud Pública del Ecuador.

NAL: ácido nalidíxico

NCBI: Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (por su denominación en inglés *National Center for Biotechnology Information*)

NMEC: *Escherichia coli* Meningitis Neonatal (por su denominación en inglés *Neonatal Meningitis Escherichia coli*)

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAIs: Islas de patogenicidad (por su denominación en inglés *Pathogenicity Islands*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (por su denominación en inglés *polimerase chain reaction*)

SAM: ampicilina/sulbactam

SHU: Síndrome Hemolítico Urémico

ST: Termoestable (por su denominación en inglés *heat-stable*)

TMP-SMX: Trimetoprim-Sulfametoxazol

TSA: agar soya tripticasa (por su denominación en inglés *Tryptic Soy Agar*)

UCI: Unidad de Cuidados Intesivos

UPEC: *Escherichia coli* uropatógena (por su denominación en inglés *Uropathogenic Escherichia coli*)

USP: proteína específica uropatogénica (por su denominación en inglés *specific protein uropathogenic*)

UTIs: Infecciones de tracto urinario (por su denominación en inglés *Urinary tract infection*)

VFS: Factores de Virulencia (por su denominación en inglés *Virulence Factors*)

VTEC: *Escherichia coli* verotoxigénica (por su denominación en inglés *Verotoxigenic Escherichia coli*)

RESUMEN

Las infecciones de tracto urinario (UTIs) se ubican en el octavo lugar como un problema de salud, con una prevalencia del 10,3% en mujeres según los datos del INEC 2009. *E. coli* es la bacteria más común causante de UTIs alcanzando del 70-90% y con una resistencia aproximada del 30% en recurrencia variando según la heterogeneidad en la distribución de los genes de virulencia y el complejo potencial patogénico de las cepas UPEC. Este estudio agrupó filogenéticamente las cepas UPEC en los grupos B2 y D (32,05%). Se identificó el gen predominante implicado en el desarrollo de la resistencia antibiótica sobresaliendo el CTX-M (84,61%) y los genes determinantes de los factores de virulencia que impulsan la resistencia bacteriana siendo el *traT* el más frecuente. Los resultados coinciden con estudios a nivel mundial y principalmente en Latinoamérica, los cuales citan al filogrupo B2 como el habitual en las UPEC y la relación existente de éste con el gen *traT*; y exteriorizan al gen CTX-M como el más común implicado en la resistencia antibiótica en países de Europa y Sur América.

PALABRAS CLAVES: UPEC, *E. coli* extraintestinal, virulencia, genes, resistencia.

ABSTRACT

Urinary tract infections (UTIs) are located in eighth place as a health problem with a prevalence of 10.3% in women according to data from INEC 2009. *E. coli* bacteria is the most common cause of UTIs reaching 70-90% and approximately 30% strength recurrence varying according to the heterogeneity in the distribution of the virulence genes and complex pathogenic potential of UPEC strains. This study phylogenetically grouped the UPEC strains B2 and D (32.05%) groups. The predominant gene involved in the development of antibiotic resistance protruding CTX-M (84.61%) and gene determinants of virulence factors that promote bacterial resistance *traT* being the most common identified. The results are consistent with studies worldwide and especially in Latin America, which cite phylogroup B2 as usual in the UPEC and the relationship of this gene in *traT*; and externalize the CTX-M gene as the most common implicated in antibiotic resistance in countries in Europe and South America.

KEYWORDS: UPEC, extraintestinal *E. coli*, virulence, genes, resistance.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones del tracto urinario (UTIs) constituyen una patología muy habitual, que se identifican por ser recurrentes y conllevar a complicaciones graves como sepsis y daño renal; una UTI se caracteriza por la presencia de bacterias en lugares normalmente estériles que forman parte del aparato urinario, con la consiguiente respuesta inflamatoria (Forbes, *et al.* 2007), originando patologías como: bacteriuria, cistitis, pielonefritis y bacteremia (Duplessis, 2011); esto generalmente depende de la capacidad de la bacteria para colonizar, lo cual se ve afectado por los mecanismos de defensa de huésped y la interacción íntima que mantiene con el mismo, así como los atributos patogénicos del germen (Torres & Mattera, 2008).

Dentro de la población en riesgo se incluyen: recién nacidos, prematuros, niñas de edad prepuberal y mujeres en edad sexual activa (18-30 años). La gran prevalencia de las UTIs es perceptible principalmente en las mujeres, quienes alrededor del 10-50% padecen de infecciones urinarias en algún momento de su vida, reportando recurrencia del 25 al 33% en el mismo año (Duplessis, 2011).

En Ecuador según el INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos) en el 2009, las Infecciones de Vías Urinarias fueron un problema de salud ubicado en el octavo lugar con una tasa del 10.3% en las mujeres, con relación a las diez principales causas de morbi-mortalidad (Tumbaco & Martínez, 2013). Según estudios *E. coli* es la bacteria más común causante de UTIs en un 70-90%, adquirida en forma intrahospitalaria y extrahospitalaria y se conoce que tiene una tasa de resistencia de aproximadamente el 30%, asociada al aumento del consumo de agentes antimicrobianos, en pacientes con infecciones urinarias recidivantes. (Gómez, *et al.* 2005). Según datos generados en el Ecuador en el año 2006 la resistencia frente a antibióticos betalactámicos de uso común era de 54,7% y en el año 2008 fue de 32 al 45% en pacientes hospitalizados, llegando a ser hasta del 56% para ceftazidima (Gales, 2012).

Un estudio realizado en Loja, por Rivera (2014), determinó que el bacilo Gram negativo más frecuente relacionado con el desarrollo de procesos infecciosos fue *E. coli* y que la máxima resistencia antibiótica que expuso fue a las betalactamasas, encontrándose distribuidas de la siguiente manera: en hospitalización las betalactamasas de espectro extendido BLEE con 46,7%, betalactamasas tipo AmpC con 10% y las carbapenemasas con 10%; mientras que en UCI las betalactamasas de espectro extendido BLEE correspondieron al 24,4%, carbapenemasas al 10% y las betalactamasas tipo AmpC 5% considerándolo como un problema de salud pública alarmante.

El mecanismo de patogenicidad determinante en *E. coli* se asocia a factores de virulencia especializados (VFS) (adhesinas, toxinas, sideróforos, revestimiento de polisacáridos e invasinas) codificados por genes específicos. La presencia de estos determinantes de patogenicidad, grupos filogenéticos y genes de resistencia bacteriana determinan cuan virulentas son las cepas UPEC (Johnson, *et al.* 2001).

La prevalencia de los diferentes grupos filogenéticos reportados en diversos estudios, puede ser relacionado con el estado de salud del huésped, la dieta y los factores genéticos de acogida, las condiciones ambientales, sociales y geográficas, o diferencias en las zonas de muestreo, así como también la cantidad de cepas en estudio. (Iranpour, *et al.* 2014)

Estudios han reportado que la mayoría de los aislamientos obtenidos de *E. coli* pertenecen predominantemente al grupo filogenético B2 y se asocia con la máxima resistencia antibiótica de uso común en los pacientes que presentan UTIs (Iranpour, *et al.* 2014); actualmente, las betalactamasas CTX-M son consideradas como las BLEE ampliamente distribuidas en diferentes partes del mundo y con alta prevalencia en países de Europa y Sur América (Mantilla, *et al.* 2009); y generalmente los genes determinantes de los factores de virulencia que confieren una resistencia mayor, están asociados con el grupo filogenético B2, especialmente el gen *traT* y *cvaC* (Lopez, *et al.* 2014).

En nuestro estudio se trabajó con muestras originarias de pacientes que presentaron infección de tracto urinario, confirmadas como *E. coli* con resistencia BLEE positivo, éstas cepas fueron clasificadas filogenéticamente en cuatro grupos: A, B1, B2 y D, por medio del análisis (presencia o ausencia) de genes: *ChuA*, *yjaA* y el fragmento génico *TspE4.C2*. De igual forma se analizó los genes de resistencia antibiótica *TEM*, *SHV* y *CTX-M*; complementando el estudio con genes determinantes de factores de virulencia implicados en el aumento de la resistencia a los antimicrobianos: *traT*, *iss* y *cvaC*.

El objetivo principal de este estudio es aportar con información, que facilite la comprensión de la patogenicidad de la especie *E. coli* uropatogénica, así como también ofrecer información epidemiológica importante en base a los resultados obtenidos en la determinación del grupo filogenético al cual pertenecen las cepas, la prevalencia de los genes de resistencia bacteriana y los genes determinantes de los factores de virulencia asociados a aumento de dicha resistencia.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*), es la bacteria que se encuentra con más frecuencia en el tracto intestinal del hombre y de muchas especies animales, formando parte de la flora intestinal normal y se encuentra en calidad de saprobio sin causar daño (Romero, 2007). *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de los recién nacidos dentro de sus primeras horas y permanece ahí durante toda la vida en interacción biológica con su huésped humano (Vidal, 2003), pero pueden producir infecciones patógenas que pueden estar limitadas a mucosas o bien diseminarse (Romero, 2007). Luego del reconocimiento de *E. coli* como enteropatógeno, se supone que no todas las cepas son igualmente virulentas y que constan ciertas variantes patógenas, capaces de causar enfermedades gastrointestinales como diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico; o extraintestinales como infecciones urinarias, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, abscesos, mastitis, infecciones pulmonares y de heridas (Brooks, *et al.* 2001).

Las cepas patógenas de *E. coli* ocasionan infecciones intestinales en varios hospedadores. El ingreso del patógeno puede ser a través de vía oral por la ingesta de alimentos, colonizando el intestino y desarrollando la infección. Estas cepas a menudo producen enterotoxinas. La especificidad de huésped depende del tipo de adhesinas que expresan, en el caso del ser humano su adherencia al tracto intestinal está relacionada con las fimbrias que posee (Dini, 2001).

1.1.1 Características generales.

E. coli, es un bacilo Gram-negativo no esporulado, de un tamaño aproximado de 4-5µm, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y presenta una sola cadena espiral de DNA, móvil con flagelos peritricos (fimbrias, *pilis*) o inmóvil, capaz de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de cloruro de sodio, fermentador y oxidativo en medios con glucosa u otros carbohidratos, como anaerobio facultativo es capaz de reducir los nitratos a nitritos, descarboxila la lisina; indol positivo, catalasa positivo, lactosa positivo en el 90% de las cepas con citrato negativo, oxidasa negativo, crece preferiblemente a 37°C y es poseedor de una proporción guanina más citosina de 39 a 59% en su DNA. El genoma de *E. coli* contiene un total de 5000 genes. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales (Romero, 2007).

