



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**UNIDAD ACADÉMICA CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

---

---

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE  $\beta$ -  
LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN  
*Escherichia coli* AISLADAS DE ITU EN LA COMUNIDAD**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:

**Jesús Antonio Hernández Vergara**

**Directora:**

Dra. Natividad Castro Alarcón

CHILPANCINGO DE LOS BRAVO, GUERRERO, NOVIEMBRE 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 03 días del mes de julio de dos mil quince, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "**Caracterización fenotípica y genotípica de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* aisladas de ITU en la comunidad**", presentada por el alumno Jesús Antonio Hernández Vergara, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Natividad Castro Alarcón  
Dirección de tesis

Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame

Dra. Amalia Vences Velázquez

Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán

Dr. Jesús Silva Sánchez

Vo. Bo

Dra. Isela Parra Rojas  
Coordinadora del Posgrado de la Unidad  
Académica de Ciencias Químico Biológicas

Vo. Bo

Dra. Amalia Vences Velázquez  
Directora de la Unidad Académica de Ciencias  
Químico Biológicas



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Microbiología de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Natividad Castro Alarcón

Y la asesoría de:

Dr. Jesús Silva Sánchez

Dra. Amalia Vences Velázquez

Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán

Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame

Con la colaboración del:

Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública

Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme permitido culminar de manera exitosa esta etapa de mi vida y a todas aquellas personas que me ayudaron y brindaron el apoyo para que este trabajo se finalizara de manera exitosa.

Agradezco a la Dra. Natividad Castro Alarcón, por toda la paciencia, orientación y supervisión brindada; al Dr. Jesús Silva Sánchez por haber aceptado en colaborar en este estudio y por todas las aportaciones realizadas.

A mis padres Norma Angélica Vergara Cabrera y Antonio Hernández Regules por brindarme siempre todo el apoyo necesario, las enseñanzas y el amor de ustedes hacia mí, ya que sin eso hubiera sido muy difícil.

A mi hermano Miguel Ángel Hernández Vergara por motivarme en los momentos más difíciles y por el apoyo que siempre me brinda y motiva a seguir adelante

A Dulce Rosario Alberto Aguilar por todo el amor y la motivación que brindada al igual que muchos consejos, hicieron que todo esto fuera más fácil.

A mis amigos del laboratorio de investigación en microbiología, Romina, Elena, Arely, Raziél, Tavira y Monse. A los amigos de Maestría Judit, Monse, Barrera, Ocampo, Ana, Johana y a los VIP Cesar, Martha y la Dra. Moni. A los amigos de la UACQB Tere y Marco por hacer que esta estancia haya sido muy buena. Un agradecimiento especial a mi amigo Hugo Alberto por el apoyo incondicional en la extracción de plásmidos.

Durante los estudios de maestría conté con el apoyo financiero de la beca CONACYT, la cual me permitió ocuparme de tiempo completo en la realización de mi trabajo de tesis.

Se agradece el apoyo y la enseñanza de la química María Ruiz Rosas de la clínica del ISSSTE de Chilpancingo Guerrero por haber proporcionado las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este estudio

## ÍNDICE

<b>I.- RESUMEN</b>	6
<b>II.- ABSTRACT</b>	7
<b>III.- INTRODUCCIÓN</b>	8
<b>IV.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	11
<b>V.- RESULTADOS</b>	16
<b>VI.- DISCUSIÓN</b>	24
<b>VII.- CONCLUSIÓN</b>	26
<b>VIII.- ANEXOS</b>	29
<b>IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	37