1.1.2 Clasificación Filogenética.

E. coli se clasifica en tres grandes grupos: cepas comensales, patotipos intestinales y patógenos extraintestinales (*ExPEC*). Las cepas pertenecientes a *E. coli* son identificadas en cuatro grupos filogenéticos principales: A, B1, B2 y D; las cepas comensales se encuentran principalmente formando parte de los grupos filogenéticos A y B1, mientras que los patógenos extraintestinales se ubican normalmente dentro de los grupos filogenéticos B2 y en menor medida al grupo D, y los patotipos intestinales forman parte de cualquiera de los grupos (Guillén, *et al.* 2014).

Generalmente las cepas comensales de *E. coli* únicamente causan enfermedades extraintestinales cuando existen factores que la favorecen, es considerada como un depósito transmisor de genes a otros miembros de la microbiota humana o animal; ya que por medio de la transmisión de resistencias cromosómicas da lugar a cambios estructurales dando origen a mutaciones, errores raros que se producen en el proceso de replicación de ADN durante la propagación del microorganismo en el huésped; por ello, el tracto gastrointestinal se considera como el nicho ideal para la transferencia a gran escala de genes de resistencia antimicrobiana y de factores de patogenicidad. (Guillén, *et al.* 2014).

La agrupación filogenética simple se basa en el análisis de la variación alélica de los genes codificantes de determinadas enzimas (Pitout, 2012) involucradas en la clasificación de los mismos. La combinación de los marcadores genéticos, codificadores de proteínas: *ChuA* (receptor hemina de la membrana externa de *E. coli*), *yjaA* (inducido por el estrés) y el fragmento génico *TspE4.C2* (fragmento de ADN anónimo) son los determinantes para la clasificación respectiva (Clermont, *et al.* 2000).

1.1.3 Patotipos.

1.1.3.1 *Escherichia coli* diarreagénicas (DEC).

Hasta hoy, se han podido identificar por lo menos seis categorías de *E. coli* que provocan diarreas en el humano: *Escherichia coli* enterotoxigénicas (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC), *Escherichia coli* enteroagregativas (EAEC), *Escherichia coli* con adherencia difusa (DAEC), *Escherichia coli* enteropatogénicas (EPEC) y *Escherichia coli* verotoxigénicas (VTEC). Cada una de ellas tiene codificado a nivel cromosomal y plasmídico diferentes grupos de genes que participan directamente en su virulencia (Dini, 2001).

1.1.3.1.1 Lesión A/E.

La lesión A/E (anclaje y borrado), es un proceso multiestado que degenera las microvellosidades del enterocito a través de la reorganización de algunas proteínas importantes que se encuentran en el citoesqueleto celular. Para que ocurra la lesión (A/E) la bacteria necesita adherirse al enterocito y traslocar hacia las células del huésped algunas proteínas importantes en la virulencia (Dini, 2001). Se disponen dos tipos:

1.1.3.1.1.1 *Escherichia coli* enteropatógenicas (EPEC).

E. coli enteropatógena (EPEC) coloniza la mucosa del intestino delgado y grueso provocando diarreas con moco y sangre, acompañadas de vómitos y fiebre. Afecta a niños menores de 2 años (mayor prevalencia a los 6 meses de nacidos). La transmisión se lleva a cabo por la vía fecal-oral, o a través de la ingesta de agua o alimentos contaminados; los rangos de mortalidad en la población infantil afectada van desde el 20 al 50%, según estudios se conoce que la infección por EPEC supera a la provocada por otros microorganismos patógenos como *Campylobacter spp.* y *Rotavirus* en los infantes (Vidal, 2003).

El mecanismo patogénico versátil que contiene EPEC genera cambios importantes a nivel de citoesqueleto que afectan en la función celular normal, siendo un virotipo diarragénico de *E. coli* que causa la lesión y que no secreta al medio extracelular la toxina Shiga como lo hacen otros virotipos (Vidal, 2003).

1.1.3.1.1.2 *Escherichia coli* verotoxigénicas (VTEC).

E. coli verotoxigénica (VTEC) es el agente infeccioso más importante de la insuficiencia renal aguda y síndrome urémico hemolítico (SHU) en niños; se caracterizan por unirse a las células epiteliales del colon, provocando cambios de reordenamiento del citoesqueleto al igual que las EPEC. Se transmite por medio del consumo de carne bovina insuficientemente cocida. Las cepas de VTEC están presentes en las heces y los intestinos de animales sanos, y pueden contaminar la carne durante el proceso de sacrificio y faenado de los bovinos. VTEC presenta la más baja dosis infectiva (<100 bacterias) (Signorini, *et al.* 2009). Estas bacterias se llaman verotoxigénicas porque producen toxinas llamadas verocitotoxinas, las cuales destruyen los componentes de la línea celular llamada Vero, éstas toxinas pueden causar una serie de enfermedades en el ser humano que en orden creciente de gravedad van desde diarrea acuosa a colitis

hemorrágica (CH), posee toxinas STX1 y STX2 codificadas por prófagos. (Viñas, *et al.* 2000)

1.1.3.1.2 Sin lesión A/E.

1.1.3.1.2.1 *Escherichia coli* enterotoxigénicas (ETEC).

Las infecciones por *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) afecta principalmente a quienes se trasladan de un lugar a otro e ingieren agua o alimentos contaminados con heces humanas o animales. La patología se asocia con la presencia de diarrea, es por ello que se la conoce como la “diarrea del viajero” la sintomatología puede avanzar hasta una colitis hemorrágica. Una vez que el patógeno es ingerido, se adhiere a la mucosa intestinal (no la invaden). Posee toxinas termoestables: STI, la cual estimula la salida de Cl⁻ y/o inhibe absorción de NaCl; y STII, la cual estimula la salida de HCO₃⁻ (codificadas en un transposón); y termolábiles: LTI, esta tiene la función homóloga a la toxina del cólera y LTII, la cual es muy extraña en el humano. (Dini, 2001)

1.1.3.1.2.2 *Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC).

Al igual que los otros grupos ya mencionados *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), se origina por la ingesta de alimentos contaminados. Estas bacterias desencadenan la enfermedad a través de la invasión a las células epiteliales del intestino grueso, seguido de su multiplicación y la diseminación (sin abandonar el medio intracelular y exponerse nuevamente a la luz intestinal) a través de la capa epitelial del colon, provocando la presencia de diarreas acuosas con sangre y mucus (Dini, 2001).

EIEC junto con miembros del género *Shigella* es responsable de una enfermedad denominada Disentería bacilar o Shigellosis que se caracteriza por fiebre, dolores abdominales y diarrea. EIEC comparte tantas propiedades bioquímicas y patogénicas con *Shigella spp.* que las hace prácticamente indistinguibles entre sí (Dini, 2001).

1.1.3.1.2.3 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC).

E. coli enteroagregativa (EAEC), no secreta enterotoxinas termolábiles ni termoestables, se adhieren a las células HEp-2 por medio de *pili* y toxinas similares a la ST y a las hemolisinas (Forbes, *et al.* 2007); o a su vez por un patrón agregativo en forma de “ladrillos apilados”, esta definición abarca tanto cepas patogénicas como no patogénicas y provoca diarrea acuosa persistente generalmente en niños, acompañada de vómitos, náuseas y fiebre (Dini, 2001).

1.1.3.1.2.4 *Escherichia coli con adherencia difusa (DAEC)*.

La presencia de DAEC, da lugar a la diarrea de tipo acuoso con o sin sangre, acompañada de calambres abdominales, deshidratación y fiebre. Afecta tanto a niños como adultos y generalmente no producen toxinas termoestables o termolábiles o niveles elevados de toxinas Shiga, no poseen plásmidos del factor de adherencia de ECEP ni invaden células epiteliales pero causan lesiones persistentes a las microvellosidades intestinales debido a la acción afimbrial (Afa) o fimbrial (Dr) de adhesinas (Afa/Dr adhesinas) (Liu, 2015).

1.1.3.2 *Escherichia coli extraintestinales (ExPEC)*.

1.1.3.2.1 *Escherichia coli uropatógenicas (UPEC)*.

E. coli uropatógena (UPEC) es la causante de las infecciones más comunes del tracto urinario (UTIs): bacteriuria, cistitis, pielonefritis y bacteremia además de ser a nivel general las infecciones más comunes detrás de las enfermedades respiratorias. La población en riesgo de desarrollar UTIs, incluyen: recién nacidos, prematuros, así como también a niñas de edad prepuberal y mujeres en edad sexual activa, mayoritariamente desarrollada en mujeres de 18-30 años, siendo UPEC una fuente considerable de morbilidad y mortalidad (Duplessis, 2011).

1.1.3.2.2 *Escherichia coli meningitis neonatal (NMEC)*.

Escherichia coli meningitis neonatal (NMEC) tiene mayor recurrencia en recién nacidos o menores de 3 meses de edad. La infección puede producirse durante el parto debido a la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, mediante su adquisición en el hospital, o en el hogar. Los prematuros y de bajo peso al nacer están en mayor riesgo de contraer meningitis. Se estima que *E. coli* causa aproximadamente el 20% de los casos de meningitis neonatal y menos del 2% de meningitis desarrollada en pacientes mayores de 27 días de nacidos (Fernández, 2008).

1.1.3.2.3 *Escherichia coli patógenas aviares (APEC)*.

E. coli patógena aviar (APEC) constituye un serio problema de salud animal, causante de una elevada morbilidad y mortalidad; productora de diversos síndromes como septicemia y enfermedad respiratoria, lo cual representa una gran pérdida económica, generalmente en pollos de engorde. La principal vía de entrada del patógeno es la aérea, por inhalación de polvo contaminado con heces. Entre los mecanismos asociados

a la patogenicidad destacan las propiedades de adhesión, invasión de tejidos y órganos internos, supervivencia en el suero y sistemas de adquisición de hierro (Vásquez, 2011).

1.1.3.3 *Escherichia coli* comensales.

Las cepas *E. coli* comensales forman parte de la microbiota normal del intestino de humanos sanos, mamíferos y aves; se caracterizan por adaptarse perfectamente a la coexistencia con su hospedador, sin causar patogenicidad o sintomatología alguna, a menos que exista inmunodepresión; carece de muchos de los determinantes de virulencia que están presentes en las cepas patógenas (Ausina & Moreno, 2005).

1.2. *Escherichia coli* uropatogénicas

E. coli uropatogénica proveniente de muestras de orina, es un grupo heterogéneo de cepas, identificadas rápidamente por su morfología de colonia característica con un lustre “iridiscente” en medios selectivos o diferenciadores como agar EMB (*Eosin Methylene Blue Agar*) y una prueba de Indol de mancha positiva (Forbes, *et al.* 2007).

1.2.1 Características Generales.

Las infecciones del tracto urinario (UTIs) constituyen una patología muy habitual, en muchos pacientes suelen ser asintomáticas (bacteriuria asintomática), recurrentes o pueden determinar complicaciones graves como sepsis o secuelas importantes, entre ellas daño renal (pielonefritis). Respecto al origen de dichas infecciones, se conoce que la más habitual es generada por una bacteremia en la comunidad y/o en el hospital. Así pues, la infección urinaria es la presencia de bacterias en lugares normalmente estériles que forman parte del aparato urinario, con la consiguiente respuesta inflamatoria (Forbes, *et al.* 2007).