## I.- RESUMEN

**Introducción:** *Escherichia coli* es causante de 75%-90% de los casos de infecciones del tracto urinario (ITU) en pacientes ambulatorios, el tratamiento es de manera empírica y hay una falla debido a la multirresistencia bacteriana, así como a la producción de B-lactamasas de espectro extendido (BLEE). El objetivo del estudio fue caracterizar fenotípica y molecularmente las BLEE producidas por *E. coli* aisladas de ITU en la comunidad del estado de Guerrero. **Metodología:** Se recuperaron 131 aislamientos clínicos de *E. coli* durante Enero a Agosto de 2014 de ITU. La identificación y la susceptibilidad a antibióticos se realizaron por el sistema automatizado Vitek. Se determinó el grupo filogenético y el grupo O25b-ST13 por una PCR múltiple. La identificación de genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> por PCR. Se realizaron conjugaciones y extracción de plásmidos. **Resultados:** El 85.07% de los aislamientos fue resistente a Ampicilina, 65.67% a Ampicilina/Sulbactam, 61.94% a Cefazolina, 57.46% a Ceftriaxona, 58.96% a Cefepima, 58.21 a Aztreonam, 32.84% a Gentamicina, 32.09% a Tobramicina, 57.46% a Ciprofloxacino, 57.46% a Moxifloxacino, 10.45% a Nitrofurantoina y 67.91% a Trimetoprima/Sulfametoxazol. El 56.49% (74 cepas) fueron productoras de BLEE, el grupo filogenético B2 (74.81%) fue el más predominante comparado con los otros grupos A (8.4%), B1 (3.05%) y D (13.74%). La prevalencia de genes fueron *bla*<sub>CTX-M</sub> (38.17%) *bla*<sub>SHV</sub> (30.53%) y *bla*<sub>TEM</sub> (54.96%). **Conclusión:** La multirresistencia en *E. coli* causantes de ITU está asociada significativamente a la producción de BLEE. Las beta-lactamasas tipo CTX-M-15 y SHV están asociadas al grupo filogenético B2 y codificadas en plásmidos grandes y pequeños que son transferidos por conjugación.

**PALABRAS CLAVE:** *E. coli*, ITU, BLEE, Multirresistencia.

## II.- ABSTRACT

**Introduction:** *Escherichia coli* is the cause of 75% -90% of cases of urinary tract infection (UTI) in outpatient treatment is empirically and there is a failure due to bacterial multidrug resistance and the production of B lactamasas of extended spectrum (ESBL). The study aimed to characterize molecular and phenotypic ESBLs produced by *E. coli* isolated from ITU in the community of Guerrero.

**Methodology:** 131 clinical isolates of *E. coli* were recovered from ITU during January to August 2014. ITU Identification and antibiotic susceptibility were performed by Vitek automated system. Phylogenetic and O25b-ST13 groups were determined by multiple PCR. Identifying  $bla_{CTX-M}$ , and  $bla_{TEM}$   $bla_{SHV}$  genes by PCR. Conjugations and extraction of plasmids were performed. **Results:** 85.07% of the isolates were resistant to ampicillin, 65.67% to Ampicillin / Sulbactam, 61.94% to cefazolin, 57.46% to ceftriaxone 58.96% to cefepime, aztreonam 58.21, 32.84% to gentamicin, tobramycin 32.09%, 57.46% ciprofloxacin, moxifloxacin 57.46, 10.45% to 67.91% nitrofurantoin and trimethoprim / sulfamethoxazole. The 56.49% (74 strains) were ESBL producers, B2 (74.81%) phylogenetic group was the most predominant compared to the other groups A (8.4%), B1 (3.05%) and D (13.74%). The prevalence of genes were  $bla_{CTX-M}$  (38.17%)  $bla_{SHV}$  (30.53%) and  $bla_{TEM}$  (54.96%). **Conclusion:** multidrug resistance in *E. coli* causing UTI is significantly associated with ESBL production. Beta-lactamasas CTX-M-15 and SHV are associated with phylogenetic group B2 and encoded in large and small plasmids that are transferred by conjugation.

**KEYWORDS:** *E. coli*, ITU, ESBL, Multidrug.

### III.- INTRODUCCIÓN

Las Enterobacterias son las bacterias causante de numerosas infecciones del tracto urinario (ITU), *Escherichia coli* es la causante de 75%-90% de los casos en pacientes ambulatorios principalmente entre las mujeres (Manjarrez-Hernández, 2012). Las ITU se caracterizan por una notable morbilidad, se ha estimado 150 millones de infecciones urinarias por año en todo el mundo, lo que implica un alto consumo de antibióticos (Navarro-Navarro *et al.*, 2013). Las diferencias entre *E. coli* patógenas y comensales se correlacionan con sus antecedentes filogenéticos, dividiendo a las cepas de *E. coli* en cuatro grupos: A, B1, B2 y D (Clermont *et al.*, 2000). Así, las cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales, incluyendo las ITU y la sepsis, derivan principalmente del grupo B2 y en menor proporción del grupo D, y poseen gran número de determinantes de virulencia que promueven funciones patogénicas. Mientras que los comensales derivan de los grupos A y B1 y poseen pocos determinantes de virulencia (Moreno, 2006).

En los últimos años se han reportado altas tasas de resistencia de *E. coli* a cefalosporinas de segunda y tercera generación, principalmente debido a la aparición de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Horcajada *et al.*, 2005). Estas enzimas están codificadas en genes *bla*, ya sea en el cromosoma bacteriano o en plásmidos extracromosómico. La diseminación de estos genes de resistencia a los antibióticos betalactámicos se debe a las tasas combinadas de mutación *novo* y a la transferencia horizontal de genes (transformación, transducción y conjugación) (Giedraitienė *et al.*, 2011). La conjugación es el proceso promovido por determinados tipos de plásmidos, que portan un conjunto de genes cuyos productos participan en el proceso y que requieren contactos directos entre ambas células, con intervención de estructuras superficiales y de funciones específicas (Bennett, 2008).

El mecanismo de acción de los beta-lactámicos incluye la unión a proteínas de unión a penicilina (PBP), transpeptidasas y carboxipeptidasas implicadas en la formación de las cadenas de peptidoglicano de la pared bacteriana (Canton, *et al* 1999). Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico antes

que el antibiótico se una a las PBP. A pesar de que todas las  $\beta$ -lactamasas van a catalizar la misma reacción, se han clasificado en diferentes formas: en su secuencia de aminoácidos, peso molecular o especificidad del sustrato (Bush y Jacoby, 2010). Más de 500 diferentes beta-lactamasas se han descrito, y este número está aumentando rápidamente cada año, por la secuencia de aminoácidos. Las betalactamasas se clasifican en cuatro clases moleculares: A, B, C, y D. (Rubtsova *et al.*,2010). Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL) pertenecen al grupo funcional 2, subgrupo 2be y a la clase molecular A y son la principal fuente de resistencia a oximino-cefalosporinas en enterobacterias. La mayoría de las BLEE son mutantes de enzimas TEM y SHV, pero las enzimas CTX-M son cada vez más importante. Las BLEE se originaron a partir de las betalactamasas de amplio espectro del grupo 2b (TEM-1 y SHV) al grupo 2be que denota el espectro extendido y difiere de su progenitor por pocos cambios en su secuencia de aminoácido (Paterson y Bonomo, 2005). Los tipos CTX-M son diversos, con más de 30 alelos se dividen en cinco grupos filogenéticos distintos y han evolucionado a través de la fuga genética y la mutación de genes cromosómicos (Woodford *et al.*, 2004). La BLEE CTX-M son mucho más activas contra cefotaxima y ceftriaxona que contra ceftazidima (Edelstein *et al.*, 2003). Actualmente se conocen más de 80 tipos de CTX-M (Pallecchi *et al.*, 2007). La BLEE tipo TEM, son encontradas con mayor frecuencia en bacterias Gramnegativas, prevaleciendo en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Esta enzima es capaz de hidrolizar las cefalosporinas, y tiene un aspecto más amplio de sustratos (Du Bois, *et al.*,1995). Las enzimas SHV confiere resistencia a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera generación; se ha encontrado en cepas de *K. pneumoniae*, aunque también se ha descrito en *E. coli* (Livermore, 1995). Casi todos los genes de codificación de BLEE tipo SHV tienen mutaciones G/A, que especifican glicina/serina y glutamato/lisina sustituciones en los aminoácidos 238 y 240, respectivamente. En general, la sustitución en la posición 238 (SHV-2) confiere un gran aumento en la resistencia a cefotaxima, mientras que la sustitución adicional en la posición 240 (SHV-5) confiere un gran aumento en la resistencia a la ceftazidima. Mientras tanto, 101 mutantes SHV diferentes han sido

reconocidos en todo el mundo debido a que los genes que codifican estas enzimas se encuentran en plásmidos (Howard *et al.*,2002).