1.2.1.1 Patogenia.

En la gran mayoría de las mujeres, para que se produzcan UTIs por vía ascendente las bacterias Gram-negativas entéricas y otros microorganismos que provienen del tracto gastrointestinal, deben colonizar la cavidad vaginal, la región periuretral o ambas, siendo capaces de adherirse y multiplicarse para luego pasar por los uréteres y llegar a los riñones. Las UTIs son más frecuentes en las mujeres que en los varones ya que la uretra femenina es más corta y se encuentra próxima al ano. De igual forma, la actividad sexual puede aumentar la probabilidad de contaminación bacteriana de la uretra femenina (Torres & Mattera, 2008).

Gran número de pacientes hospitalizados desarrollan UTIs debido al empleo de sondas urinarias u otro tipo de manipulación urinaria, pues se cree que al introducirse las mismas a lo largo de la uretra hasta la vejiga, se da lugar a la migración de los microorganismos patógenos a través del espacio existente entre la sonda y la mucosa de la uretra, llegando así a la vejiga (Torres & Mattera, 2008).

Las UTIs también tienen su origen por vía hemática (transmisión sanguínea), ésta puede deberse a la presencia de una bacteremia, la misma que se disemina hacia el riñón, sin embargo es muy extraño pues comprende menos del 5% de los casos (Torres & Mattera, 2008).

La probabilidad de que *E. coli* pueda colonizar y causar UTIs, depende de la interacción compleja que existe entre el huésped y el factor microbiano; como los mecanismos de defensa del huésped y los atributos patogénicos del germen (Torres & Mattera, 2008).

Entre los mecanismos de defensa del tracto urinario, que *E. coli* debe atravesar están:

- El libre flujo de orina, el vaciamiento vesical periódico, permite un lavado por arrastre evitando que los gérmenes con escasa afinidad por el urotelio lo colonicen.
- Normalmente, la válvula vesicoureteral previene el reflujo de orina de la vejiga hacia los uréteres y los riñones.
- La presencia de la proteína de Tamm Horsfall o uromodulin en orina, impide la adherencia mediada por los pili manosa-sensibles.
- La mucosa intacta es también una barrera efectiva frente a la colonización de microorganismos en el tracto urinario, ya que ciertas bacterias requieren la presencia de fibras de colágeno que se exponen en la superficie luego de microtraumatismos (durante las relaciones sexuales), dando lugar al desarrollo de UTIs en mujeres de vida sexual activa.
- La presencia de una elevada osmolaridad, úrea, pH ácido de la vagina y secreciones prostáticas en el hombre inhiben el crecimiento bacteriano (Torres & Mattera, 2008).

1.2.1.2 Incidencia y Prevalencia.

Un 95% de las UTIs se adquieren por vía vaginal y de esta a la vejiga y riñones, el resto se adquieren por vía hematológica (Torres & Mattera, 2008).

La población de riesgo incluye tanto a: prematuros, recién nacidos, así como también a niñas de edad prepuberal y mujeres en edad sexual activa, incrementándose con los años hasta el punto de constituir un problema significativo en la población geriátrica (Gómez, *et al.* 2005).

E. coli es la causa más frecuente de UTIs adquirida en forma extrahospitalaria, alcanzando entre el 70 y 90% según los estudios, tanto en adultos como en la población pediátrica (Gómez, *et al.* 2005); además de ser la causa más frecuente de UTIs adquirida de manera intrahospitalaria; sin embargo *Proteus vulgaris*, *Klebsiella spp.*, y *Pseudomonas aeruginosa* están estrechamente relacionados con la patología. (Gómez, *et al.* 2005).

1.2.1.3 Estatus ExPEC.

La nominación del acrónimo “*ExPEC*” (*Ex*traintestinal *Pa*thogenic *E*scherichia *co*li), surgió en el año 2000 por Russo y Johnson, debido a la existencia de gran cantidad de cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales y portadoras de diferentes perfiles de virulencia, lo cual imposibilita su clasificación en un tipo concreto de síndrome. Este tipo de infecciones no suelen presentar mayor atención por los centros de salud ya que no acostumbran asociarlas a grandes epidemias o toxiinfecciones alimentarias. El aislamiento de una cepa *E. coli* de un paciente con infección extraintestinal no demuestra que se hable de una cepa *ExPEC*, ya que cualquier cepa comensal de *E. coli* puede causar infección extraintestinal cuando el huésped está inmunológicamente comprometido. Generalmente las cepas *ExPEC* son patógenos oportunistas que van a infectar en estadios posteriores a estrés, causando la infección no necesariamente en el lugar de colonización (Blanc, 2007).

Estas cepas son epidemiológicamente y filogenéticamente diferentes de las comensales y suelen parecer incapaces de generar infecciones intestinales. Sin embargo, se implantan de forma estable en el intestino humano, siendo muchas veces la mejor colonización que la propia microbiota fecal comensal, representando el 20% del total en humanos sanos (Blanc, 2007).

Las cepas *ExPEC* expresan factores de virulencia comunes: adhesinas, lipopolisacáridos capsulares, toxinas, sideróforos, proteasas, invasinas, proteínas de resistencia al suero y captación de hierro; participando activamente en la resistencia bacteriana existente: betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (Blanc, 2007).

1.2.1.4 Factores de Virulencia expuestos por UPEC.

Los factores de virulencia son mecanismos especiales o productos incluidos en el genoma de las bacterias que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad. Estos pueden ser de adherencia, hemólisis, toxinas, sideróforos, sistemas de secreción y en muchos casos de resistencia. *E. coli* uropatógena (UPEC), posee una virulencia

relacionada con la agresividad, la colonización, hallazgo de nutrientes y la permanencia de la bacteria en la mucosa del uroepitelio; adquirida a través de la transferencia horizontal de ADN por medio de transposones, plásmidos, bacteriófagos, y las islas de patogenicidad (PAIs), que le dan una capacidad para adaptarse a nuevos nichos y aumentar la capacidad de causar un amplio espectro de enfermedades. (Enríquez, 2013).

UPEC expone dos tipos principales de factores de virulencia: los producidos en la superficie de la célula y los que son originados dentro de la célula que son luego exportados al sitio de acción, y se los engloba en los siguientes grupos: Adhesinas (Fimbria P, Fimbria tipo 1, fimbria S y F1C, Adhesina afimbrial); Toxinas (Hemolisina, Factor Citotóxico Necrotizante; Sideróforo: El sistema Aerobactina), Capas de polisacáridos Grupo II capsular y Proteína específica uropatogénica (*usp*) (Enríquez, 2013). Éstos ayudan a que los organismos eviten las defensas del huésped, y la vez colonicen sitios anatómicos clave, perturben la fisiología de acogida, puedan invadir los tejidos y como resultado causen una respuesta inflamatoria nociva del huésped, generando la enfermedad como tal (Johnson, *et al.* 2001).

Las cepas patógenas extraintestinales albergan genes que codifican factores de virulencia, responsables de promover las etapas de colonización, adherencia, invasión y la evasión de los mecanismos de defensa del huésped humano. Es controversial la asociación de genes que median la resistencia antimicrobiana, grupos filogenéticos y la presencia de determinantes de virulencia como indicadores de patogenicidad (Millán, *et al.* 2014). Entre los genes de virulencia implicados en el aumento de la resistencia de *E. coli* frente a los antimicrobianos están: *traT* (proteína externa de membrana), *iss* (proteína externa de membrana involucrada en la supervivencia al suero) y *cvaC* (plásmido); los cuales en conjunto confieren a *E. coli* un aumento en su resistencia frente a los antimicrobianos (Pitout, 2012)

1.2.1.4.1 Factores de Virulencia de Superficie.

Los factores de virulencia de superficie están mediados por diversos tipos de organelos de adhesión, principalmente de naturaleza fimbrial; éstas fimbrias o Pili (5-10nm) distintas de los flagelos, se unen a glucoproteínas del uroepitelio a través de las adhesinas, de esta manera evitan ser arrastradas por la orina y dan lugar a la activación directa de las vías de señalización en células bacterianas, facilitando el suministro de productos bacterianos a los tejidos del huésped e impulsan la invasión bacteriana (Enríquez, 2013). La adherencia a las células del tejido vaginal y urinario es importante para el aumento de la capacidad de producir UTIs altas (Torres & Mattera, 2008). Los

factores de virulencia de *E. coli* uropatogénica de superficie, se encuentran adjuntos en la Tabla 1.

Tabla 1. Factores de virulencia de *E. coli* Uropatogénica de superficie.

Factores de virulencia	Función
Fimbria tipo 1	Reconocen los manosa-oligosacáridos que se presentan de forma natural en las glicoproteínas de superficie de las células del huésped. Se adhieren al epitelio de la mucosa y a la matriz tisular, la invaden y forman una biopelícula.
Fimbria P	La más común, responsable de la adhesión en la mucosa y el tejido madre, así como también de la producción de citoquinas. Contribuyen a la patogénesis fomentando la colonización bacteriana de los tejidos uroepiteliales y la respuesta inflamatoria perjudicial para el huésped.
Fimbria S	Se vinculan a las líneas celulares epiteliales y endoepiteliales derivadas del tracto urinario inferior y el riñón. Se adhieren a las células de la mucosa, células endoteliales y a la matriz tisular. Ayudan y facilitan la diseminación bacteriana dentro de los tejidos del huésped, causando en su mayoría sepsis, meningitis, infecciones del tracto urinario ascendente.
Fimbria F1C	Se vinculan a las líneas celulares epiteliales y endoepiteliales derivadas del tracto urinario inferior y el riñón. Permiten la adhesión a las células de la mucosa y endoteliales
Curli	Dan lugar a la adhesión a las células de la mucosa y a la matriz tisular, formación de biopelícula.
Flagelo	Permiten la motilidad bacteriana.
Cápsula	Tiene efectos antifagocitario y anticomplemento, resistencia sérica, evasión del reconocimiento inmune.
Lipopolisacarido	Presenta efectos endotóxicos, antígeno O, inducción de citocinas, resistencia sérica, inmunoadyuvante.
Proteínas de Membrana externa	Dan lugar a la recepción y transporte

Fuente: modificado de Enríquez, 2013.

1.2.1.4.2 Factores de virulencia producidos dentro de la célula.

Los factores de virulencia que son producidos dentro de la célula y que luego son exportados al sitio de acción permiten el aumento en la disponibilidad y captación de hierro, la invasión celular por medio de la lisis y ruptura de la capa de mucina y del epitelio, además de la modulación e inducción del ciclo celular, reacciones inflamatorias y apoptosis (Enríquez, 2013). Los factores de virulencia de *E. coli* Uropatogénica exportados desde el interior de la célula, se encuentran adjuntos en la Tabla 2.

Tabla 2. Factores de virulencia de *E. coli* Uropatogénica exportados desde el interior de la célula.