La mayoría de los genes *bla* se encuentran en plásmidos conjugativos y son transferidos fácilmente entre las especies bacterianas mediante la transferencia horizontal de genes (Woerther *et al.*,2010). Los genes que codifican para BLEE forman parte de integrones o transposones, mismos que le confieren gran capacidad de transferir sus genes de resistencia al asociarse con otros determinantes genéticos (Mosquito *et al.*,2011). La diseminación de estos elementos genéticos se ha convertido en un problema epidemiológico de gran importancia clínica, ya que pueden llevar otros genes que confieren resistencia a otros agentes antimicrobianos, como aminoglucósidos y fluoroquinolonas, que pueden ser transferidos entre especies no relacionadas (Quinteros *et al.*, 2003). Las bacterias productoras de BLEE han emergido como el principal problema en pacientes de la comunidad, estos organismos son responsables de una variedad de infecciones, como ITU (Rawat y Nair, 2010).

En México hay pocos reportes sobre los genotipos de BLEE producidos por Enterobacterias en los grupos comunitarios. El incremento de la prevalencia *E. coli* multiresistentes en ITU requiere de la vigilancia de este microorganismo, así como medidas para evitar la diseminación de la resistencia a antibióticos. El objetivo del estudio fue caracterizar fenotípica y molecularmente las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido producidas por *E. coli* aisladas de ITU en el estado de Guerrero.

#### IV.- MATERIAL Y MÉTODOS

**Aislamientos clínicos y susceptibilidad a antibióticos:** Se analizaron muestras clínicas de orina de pacientes ambulatorios que acuden a la clínica del ISSSTE Chilpancingo en el periodo Enero-Agosto del 2014. El urocultivo se llevó a cabo en medios convencionales y los aislamientos clínicos significativos de ITU fueron identificados por el sistema automatizado Vitek, al mismo tiempo se realizaron las pruebas de susceptibilidad a antibióticos como Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefazolina, Ceftriaxona, Cefepime, Aztreonam, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Amikacina, Gentamicina, Tobramicina, Ciprofloxacino, Moxifloxacino, Nitrofurantoina y Trimetoprima/Sulfametoxazol. Posteriormente los aislamientos fueron conservados en glicerol al 30% en congelación a  $-72^{\circ}\text{C}$ , para su estudio posterior.

**Determinación de betalactamasas de espectro extendido:** Se realizó la prueba de doble disco combinado, utilizando discos de papel de filtro impregnados con  $30\mu\text{g}$  de ceftazidima (CAZ) y discos con  $30\mu\text{g}$  de cefotaxima (CTX), además de discos combinados con los mismos antibióticos y ácido clavulánico ( $10\mu\text{g}$ ). La confirmación o no de la producción de BLEE, se realizó midiendo el diámetro de inhibición, el cual debería ser superior a 5 mm, en comparación con el halo de inhibición mostrado por el microorganismo cuando el antimicrobiano es usado individualmente, Se utilizó *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo y la cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 como control positivo (CLSI, 2014) (Anexo 1).

**Extracción de DNA:** Se llevó a cabo por choque térmico, de 2 a 3 colonias bacterianas fueron suspendidas en  $100\mu\text{l}$  de agua, se hirvieron 5 min y se colocaron en hielo 5 min, repitiendo el procedimiento. La suspensión se centrifugó 2 min a 10000 rpm, y el sobrenadante fue separado y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Grupo filogenético:** Los antecedentes filogenéticos (A, B1, B2 y D) se determinaron por medio de una PCR múltiple, utilizando tres marcadores de DNA

(Clermont *et al.*, 2000). Este método se basa en la amplificación de un fragmento de DNA desconocido, denominado TSPE4C.2, y de dos genes, *chuA*, receptor hemo y *yjaA* cuya función no se conoce. La presencia combinada de los genes indica el grupo filogenético al que pertenecen, tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Determinación de grupo filogenético *E. coli* (Clermont *et al.*, 2000)

Grupo filogenético	Fragmentos de DNA
A	<i>chuA</i> -, <i>TspE4.C2</i> -
B1	<i>chuA</i> -, <i>TspE4.C2</i> +
B2	<i>chuA</i> +, <i>yjaA</i> +
D	<i>chuA</i> +, <i>yjaA</i> -

Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 2. Los componentes de la mezcla de reacción fueron los siguientes: 2  $\mu$ l del buffer 10X (suplementado con *Taq* polimerasa), 20 pmol de cada primer y una concentración de 2mM de cada dNTPs, 2.5 U de *Taq* polimerasa, y 200 ng de DNA genómico. Las condiciones fueron las siguientes: Desnaturalización por 5 min a 94°C, 30 ciclos de 30 s a 94°C 30 s a 55°C, y 30 s a 72°C y una extensión final de 7 min a 72°C. La PCR fue realizada en un Termociclador Gene Amp® PCR System 2400 (Applied Biosystems, USA).

Tabla 2. Secuencia de iniciadores para identificar el grupo filogenético (Clermont *et al.*, 2000)

Genes	Iniciadores	Tamaño del fragmento
<i>chuA</i>	5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3' 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3' GACGAACCAACGGTCAGT	279pb
<i>yjaA</i>	5'-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-3' 5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'	211pb
<i>tspE4C2</i>	5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3' 5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'	152pb

**PCR de grupo O25b-ST131:** Dos pares de oligonucleótidos fueron utilizados: O25pabBspeF (5'-TCCAGCAGGTGCTGGATCGT-3') y O25pabBspe.R (5'-GCGAAATTTTTCGCCGTACTGT-3') que amplifican un fragmento de 347 pb; el rf.lbis (5'-ATACCGACGACGCCGATC-3') y rfbO25b.r (5'-TGCTATTCATTATGCGCAGC-3') que amplifican un fragmento de 300 pb. Los aislamientos que amplifican ambos fragmentos pertenecen al grupo O25b-ST131, los que amplifican únicamente el fragmento de 300pb pertenecen al grupo O25b y los que amplifican únicamente el fragmento de 247pb pertenecen al grupo ST131. La PRC múltiple se llevó a cabo únicamente a los aislamientos que pertenecieron al grupo B2 bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización 2 min a 94°C, 30 ciclos de 94°C 30s, 60°C 10s, 72°C 30s y una extensión final de 72°C 2min. Utilizando el termociclador Gene Amp® PCR System 2400 (Applied Biosystems, USA) (Clermont *et al.*, 2008; Clermont *et al.*, 2009).

**Detección de genes *bla* por PCR:** Para la identificación de genes *bla* se utilizaron iniciadores específicos para genes *bla* (TEM, SHV y CTX-M-15), mostrados en la tabla 3. La mezcla de reacción se realizó en un volumen de 25  $\mu$ l, con 5 unidades de Taq-polimerasa, 10 mM de dNTP's, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, buffer amplificador de PCR 10 X, se emplearon 10 pmol de cada oligonucleótido y 5  $\mu$ l de ADN molde. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 2% a 100 V por 30 min, donde se verificó el tamaño del ADN amplificado, utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y se observaron en un fotodocumentador de luz UV. Se utilizó como control negativo a *E. coli* ATCC 25922, así como controles positivos de cepas de *E. coli* productoras de BLEE (SHV-2, TEM-1, CTX-M-15).

Tabla 3. Secuencia de iniciadores para la identificación de genes *bla*

GEN	INICIADORES	TAMAÑO DEL FRAGMENTO	REFERENCIA
<i>BLA<sub>TEM</sub></i>	5'CTTCCTGTTTTGCTCACCCA3' 5'TACGATACGGGAGGGCTTAC3'	672pb	Castillo 2007
<i>BLA<sub>SHV</sub></i>	5'ATGCGTTATATTCGCCT' 5'TTAGCGTTGCCAGTGCTCGAT3'	861pb	Prodinger <i>et al.</i> , 1996
<i>BLA<sub>CTX-M</sub></i>	5'TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA3' 5'CGATATCGTTGGTGGTGCCATA3'	544pb	Maina <i>et al.</i> , 2012