Factor de Virulencia	Función
α – hemolisina	Citotoxicidad, hemólisis.
Factor Citotóxico Necrotizante 1	Interferencia en la fagocitosis y apoptosis.
Toxina secretada autotrasportadora	Citotoxicidad
Toxina dilatadora citoletal	Citotoxicidad
Citolosina A	Citotoxicidad
Enterobactina	Captación de hierro
Aerobactina	Captación de hierro
Yersiniabactina	Captación de hierro

Fuente: Enríquez, 2013.

1.2.1.5 Epidemiología.

La prevalencia de UTIs varía según el sexo y la edad. En los casos de recién nacidos y lactantes, tiene mayor frecuencia en varones y suelen estar asociados a anomalías hereditarias. Con el pasar de los años, en la edad escolar las mujeres son quienes pasan a ser las que desarrollan UTIs con mayor facilidad, lo cual permanece durante la vida adulta (Torres & Mattera, 2008).

Existen algunas condiciones que aportan al desarrollo de UTIs, entre ellas tenemos:

- Una obstrucción en el vaciamiento vesical periódico, causada por la presencia de cálculos, hipertrofia prostática, etc.
- Alteraciones funcionales o anatómicas de la válvula vesicoureteral, lo cual se observa generalmente en la infancia.
- Mujeres con una vida sexual activa. (Torres & Mattera, 2008).

Además de los pacientes con obstrucción al flujo de orina, se encuentran predispuestos:

- Los diabéticos con descontrol metabólico, la glucosuria favorece el desarrollo bacteriano.
- Embarazadas, debido a factores mecánicos, expansión del útero y disminución de la peristalsis, además de factores hormonales que determinan cambios a nivel renal. Eventualmente, la presencia de glucosuria, en pacientes con diabetes gestacional contribuye también a un mayor riesgo.

- Niños portadores de reflujo vesicoureteral y otras anomalías. Se estima que hasta un 50% de los niños con UTIs tienen reflujo.
- Pacientes con un incorrecto vaciado de orina residual vesical.
- Durante la edad adulta, las tasas de UTIs son mayores en mujeres debido al pobre vaciamiento vesical generado por prolapso uterino, sin embargo en hombres no deja de ser significativa la patología y se la relaciona a una uropatía obstructiva por enfermedad prostática. (Torres & Mattera, 2008).

1.2.2 *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC) en Ecuador.

En Ecuador según el INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos) en el 2009 las Infecciones de vías urinarias son un problema de salud que se ubica en el octavo lugar con una tasa de 10.3% en las mujeres con relación a las diez principales causas de morbi-mortalidad (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2009).

La mayoría de UTIs no complicadas ocurren en mujeres jóvenes con vida sexual activa, son menos comunes en mujeres de la tercera edad y en hombres. Aproximadamente la mitad de las mujeres en algún momento de su vida presentan UTIs; un cuarto de éstas tienen recurrencia. Entre 75 y 95 % de los casos son causados por la bacteria *Escherichia coli*; la segunda causa es *Staphylococcus saprophyticus* (Susan & Mehnert-Kay, 2005).

Un estudio realizado en Loja, por Rivera (2014), determinó que el bacilo Gram negativo más frecuente relacionado con el desarrollo de procesos infecciosos fue *E. coli* y que la máxima resistencia antibiótica que expuso fue a las betalactamasas, encontrándose distribuidas de la siguiente manera: en hospitalización las betalactamasas de espectro extendido BLEE con 46,7%, betalactamasas tipo AmpC con 10% y las carbapenemasas con 10%; mientras que en UCI las betalactamasas de espectro extendido BLEE correspondieron al 24,4%, carbapenemasas al 10% y las betalactamasas tipo AmpC 5% considerándolo como un problema de salud pública alarmante.

1.3 Resistencia Bacteriana

El fenómeno en el cual una bacteria es capaz de sobrevivir y diseminarse con facilidad aún en presencia de un antibiótico se denomina resistencia bacteriana; el cual aumenta la morbimortalidad, la estadía hospitalaria y los costos de tratamiento de quienes padecen de ello. (Tenover, 2006).

Existen dos tipos de resistencia bacteriana: la natural o intrínseca que se caracteriza por ser innata, originaria de la ausencia de target o sitio de acción del antibiótico en la célula

microbiana; y la adquirida que se debe a cambios genéticos en el genoma bacteriano ya sea por mutación o por la adquisición de plásmidos y transposones desde otras bacterias a través de ciertos fenómenos como: transformación, transducción y conjugación; estos son los responsables de la diseminación de la resistencia bacteriana una vez que esta se distribuye a nivel comunitario y hospitalario (Maggiolo, 2008).

Entre los mecanismos que presenta una bacteria para adquirir su resistencia a los antibacterianos están:

- **Modificación enzimática del antibiótico:** las bacterias van a crear enzimas que tienen la capacidad de generar cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad; estas enzimas capaces de inactivar penicilinas y cefalosporinas se conocen como betalactamasas (Mojerón, 2013).
- **Bombas de expulsión:** éstas operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, evitando que llegue a su sitio de acción; estas bombas se encuentran ubicadas en la membrana externa de la célula y expulsa hacia el exterior de la bacteria gran cantidad de moléculas (metabolitos, detergentes, solventes orgánicos), manteniendo bajas las concentraciones de sustancias tóxicas dentro de la célula bacteriana (Tafur, *et al.* 2008).
- **Cambios en la permeabilidad de la membrana externa:** las bacterias van a generar modificaciones en la bicapa lipídica, alterando la permeabilidad de la membrana principalmente por cambios conformacionales de las porinas, interviniendo el paso correcto de los agentes antimicrobianos al estar involucradas en la regulación de la entrada de dichos elementos (Tafur, *et al.* 2008).
- **Alteraciones en el sitio de acción:** debido a mutaciones cromosómicas o por adquisición de genes exógenos, las bacterias pueden generar cambios en su sitio de acción, como es el caso de las DNA girasa (dianas para los β -lactámicos); estas modificaciones no impiden la función fisiológica de las dianas, sin embargo se disminuye la afinidad de su unión con el antibiótico, lo cual conlleva a la resistencia bacteriana (Prats, 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), indica que el uso abusivo de los antibióticos, la prescripción no adecuada en casos que no corresponden como es el caso de las enfermedades virales o micóticas, donde los antibióticos no tienen ningún efecto, la falta de adherencia al tratamiento, la aplicación de dosis no óptimas y, la irregularidad en la toma de los fármacos, son los principales factores que han llevado al aumento de la tasa de resistencia antimicrobiana (Cardona, *et al.* 2011).

La resistencia de las bacterias Gram negativas de importancia clínica a los antibacterianos tiene lugar especialmente en bacilos Gram negativos no fermentadores y en la familia *Enterobacteriaceae* (Tenover, 2006).

1.3.1 Antibióticos de uso en UTIs.

La Asociación Americana de Urología, recomienda el uso de trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) como antibiótico de elección para el tratamiento de UTIs no complicadas. Sin embargo no debe utilizarse como antibiótico de primera elección en poblaciones con *Escherichia coli* con resistencia superior a 20% (Susan & Mehnert-Kay, 2005).

Para Ecuador el antibiótico de primera elección en el tratamiento de UTIs es Nitrofurantoína, por su efectividad, bajo costo y seguridad. Según datos, la resistencia de *E. coli* a Nitrofurantoína es de apenas 4,3%. Aunque esté contraindicado en personas con insuficiencia renal, puede considerarse como el antibiótico de elección durante el embarazo (clase B) y la lactancia. No se justifica el uso de aminoglucósidos (amikacina, gentamicina) como antibióticos de primera línea porque conllevan el riesgo de nefro y ototoxicidad y además requieren administración parenteral. El abuso en la prescripción de fluoroquinolonas, como ciprofloxacina o norfloxacina, para el tratamiento de UTIs no complicadas se refleja en un aumento de las tasas de resistencia, que para el año 2006 en el Ecuador llegaba al 30% (Susan & Mehnert-Kay, 2005).

Otros antibióticos más costosos como las quinolonas, cefuroxima o fosfomicina deben reservarse para los casos complicados o si el urocultivo justifica su uso. Para el tratamiento de UTIs en hombres, nitrofurantoína no tiene buena penetración de los tejidos por lo que se recomienda el uso de una fluoroquinolona o una cefalosporina de segunda o tercera generación. El tratamiento debe ser mínimo de siete días ya que el riesgo de complicación es más alto que en mujeres (Susan & Mehnert-Kay, 2005).

1.3.2 Mecanismos de Resistencia de *E. coli*.

Por medio de estudios ya realizados, se conoce que *Escherichia coli* tiene una tasa de resistencia de aproximadamente el 30%, asociada al aumento del consumo de agentes antimicrobianos, en pacientes con infecciones urinarias recidivantes (Gómez, *et al.* 2005)

Aunque el tracto urinario humano presenta varios mecanismos antimicrobianos, UPEC presenta diversos mecanismos que le permiten persistir en el sistema urinario del huésped, fenómeno que está relacionado con la recurrencia y cronicidad del padecimiento. Actualmente se tiene gran avance en el conocimiento de la genética,

factores de virulencia y la fisiopatología de la enfermedad que produce este importante patógeno. Sin embargo, aún falta mucho para entender la relación de UPEC con el huésped humano (Torres & Mattera, 2008). Según datos generados en el Ecuador en el año 2006 la resistencia frente a antibióticos betalactámicos de uso común era de 54,7% y en el año 2008 fue de 32 al 45% de resistencia en pacientes hospitalizados, llegando a ser hasta del 56% para ceftazidima (Gales, 2012).

Los betalactámicos, son antibióticos muy importantes y uno de los mecanismos de resistencia con mayor trascendencia clínica es la interferencia con la síntesis de la pared celular mediada por enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (Pitout, 2004). Las BLEE, son una familia de enzimas producidas por bacilos Gram negativos, principalmente enterobacterias frecuentes en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* aunque también son expuestas por microorganismos no fermentadores como *Pseudomona aeruginosa* y otros (Álvarez, 2010).

Se han determinado más de 200 betalactamasas diferentes, unas específicas para penicilinas (penicilinasas) o cefalosporinas (cefalosporinasas), a su vez otras tienen un espectro amplio de actividad, pues son capaces de inactivar la mayoría de los antibióticos betalactámicos usados en el tratamiento de UTIs, este último grupo de betalactamasas representan problema ya que usualmente están codificados por plásmidos y pueden transferirse de un organismo a otro (Arce, *et al.* 2013). Las BLEE, tienen la capacidad de inactivar las penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, además de las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam. (Álvarez, 2010). Entre las familias de las BLEE, las más prevalentes son las TEM, SHV y CTX-M (Tafur, *et al.* 2008).