**Conjugación bacteriana:** Se llevó a cabo por el método descrito por Miller, 1992, que consiste en hacer crecer un cultivo bacteriano de la cepa receptora (*Escherichia coli* J53) y de las donadoras (cepas de los aislamientos clínicos), dejándolas incubar por 3 horas a 37°C en agitación. Después estas bacterias se plaquean en medios selectivos con azida de sodio mas ampicilina (AMP) y azida de sodio mas ceftazidima (CAZ) como controles. Posteriormente se hace mezcla de estas bacterias 200µl de la cepa donadora (aislamiento) y 800µl de la receptora (J53) que se incubaron a 37°C sin agitación por 3 horas. 100 µl de la mezcla fueron plaqueados nuevamente en los medios selectivos (AZ+AMP) y (AZ+CAZ). Las colonias obtenidas se replicaron con palillos en medios M9 y MM, para observar la capacidad de transferencia plasmídicas entre las bacterias de manera horizontal y corroborar que nuestros aislamientos fueran transconjugantes (Anexo 2).

**Extracción de plásmidos:** La extracción de los plásmidos se realizó por dos métodos. El primero fue de acuerdo a la técnica descrita por Kieser, 1984. Las cepas se sembraron en 5 ml de caldo Luria-Bertoni (LB) y se incubaron en agitación a 37°C toda la noche, se obtuvieron pastillas de las células bacterianas centrifugadas a 3500 rpm durante 30 min, y se re suspendieron en 400 µl de solución (SOLUCIÓN I), se colocaron en hielo 30 minutos. Posteriormente se le adicionaron 125 µl de SOLUCIÓN II, se homogenizó y se incubaron a 55°C durante 30 minutos. Para la obtención del DNA plasmídico se adicionaron 80 µl de

fenol-cloroformo, centrifugando durante 8 minutos a 4°C, el patrón de plásmido se analizó en un gel de agarosa al 7% teñido con bromuro de etidio en una cámara de electroforesis a 80 V por 6 horas, el gel se observó en un fotodocumentador de luz UV. El segundo método fue para detectar plásmidos más pequeños utilizando el kit Plasmid Miniprep y siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1% y se utilizó como marcador la cepa control la cepa 50192 que contiene 4 plásmidos de 154kb, 66kb, 48kb y 7kb (Anexo 3,4).

**Concentración mínima inhibitoria (MIC):** Se determinó por duplicado por microdilución en caldo en placas de fondo plano de 96 pozos. Utilizando concentraciones para CAZ de 256 - 0.03  $\mu\text{g/ml}$  y de CTX de 256 - 0.015  $\mu\text{g/ml}$  en caldo Mueller-Hinton. Se sacan las concentraciones con las cuales se trabajara, una vez que tienen todas las concentraciones, cada pozo fue llenado con 100 $\mu\text{l}$  de cada antibiótico y se agregaron 100 $\mu\text{l}$  de una difusión 1:20 de la bacteria (previamente ajustada al 0.5 del nefelómetro de Mac Farland). Las placas fueron incubadas a 35°C durante 18 horas. Para esta prueba se utilizó como control positivo la *E. coli* 25922 que tiene como punto de corte para CAZ 0.06 -0.5  $\mu\text{g/ml}$  y para CTX 0.03 - 0.12  $\mu\text{g/ml}$  (CLSI, 2014).

**Análisis de resultados:** Todos los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del software STATA-TRANSFER v.12.0. Utilizando la prueba de  $X^2$  para hacer la correlación de producción de BLEE y la susceptibilidad a antibióticos. Para la comparación de proporciones entre el grupo filogenético y genes *bla*, se utilizó la prueba exacta de Fisher. Todos los valores de  $p$  menor a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

## V.- RESULTADOS

**Susceptibilidad a antibióticos.** Durante el periodo de estudio, la bacteria más frecuentemente aislada de ITU fue *E. coli*, se recuperaron 131 aislamientos (uno de cada paciente). El porcentaje de resistencia a antibióticos de todos los aislamientos se muestran en la figura 1, observando una resistencia mayor del 50% a los antibióticos betalactámicos (ampicilina, ampicilina/sulbactam, Cefazolina, Ceftriaxona, Cefepime y Aztreonam), sin embargo, todos los aislamientos fueron sensibles para carbapenémicos. La resistencia a Quinolonas fue mayor del 58%, Aminoglucósidos mayor del 30% con excepción a Amikacina que presentó una sensibilidad del 100%. Para Trimetoprima/Sulfametoxazol la resistencia fue mayor del 60%. Los aislamientos fueron clasificados como multidrogoresistente (MDR) debido a que el 57% de los aislamientos fueron resistentes a tres o más grupos de antibióticos.