TEM y SHV por medio de una serie de mutaciones puntuales hacen que su centro activo se altere, principalmente por el excesivo uso de cefalosporinas de tercera generación dando lugar a la modificación de su perfil de sustrato, mejorando su capacidad de hidrólisis frente a los betalactámicos (Arce, *et al.* 2013); éstas hidrolizan principalmente a ceftazidime, mientras que las de tipo CTX-M hidrolizan usualmente a cefotaxime y ceftriaxona (Tafur, *et al.* 2008).

1.3.3 Genes de Resistencia Antibiótica de *E. coli*.

En respuesta al uso clínico y extendido de las penicilinas de más amplio espectro, como la ampicilina y la carbenicilina, y de las primeras cefalosporinas aparecidas en los años 60 y principios de los 70, aparecen las betalactamasas mediadas por plásmidos que comienzan a emerger básicamente entre *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram

negativas. (Arce, *et al.* 2013). *E. coli* presenta comúnmente resistencia a aminopenicilinas, como amoxicilina, ampicilina y cefalosporinas. (Karlowsky, *et al.* 2002). Esta resistencia está normalmente mediada por la adquisición de los plásmidos que codifican enzimas denominadas betalactamasas (Rupp & Fey, 2003).

La primera betalactamasa mediada por un plásmido y encontrada en una *enterobacteria*, fue la TEM-1 aislada en *E. coli* en 1965. El nombre de TEM es una contracción de Temoniera, el nombre del paciente del que fue aislado. Desde esa época se ha expandido entre un 20 y un 60% entre las *Enterobacterias*; su frecuencia varía con la especie y el lugar. En *E. coli* es la responsable de la resistencia a la ampicilina en cerca del 25% de las cepas (Arce, *et al.* 2013).

Por otra parte la betalactamasa SHV es una contracción de sulfhidrilo variable, fue también llamado PIT-2, porque fue descrito por primera vez por Pitton en 1972, ya ha sido detectada principalmente en *Klebsiella* entre un 33% y un 94% de las cepas que producen resistencia a la ampicilina. Se han observado hiperproducciones de SHV-1 tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae* produciendo una disminución de la sensibilidad a la ceftazidima y a la amoxicilina - ácido clavulánico. (Arce, *et al.* 2013)

Un gran número de BLEE no proviene de los betalactámicos TEM ni SHV, pues se encuentran codificadas por plásmidos CTX-M lo cual les permite transmitir horizontalmente los genes de resistencia y se caracterizan por su alta capacidad hidrolítica sobre cefalosporinas especialmente cefotaxima y ceftriaxona; y escasa capacidad de hidrolizar la ceftazidima y cefepime. Este genotipo es un ejemplo de betalactamasas cromosómicas, encontradas en especies “kluuvera” pertenecientes a *E. coli* comensales; sin embargo no tienen relación alguna con TEM y SHV, ya que solo muestran un 40% de identidad con las mismas. Actualmente se han identificado más de 80 tipos de CTX-M, dentro de las cuales algunas suelen ser más activas contra ceftazidima que cefotaxima. Así como en *E. coli*, este tipo de enzimas también se han descrito en otras especies de *Enterobacteriaceae* y dentro de las más comunes están: los tipos CTX-M15, CTX-M32, y CTX-M1 y CTX-M9, aisladas en áreas geográficamente distantes como Alemania, Italia, Argentina y España, siguiendo así una amplia difusión de estas betalactamasas (Arce. *et al.* 2013).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Material de estudio

Se trabajó con muestras originarias de pacientes que presentaron infección de tracto urinario, procedentes de un estudio previo realizado en tres entidades de Salud Pública de la ciudad de Loja, (Hospital Manuel Ygnacio Monteros (IESS), el Hospital Del Día (IESS) y Maternidad Municipal Julia Ester González (MJEG)) durante el período Febrero - Septiembre 2013, en el que se confirmaron como *Escherichia coli* con resistencia BLEE positivo (Torres, 2014) (Malla, 2014) (Chalán, 2014).

2.2 Cultivo para el aislamiento de cepas

Se utilizó el Agar MacConkey de la marca Becton Dickinson and Company, el cual al ser un medio selectivo para bacilos Gram negativos no exigentes, entre ellos las *Enterobacterias*, permitió el crecimiento de *Escherichia coli* (Fox, 2015). La incubación se realizó por un periodo de 24 horas a 37°C.

Del crecimiento en Agar MacConkey, se seleccionó una colonia aislada y se realizó la inoculación o resiembra en Agar TSA de la marca Becton Dickinson and Company, el cual siendo un medio altamente nutritivo permitió el amplio crecimiento de *Escherichia coli* (Prats, 2005). Adicionalmente se realizó la siembra de diez cepas control positivo, las cuales fueron conferidas por el Laboratorio de Referencia *Escherichia coli* (LREC) de la Universidad de Santiago de Compostela, España; e identificadas mediante las siglas C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 y C10.

La incubación se llevó a cabo por un período de 24 horas a una temperatura de 37°C; de esta manera se obtuvo el crecimiento necesario de cada una de las cepas patógenas de *Escherichia coli* y de las cepas control positivo.

Cada una de las cepas obtenidas a partir de la siembra en TSA, se las conservó por duplicado en 1ml de LB BROTH BASE (Lennox L Broth Base) de la marca Invitrogen, más Glicerol de la marca Becton Dickinson and Company; y posteriormente fueron almacenadas y congeladas a -20°C.

2.3 Extracción de ADN

Para la extracción diaria de ADN, se efectuó una resiembra en Agar TSA de las cepas aisladas y conservadas en LB más Glicerol (cuatro cepas por caja Petri), y se las incubó durante un período de 24 horas a 37°C; transcurrido el tiempo de incubación se las almacenó en refrigeración a 4°C. Ésta siembra se efectuó semanalmente, facilitando la disponibilidad de las cepas para el trabajo respectivo.

Durante la extracción de ADN en fresco, se empleó la Técnica de Choque Térmico, para ello se disolvió previamente una asada de cada una de las cepas sembradas en Agar TSA, en 300µl de Agua Mili-Q (ultrapura estéril). La técnica empleada se basó en someter a ebullición durante 5 minutos los tubos eppendorf, que contenían cada una de las cepas de interés; pasado el tiempo requerido, se colocó los tubos en la centrifuga por 2 minutos a 11000 rpm y de esta manera se obtuvo el ADN en el sobrenadante. (Marcano, *et al.* 2011)

2.4 Reacciones de Amplificación de ADN por PCR

La determinación del grupo filogenético y de los genes de resistencia al cual pertenecen las cepas de interés, se lo determinó cualitativamente por medio de reacciones de amplificación de ADN por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), empleando como polimerasa GoTaq Flexi DNA Polymerase de la marca Promega. La amplificación se realizó usando: 0.5µL de dNTP (10mM), 0.5µL por cada uno de los primers (Forward y Reverse), 2µL de Cloruro de Magnesio (25mM), 5µL de Reaction Buffer 5x Green GoTaq, 0.12µL de GoTaq Polymerase (5µ/µL), 14.38µL de H₂O Destilada Desionizada más 7µL de ADN, trabajando con un volumen final de 30µL. El empleo de los reactivos fue el mismo en cada una de las PCR realizadas, únicamente se cambió los primers los cuales son específicos para cada gen.

La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems), bajo las especificaciones descritas en la tabla 3; a excepción de la temperatura de anillado las cuales son específicas para cada primer y se encuentran expuestas en la tabla 4 y 5 respectivamente.

Tabla 3. Condiciones de Amplificación (PCR).

Thermal Cycler Programs	
1 CICLO	
Activation	94°C; 3min
35 CICLOS	
Desnaturation	94°C; 1min
Annealing	T° de anillado; 40seg
Extension	72°C; 2min
1 CICLO	
Final Extension	72°C; 3min

Fuente: Johnson, *et al.* 2003

De los productos resultantes de la PCR, se realizó una Electroforesis horizontal en Gel de Agarosa al 2%; así mismo para visualizar las bandas de ADN se empleó una solución de SYBR® Safe DNA de Invitrogen. El proceso de migración de ADN se dio lugar en un buffer de TAE 1X (Tris-acetato-EDTA) obteniéndolo de una dilución de TAE 40X de la marca Promega en agua desionizada. La migración del ADN durante la electroforesis se llevó a cabo durante 30 minutos a una corriente de 150V; incluyendo a la vez los control específicos para cada gen (cepas control positivas) en cada una de las electroforesis.

2.4.1 Determinación del Grupo Filogenético mediante PCR.

La clasificación de las cepas *E. coli* dentro de los grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D, se realizó por medio del estudio de tres marcadores genéticos, mediante PCR empleando los primers establecidos para cada uno (Tabla 4), bajo condiciones establecidas (2.4). La interpretación de los resultados se realizó en base al esquema de Clemont, *et al* (2000), en el que se valora la presencia (+) o ausencia (-) de los genes *chuA*, *yjaA* y de un el fragmento génico *TspE4.C2*, clasificando a las cepas en los diferentes grupos filogenéticos tomando en cuenta lo siguiente: para el grupo A: *chuA* (-) y *TspE4.C2* (-); B1: *chuA* (-) y *TspE4.C2* (+); B2: *chuA* (+) y *yjaA* (+) y el filogrupo D: *chuA* (+) y *yjaA* (-) (Figura 1).

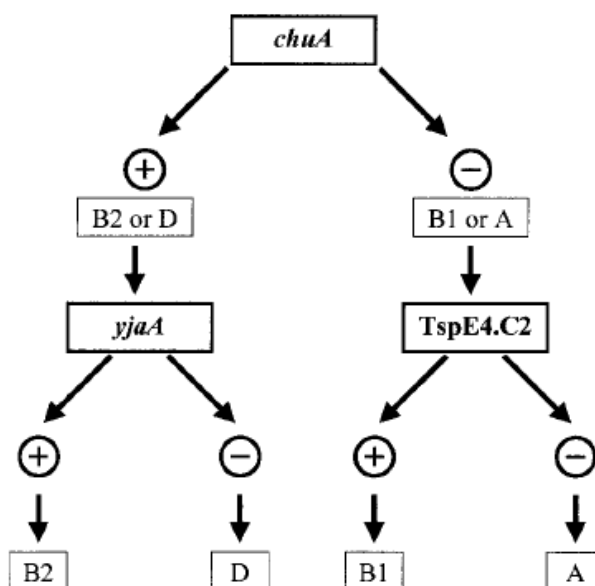


Figura 1. Árbol para determinar el grupo filogenético de una cepa de *E. coli* mediante el uso de los resultados de la amplificación por PCR de los genes *chuA*, *yjaA* y *tspE*.

Fuente: Clemont, *et al.* 2000

Tabla 4. Genes para la determinación del grupo filogenético.

GEN	PRIMER	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (Pb)	T° ANILLADO
<i>yjaA</i>	YJAA1	TGAAGTGTGTCAGGAGACGCTG	211	54
	YJAA2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
<i>chuA</i>	CHUA1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	62
	CHUA2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
<i>tspE</i>	TSPE4C21	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	152	54
	TSPE4C22	CGCGCCAACAAAGTATTACG		

Fuente: Clermont, *et al.* 2000**2.4.2 Determinación de los Genes de Resistencia mediante PCR.**

La determinación cualitativa de las cepas *E. coli*, se realizó mediante el estudio de cinco marcadores de resistencia bacteriana mediante PCR empleando los primers independientemente establecidos (Tabla 5) y bajo condiciones determinadas (2.4). Adicionalmente el estudio se complementó mediante el análisis de tres genes: *traT*, *iss* y *cvaC*; los cuales en conjunto confieren resistencia antimicrobiana a *E. coli*. Los primers empleados para la determinación de los genes complementarios se exponen en la Tabla 6 y las condiciones de PCR fueron las mismas de los marcadores de resistencia bacteriana.

Tabla 5. Genes de Resistencia Bacteriana.

GEN	PRIMER	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (Pb)	T°	AUTOR
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-C3	ATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATG	542	58	Rupp & Fey, 2003
	CTX-C4	ACCGCGATATCGTTGGTGGTGCC			
<i>bla_{CTX-M} group 9</i>	CTX-M9-F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	856	56	Rupp & Fey, 2003
	CTX-M9-R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC			
<i>bla_{CTX-M} group 13</i>	M13U	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	863	55	Simarro, <i>et al.</i> 2000
	M13L	TGGTGACGATTTTAGCCGC			
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-1	GGGTTATTCTTATTTGTGCGC	930	48	Saladin, <i>et al.</i> 2002
	SHV-2	TTAGCGTTGCCAGTGCTC			
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-1-F	ATGAGTATTCAACATTTCCG	868	50	Rasheed, <i>et al.</i> 1997
	TEM-1-R	CTGACAGTTACCAATGCTTA			

Fuente: Carrillo, D. 2015

Tabla 6. Genes complementarios.

GEN	PRIMER	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (Pb)	T°	AUTOR
traT	TRAT-F	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	290	66	Johnson & Stell, 2000.
	TRAT-R	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG			
cvaC	CVAC-F	CACACACAAACGGGAGCTGTT	677	55	Johnson & Stell, 2000.
	CVAC-R	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT			
iss	ISS-F	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	323	66	Rodriguez, <i>et al.</i> 2005
	ISS-R	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA			

Fuente: Carrillo, D. 2015

2.5 Análisis Estadístico

Para el análisis e interpretación de los resultados obtenidos mediante la determinación del grupo filogenético, genes de resistencia antibiótica y genes complementarios que confieren resistencia bacteriana a *E. coli* se empleó estadística descriptiva en Excel, a través del empleo de tablas de datos con frecuencias y porcentajes correspondientes.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron un total de 78 muestras con diagnóstico microbiológico de *Escherichia coli* con resistencia BLEE positivo, procedente del estudio previo realizado en tres entidades de Salud Pública de la ciudad de Loja durante el periodo Febrero- Septiembre 2013.

3.1 Determinación del Grupo Filogenético

Según los resultados obtenidos luego del estudio de los tres marcadores genéticos, mediante PCR y la consecuente evaluación de la presencia o ausencia de los mismos, las cepas de interés se clasificaron de la siguiente forma: 21 (78) cepas pertenecían al grupo A, 7 (78) al grupo B1, 25 (78) al grupo B2, y 25 (78) al grupo D. Se observó que el marcador genético *chuA* estaba presente en 50 (78) cepas, clasificándolas en los grupos filogenéticos B2 y D; siendo el resto de las cepas parte de los grupos A y B1 como resultado de la ausencia del mismo. De las cepas que fueron positivas para *chuA*, se observó claramente que 25(50) cepas fueron positivas para el marcador genético *yjaA*, clasificándolas a la vez dentro del grupo filogenético B2, excluyéndolas del grupo D en que todas las cepas se mostraron negativas para el mismo; por último se identificó la presencia del fragmento génico *TspE4.C2* en todas las cepas que pertenecían al grupo filogenético B1, clasificándolas finalmente dentro del grupo A, aquellas cepas que no fueron positivas para este fragmento génico.

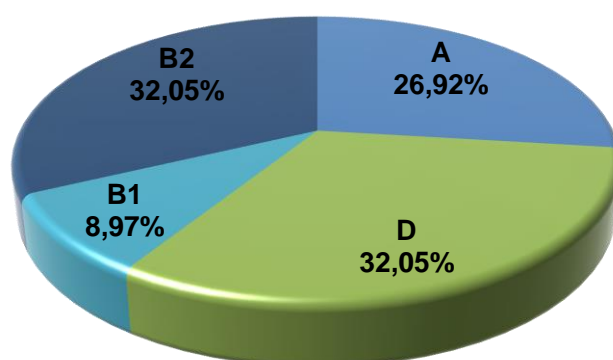
La determinación del grupo filogenético de las cepas *E. coli*, ha sido de gran importancia ya que nos permite evaluar la distribución y la caracterización adoptada por la misma. En un estudio realizado en Europa por Iranpour, *et al.* (2014), se analizó un total de 140 cepas de *E. coli* las cuales (55/140) con un 39,3% formaron parte del grupo filogenético B2, seguido de los grupos filogenéticos B1, D y A con 5%(7/140), 2,9% (4/140) y 0,7%(1/140) respectivamente; demostrando que las cepas extraintestinales virulentas de *E. coli* pertenecían típicamente al grupo B2 y con menor frecuencia al grupo D.

Otro estudio realizado en Irán por Alizade, *et al.* 2013, analizó la distribución filogenética de 45 cepas *E. coli* productoras de UTIs, encontrando los siguientes resultados: 8,89% (4/45) del grupo A, 15,56% (7/45) del grupo B1, 42,22% (19/45) del grupo B2 y 33,33% al grupo D; confirmando que la mayoría de los aislamientos de UTI segregaban en los grupos filogenéticos B2 y D.

En Uruguay Robino, *et al.* (2014), evaluó 90 cepas UPEC procedentes de niños, de las cuales 47 (52,2%) formaron parte del grupo filogenético D en su mayoría, mientras que dentro de los grupo B2 hubo 35 (38,8%) cepas, en el grupo A 7 (7,77%) cepas y 1

(1,11%) cepa en el B1. Mostrando una prevalencia significativamente mayor para de los grupos filogenéticos B2 y D.

En el presente estudio se coincidió elocuentemente que las cepas *E. coli* patógenas extraintestinales de interés se clasificaban predominantemente en los grupos filogenético B2 y D, mostrando una frecuencia similar de 32,05%; mientras que las cepas pertenecientes al grupo filogenético A y B1, presentaron frecuencias de 26,92% y 8,97% respectivamente (Gráfica 1), lo cual nos permitió establecer que las cepas causantes de la mayor parte de infecciones de tracto urinario son las extraintestinales coincidiendo con los estudios de referencia y contando con información similar relativa acerca de la agrupación filogenética de UPEC.



Gráfica 1. Clasificación del Grupo Filogenético de las cepas Uropatogénicas

Fuente: Carrillo, D. 2015

La predominancia de los diferentes grupos filogenéticos y la resistencia bacteriana se ve asociada entre sí; Iranpour. *et al*, (2014) demuestra en su estudio que la gran prevalencia del grupo filogenético B2 se asocia con la máxima resistencia antibiótica expuesta por amoxicilina en un 82,1% y ampicilina en un 80% (antibiótico de uso común en UTIs); confirmando a su vez en base a otros estudios realizados en Irán y España que la mayoría de las cepas que pertenecían al grupo filogenético B2, presentaban resistencia a todos los antibióticos a excepción de meropenem; e informaron que el grupo filogenético B2 es resistente al máximo de la drogas y las cepas pertenecientes al grupo D, suelen mostrarse resistentes a las quinolonas.

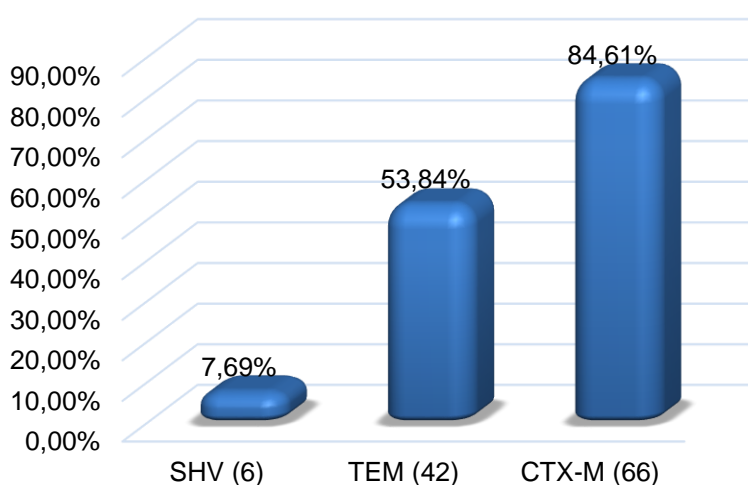
Otro estudio realizado por Kawamura-Sato, *et al*. (2010), se evaluó la resistencia bacteria de UPEC frente a las quinolonas y fluoroquinolonas y la relación con el grupo filogenético de las cepas estudiadas, se observó que el grupo filogenético B2, presentó

mayor resistencia al ácido nalidíxico (NAL) de 64,6% y ciprofloxacino (CIP) 81,6%, seguido del grupo D los cuales presentaron una resistencia de ácido nalidíxico (NAL) de 35,4% y ciprofloxacino (CIP) 18,4%. En Uruguay Robino, *et al.* (2014), en su estudio obtuvo la prevalencia significativamente mayor de los grupos filogenéticos B2 y D en sus cepas analizadas, las mismas que presentaron una resistencia antibiótica de 58,2% para ampicilina y 29,1% para ampicilina/sulbactam (SAM).

El análisis de todos los antibióticos betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y fluoroquinolonas evaluados en las cepas de interés para presente estudio se mostró un alto nivel resistencia bacteriana aproximada para: ampicilina (AMP) 79,80%, ampicilina/sulbactam (SAM) 48,6%, ácido nalidíxico (NAL) 45,9%, y ciprofloxacino (CIP) 42,9% (Torres, 2014) (Malla, 2014) (Chalán, 2014). Al analizar la resistencia antibiótica que mostraron las cepas *E. coli* de interés, podemos relacionar la predominancia de los dos grupos filogenéticos B2 y D, con la resistencia bacteriana expuesta hacia los medicamentos de uso común en UTIs principalmente para ampicilina y ampicilina/sulbactam ya que frente a los otros estudios coincide mayoritariamente con la máxima resistencia antibiótica expuesta por UPEC.

3.2 Caracterización y detección de los Genes de Resistencia Antibiótica.

Mediante la técnica de PCR se amplificó e identificó los cinco marcadores de resistencia bacteriana de *E. coli* presentes en las cepas productoras de BLEE, los resultados revelaron que el gen SHV se encontró presente en un 7,69% (6/78); el gen TEM en un 53,84% (42/78) y el gen CTXM en un 84,61% (66/78).



Gráfica 2. Incidencia de los genes de resistencia antibiótica mediada por betalactamasas.

Fuente: Carrillo, D. 2015

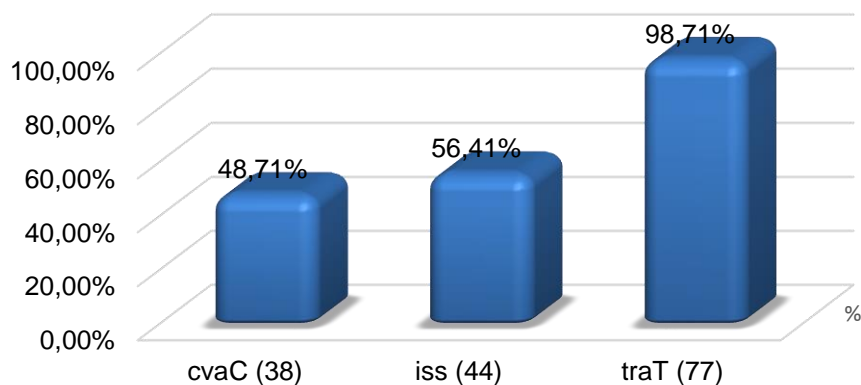
Desde el año 2000, *E. coli* productoras de betalactamasa CTX-M han surgido como la causa más importante del inicio de infecciones del tracto urinario (UTIs) tanto a nivel comunitario como hospitalario, habiendo casi sustituido a las BLEE de los tipos TEM y SHV; este fenómeno se aceleró rápidamente, especialmente durante los últimos 5 años, y hoy estas enzimas son el tipo más común de BLEE encontrado en la mayoría de las áreas del mundo (Calvo, *et al.* 2011). Actualmente, las betalactamasas CTX-M son consideradas como las BLEE más ampliamente distribuidas en diferentes partes del mundo y con alta prevalencia en países de Europa y Sur América (Mantilla, *et al.* 2009). Sin embargo, hay estudios que nos muestran que la distribución de BLEE varía de país a país; generalmente el BLEE tipo TEM predominan en los Estados Unidos, mientras que las BLEE de tipo SHV son las BLEE más frecuentemente aislados en Europa Occidental. La BLEE tipo CTX-M, se han detectado principalmente en América del Sur, Europa del Este, Japón, y más recientemente en España y Kenia. (Coque, *et al.* 2002).

En Venezuela, Marcano, *et al.* (2011); realizó un estudio sobre la caracterización genotípica de muestras uropatógenas resistentes a betalactámicos, en el cual demostró que las dos principales BLEE encontradas con mayor prevalencia fueron las de tipo SHV y CTX-M, compatibles con los porcentajes de resistencia expuestos al uso de los antibióticos ceftazidima y cefotaxima.

En el presente estudio el gen CTX-M tuvo una prevalencia mucho mayor, constituyendo un 84,61% (66/78) de las cepas *E. coli* uropatógenas extraintestinales, estos datos coinciden favorablemente con los resultados obtenidos en otros países de América del Sur en el que la prevalencia concuerda significativamente, además de su relación existente con la resistencia a las cefalosporinas; respecto a las otras SHV y TEM de las cuales se obtuvo una menor incidencia por ser las menos comunes en nuestro continente.

3.3 Caracterización y detección de genes complementarios.

A través de PCR se amplificó e identificó tres genes de virulencia complementarios que le confieren a *E. coli* una mayor resistencia bacteriana a los antibióticos; los resultados revelaron que el gen *traT* estuvo presente en un 98,71% 77(78); el gen *iss* en un 56,41% 44(78) y el gen *cvaC* en un 48,71% 38(78) (Gráfica 3)



Gráfica 3. Frecuencia de los genes que confieren una mayor resistencia bacteriana a *E. coli*.

Fuente: Carrillo, D. 2015

Un aspecto importante en cuanto a la invasión y colonización exitosa, así como la capacidad bacteriana para generar UTIs, es el o los factores de virulencia que exponen las cepas *E. coli* uropatogénicas, entre estos factores se incluyen aquellos que favorecen la adopción de una mayor resistencia bacteriana a los antibióticos, estos están determinados por los genes *traT*, *iss* y *cvaC*.

Estudios realizados en México, dieron como resultado altas prevalencia de genes de virulencia entre ellos *traT* con un 77,8% en 84 (108) cepas analizadas y una prevalencia inferior en *cvaC* de 2,8% en 3 (108) cepas analizadas; además se muestran que generalmente los factores de virulencia están asociados con el grupo filogenético B2 perceptible en la mayoría de las cepas de estudio, conjuntamente se detalla que el gen *cvaC* únicamente fue encontrado en aquellas cepas que pertenecían al grupo B2 y que el gen *traT* estaría posiblemente asociado con el grupo B2 (Lopez, *et al.*2014).

Johnson, *et al.* (2008) estudió el gen *iss* y su predominio en *E. coli*, obteniendo como resultado que el rango de prevalencia del mismo comprende de un 10-33% y que por lo general se encuentra asociado a cepas pertenecientes al grupo filogenético D. Johnson & Adam, (2000) analizaron la relación de los factores de virulencia y determinaron mediante, que ciertamente el gen *cvaC* no se asocia positiva ni significativamente a la presencia de otros factores de virulencia analizados ni a un grupo filogenético específico, es decir éste no es determinante de una patogenicidad colectiva formada por varios factores de virulencia generalmente expuestos por UPEC.

En Estados Unidos, Johnson T, *et al.* (2008), evaluó la prevalencia de los factores de virulencia de *E. coli* uropatógena entre estos, aquellos que confieren una mayor

resistencia a los antimicrobianos; encontrando que el gen *traT* estaba en un 67,8%, seguido del *iss* con un 26,6% y el *cvaC* con un 5,6% en un total de 531 cepas UPEC.

Tabla 7. Relación grupo filogenético y factores de virulencia de resistencia antibiótica.

Gen	Total de cepas (n=78)	Grupos filogenéticos			
		A (n=21)	B1 (n=7)	B2 (n=25)	D (n=25)
<i>traT</i>	77 (98,71%)	21	6	25	25
<i>iss</i>	44 (56,41%)	12	6	14	12
<i>cvaC</i>	38 (48,71%)	14	3	10	11

Fuente: Carrillo, D. 2015

En nuestro estudio el gen predominante fue el *traT* con un 98,71% 77 (78); seguido del gen *iss* con un 56,41% 44 (78) y finalmente el gen *cvaC* con 48,71% 38 (78) (Tabla 7); valores que concuerdan favorablemente con el estudio realizado en Estados Unidos.

La relación existente entre el grupo filogenético y la virulencia expuesta por las cepas de interés, se asocia al grupo filogenético B2 y D ya que como se puede observar el gen *traT* se encontró presente en todas las cepas de dichos grupos, de esta forma se puede confirmar la posibilidad de asociación entre el grupo filogenético B2 y el gen *traT*.

El gen *iss* formó parte de la mayoría de las cepas del grupo B2, sin embargo también incluyó a los grupos A y D sin mayor diferencia porcentual. A más de confirmar que la mayoría de los factores de virulencia que fueron expuestos por nuestras cepas en realidad están relacionados con el grupo filogenético B2.

Finalmente el gen *cvaC* exhibió predominancia en aquellas cepas que estaban dentro del grupo filogenético A, este último lo asociamos a un resultado de heterogeneidad en la distribución de los genes de virulencia y la condición multifactorial y compleja que tiene el potencial patogénico de las cepas UPEC (Millan, *et al.* 2014) y a su vez las características que suele presentar el gen al relacionarlo con otros factores de virulencia y su grupo filogenético.

CONCLUSIONES

Al culminar el estudio realizado en las 78 cepas *E. coli* con diagnóstico microbiológico de *Escherichia coli* con resistencia BLEE positivo, procedente del estudio previo realizado en tres entidades de Salud Pública de la ciudad de Loja durante el periodo Febrero- Septiembre 2013; se pudo ultimar que:

- ❖ Los grupos filogenéticos predominantes presentes en la ciudad de Loja fueron los grupos B2 y D con una prevalencia de similar de 32,05% (25/78), los mismos que se asociaron a la máxima resistencia antibiótica expuesta por las cepas *E. coli* uropatogénicas, especialmente a la ampicilina (AMP) y ampicilina/sulbactam (SAM).
- ❖ Las cepas estudiadas, contaron con genes de resistencia bacteriana, prioritariamente el gen CTX-M siendo la betalactamasa más común con una prevalencia del 84,61%.
- ❖ Las cepas UPEC, dispusieron de genes determinantes de los factores de virulencia, entre estos aquellos que favorecen la adopción de una mayor resistencia bacteriana de *E. coli* frente a los antibióticos.
- ❖ Los resultados obtenidos nos revelan que las UTIs aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados provienen de un grupo diverso de cepas *E. coli*, distribuidas en los principales grupos filogenéticos; lo cual se relaciona con la máxima resistencia antibiótica expuesta y la presencia de factores de virulencia que incrementan su resistencia antimicrobiana, como resultado de la problemática en cuanto a la mejora de un tratamiento.

RECOMENDACIONES

- ❖ Se recomienda ampliar el estudio obteniendo convenios con otras entidades de Salud Pública de Loja, con la finalidad de obtener un muestreo mayor y lograr un estudio a nivel provincial, con la finalidad de conseguir ampliar y actualizar los datos de resistencia bacteriana en Ecuador.
- ❖ Se sugiere el análisis de los resultados obtenidos junto con el estudio de la determinación del estatus *ExPEC* y los genes determinantes de los factores de virulencia, para asociar la patogenicidad junto con la resistencia bacteriana expuesta por las cepas *E. coli* uropatogénicas.
- ❖ En caso de estudios futuros se recomienda el análisis de las variantes de los genes de resistencia antibiótica, especialmente: CTX-M15, CTX-M32, y CTX-M1 y CTX-M9, ya que según Millán, *et al.* (2014) estas variantes son aquellas que están comúnmente presentes en Latinoamérica.

BIBLIOGRAFIA

- Alizade, H., Ghanbarpour, R., & Aflatoonian, M. (2014). "Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from diarrheic and urinary tract infections in relation to phylogeny in southeast of Iran. *Tropical Medicine*, 31(1), 174-182.
- Alvarez, D. (2010). Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 9(4), 516-524.
- Arce, Z., Llontop, J., Flores, R., & Fernández, D. (2013). Detección del gen CTX-M en cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido procedentes del Hospital Regional de Lambayeque.
- Arenas , M., Navarro, A., Martínez, A., & Martínez, Y. (2013). Identificación de *Escherichia coli* uropatógena por reacción en cadena de la polimerasa múltiple y serotipificación. *Centro de Investigaciones en Ciencias Biomédicas*, 1-5.
- Ausina, V., & Moreno, S. (2005). Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana.
- Biomérieux. (2004). Obtenido de Medios de Cultivo: http://www.biomerieux.com.mx/upload/CATALOGO_DE_PLACAS11.pdf
- Blanc, V. (2007). Caracterización de cepas y plásmidos de Enterobacteraceae portadores de b- lactamasas de espectro extendido. Departamento de genética y de microbiología, 10-11.
- Brooks, G., Carrol , K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2011). Microbiología Medica Jawet, Melnick, Adelberg. *Mc Graw Interamericana Editores SA de CV*, 145-157.
- Calvo, J., Cantón, R., Fernández, F., Mirelis , B., & Navarro, F. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 1-54.
- Cardona, M., Castaño , J., Coral , S., Gallo, X., Gañán , A., García, Y., . . . Villegas, O. (2011). Comportamiento de la sensibilidad y resistencia en urocultivos de pacientes adultos con infección urinaria en Manizales. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 11(1), 9-22.
- Chalán, J. (2014). Resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del hospital "Manuel

Ygnacio Monteros" durante el periodo octubre-noviembre 2013. Tesis de grado no publicada. Universidad Tecnica Particular de Loja.

- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, N. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic. *Applied and environment microbiology*, 66(10), 4555-4558.
- Coque, T., Oliver, A., Pérez, J., Baquero, F., & Cantón, R. (2002). Genes Encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 Extended-Spectrum β -lactamases Are Carried by Multiple *Klebsiella pneumoniae* Clones in a Single Hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2), 500-510.
- Dini, C. (2001). Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Facultad de Ciencias Exactas, 1-142.
- Duplessis, C. (2011). Urophatogenic *Escherichia coli*. The Female Patient.
- Enríquez, E. (2013). Genotipificación de factores de virulencia de *Escherichia coli* urinarias, no complicadas, complicadas y recurrentes en mujeres mayores de 18 años, del Hospital Carlos Andrade Marín durante los años 2010 y 2011. Escuela de Bioanálisis, 1-127.
- Fernández , B., López, J., Coto , G., Ramos , A., & Ibáñez, A. (2008). Meningitis Neonatal. Servicio de Neonatología. Asociación Española de Neonatología, 1-12.
- Forbes, B., Sahm , D., Weissfeld, A., & Trevino, E. (2007). Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Fox, A. (2015). Microbiology and Immunology. México: Third Edition .
- Gales, A., Castanheria, M., Jones, R., & Sader, H. (2012). Antimicrobial resistance among Gram- negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 73, 354-360.
- Gómez , J., Muñoz, R., Baños, V., & Gomez , G. (2012). Tratamiento de las Infecciones urinarias adquiridas en la comunidad: perspectivas actuales y enfoque clínico del paciente. Sociedad Española de Quimioterapia, 18(4), 319-327.
- Guillén , L., Millán , B., & Araque , M. (2014). Caracterización Molecular de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. 18(3), 100-108.

- Homa, Q., Silva, D., Taboada, V., & Ortíz, T. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Rev Med Hered*, 16(1).
- Humphrey, B., Thomson, N., Thomas, C., Brooks, K., Sanders, M., Delsol, A., Roe, J., & Enne, V. (2012). Fitness of *Escherichia coli* strains carrying expressed and partially silent IncN and IncP1 plasmids. *BioMed Central*, 12(53).
- Ibrahim, E., Sherman, G., Ward, S., Frasem, V., & Kollef, M. (2000). The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest*, 118, 146-155.
- INEC . (2012).
- Iranpour, D., Hassanpour, M., Ansari, H., Tajbakhsh, S., Khamisipour, G., & Najafi, A. (2014). Phylogenetic groups of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urinary Tract Infection in Iran Based on the New Clermont Phylotyping Method. *BioMed Research International*, 7.
- Johnson, J., & Stell, A. (2000). Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 261-272.
- Johnson, J., O'bryan, T., Kuskowski, M., & Maslow, J. (2001). Ongoing Horizontal and Vertical Transmission of Virulence Genes and *papA* Alleles among *Escherichia coli* Blood Isolates from Patients with Diverse- Source Bacteremia. *Infect and Immunity*, 69(9), 5363-5374.
- Johnson, T., Wannemuehler, Y., & Nolan, L. (2008). Evolution of the *iss* Gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2360-2369.
- Johnson, J., Kuskowski, M., & Maslow, J. (2003). Phylogenetic Origin and Virulence Genotype in Relation to Resistance to Fluoroquinolones and/or Extended-Spectrum Cephalosporins and Cephamycins among *Escherichia coli* Isolates from Animals and Humans. *The Journal of Infectious Diseases*, 188, 759-768.
- Kang, C., Kim, S., Park, W., Lee, K., Kim, H., Kim, E., Oh, M & Choe, K. (2005). Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram- negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 760-766.

- Karlowsky , J., Kelly, L., Thomsberry, C., Jones, M., & Sahm, D. (2002). Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 2540-2545.
- Kawamura-Sato, K., Yoshida, R., Shibayama, K., & Ohta, M. (2010). Virulence Genes, Quinolone and Fluoroquinolone Resistance, and Phylogenetic Background of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis*, 63, 113-115.
- Liu, D. (2015). Diarrhoeagenic *Escherichia coli*. En Tang, Y., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I. & Schwartzman, J. *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition) (pp. 1133-1146). London: Elsevier Ltd.
- López, D., Carrillo, E., Leyva, M., Orozco, G., Manjarrez, A., Arroyo, S., Moncada, D., Villanueva, S., Xicohtencatl, J & Hernández, R. (2014). Identification of Virulence Factors Genes in *Escherichia coli* Isolates from Women with Urinary Tract Infection in Mexico. *BioMed Research International*, 10.
- Mantilla, J., Barreto, E., Reguero, M., & Velandia, D. (2009). Identificación por PCR -SSCP de genes bla[CTX-M]. Universidad de Colombia. Instituto de Biotecnología, 22.
- Marcano, D., De Jesús, A., Hernández, L., & Torres, L. (2011). Frecuencia de enzimas asociadas a la sensibilidad disminuída a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela. *Rev Panam Salud Pública*, 30(6), 529-539.
- Marrs, C., & Cols. (2005). *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes. *FEMS Microbiology Letters*, 252, 183-190.
- Malla, Y. (2014). Resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del hospital "Manuel Ygnacio Monteros" durante el periodo octubre-noviembre 2013. Tesis de grado no publicada. Universidad Técnica Particular de Loja .
- Maynard, C., Bekal, S., Sanschagrín, F., Levesque, R., Brousseau, R., Masson , L., Larivière, S & Harel, J. (2004). Heterogenicity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolated of animal and human origin. *J Clin Microbiol*, 42, 5444-5452.

- Millán, Y., Hernández, E., Millán, E., & Araque, M. (2014). Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatogénica productora de β -lactamasas CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Revista Argentina Microbiología*, 46(3), 175-181.
- Miyahira, J. (1994). Infección Urinaria. *Rev Med Hered*, 5(2), 97-107.
- Mojerón, M. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*, 52(4), 272-280.
- NCBI. (27 de Junio de 2015). *National Center for Biotechnology Information*. Obtenido de National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Osgui, L., Pestana de Castro, A., Lovine, R., Irino, K., & Carvalho, V. (2014). Virulence genotypes, antibiotic resistance and the phylogenetic background of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections of dogs and cats in Brazil. *Vet Microbiol*, 171, 242-247.
- Pitout, D., Hanson, N., Church, D., & Laupland, K. (2004). Population-based laboratory surveillance of *Escherichia coli*-producing extended-spectrum betalactamasas: importance of community isolates with blaCTX-M genes. *Clin Infect Dis*, 38, 1736-1741.
- Pitout, J. (2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 3(9).
- Prats, G. (2005). *Microbiología Clínica*. Madrid, España: Editorial Medica Panamericana S.A.
- Prats, G. (2013). *Microbiología y parasitología médicas*. España: Medica Panamericana.
- Rasheed, J., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., . . . Tenover, F. (1997). Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*, 41, 647-653.
- Rivera, R. (2013). Resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes hospitalizados del Hospital "Manuel Ygnacio Monteros" durante el periodo agosto-septiembre 2013. Tesis de grado no publicada. Universidad Técnica Particular de Loja

- Romero , R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. México: Editorial Medica Panamericana .
- Rupp, M., & Fey, P. (2003). Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: considerations for diagnostic, prevention and drug treatment. *Drugs*, 63, 353-365.
- Saladin , M., Cao, V., Lambert, T., Donay , J., Herrmann, J., Ould-Hocine , Z., Vedet, C., Delisle, F., Philippon, A & Arlet, G. (2002). Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett*, 20(9), 161-168.
- Signorini , M., Marín , V., Quinteros, C., & Tarabla, H. (2009). Hábitos del consumo de hamburguesas y riesgo de exposición a *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC): modelo de simulación. *Rev. Argent Microbiol*, 41(3).
- Simarro , E., Navarro, F., Ruíz, J., Miró, E., Gómez, J., & Mirelis, B. (2000). Salmonella entérica serovar virchow with CTX-M-like beta-lactamase in Spain. *J Clin Microbiol*, 38, 4676-4678.
- Sociedad Ecuatoriana de Medicina Familiar (SEMF). (2006). Diagnóstico y manejo de las infecciones de las vías urinarias no complicadas .
- Susan , A., & Mehnert-Kay, M. (2005). Diagnostic and Management of Uncomplicated Urinary Tract Infections. *Am Fam Physician*, 1(3), 451-456.
- Tafur, J., Torres, J., & Villegas, M. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Revista Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, CIDEIM*, 12(3), 217-226.
- Tenover, F. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control*, 34, 3-10.
- Torres , M., & Mattera, A. (2008). Infección urinaria . Higiene, 189-196.
- Torres, A. (2014). Resistencia bacteriana de bacilos Gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del hospital "Manuel Ygnacio Monteros" durante el periodo agosto-septiembre 2013. Tesis de grado no publicada. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Tumbaco, A., & Martínez, L. (2013). Factores de riesgo que influyen en la predisposición de infecciones urinarias en mujeres 15-49 años que acuden al

subcentro Virgen del Carmen del Cantón la Libertad 2012-2013. Facultad de ciencias sociales y de la salud, 3.

- Vásquez, C. (2011). *Escherichia coli* Patógeno aviar . Guayaquil-Ecuador.
- Vidal , J. (2003). *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. *Salud en Tabasco*, 9(1), 188-193.
- Vidal, R., & Lemoine, G. (2000). "La lucha por la sobrevivencia: Las bacterias se protegen de la acción letal de las colicinas formadoras de canales". *VITAE. Academia Biomédica Digital*(1), 1-10.
- Viñas, M., Sanz, M., Padola, N., Etcheverría , A., & Parma, A. (2000). *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC): su transmisión por alimentos. Las *Escherichia coli* VTEC y su asociación con enfermedades. 10(55).