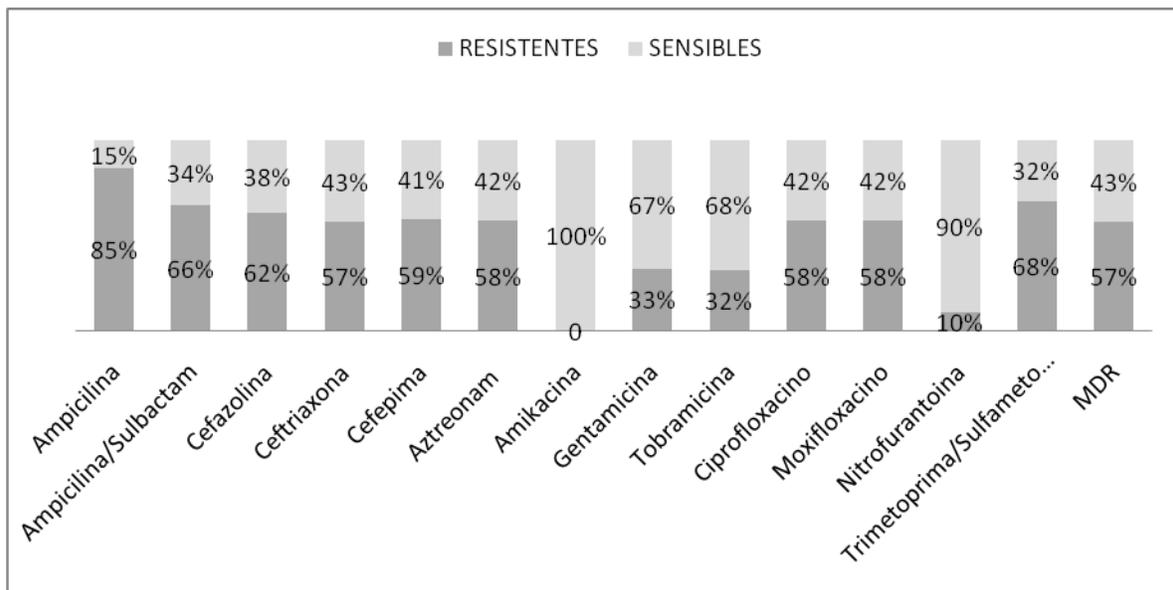


Figura 1. Prevalencia de la susceptibilidad a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de infecciones del tracto urinario en la Clínica Hospital del ISSSTE Chilpancingo.

**Producción de BLEE.** Se realizó la prueba de doble disco combinado en todos los aislamientos clínicos, (Anexo 6.1). Se determinó que 74 cepas fueron productoras de BLEE (56.49%) y 57 cepas no productoras (43.51%). Una vez obtenida la producción de BLEE y la susceptibilidad a los antibióticos se buscó la asociación entre estas dos variables, demostrando que hay diferencia significativa entre la producción de BLEE y el perfil de resistencia, así como también con la multiresistencia, a excepción de los antibióticos Ampicilina/Sulbactam ( $p=0.522$ ) y la Nitrofurantoina ( $p=0.634$ ) (tabla 4). Los carbapenémicos presentaron una sensibilidad del 100% (datos no mostrados).

### **Grupo filogenético de *E. coli***

A todos los aislamientos se les determinó el grupo filogenético, (productos de genes *chuA*, *yjaA* y *tspE4C*). Del total de los aislamientos el grupo B2 (74.81%) fue el más predominante comparado con los otros grupos A (8.4%), B1 (3.05%) y D (13.74%), lo cual pudiera indicar que el 88.55% de las cepas aisladas pueden ser consideradas como patógenas y el 11.45% como comensales. Al establecer la relación entre el grupo filogenético y la producción de BLEE, no encontramos diferencias significativas (valor de  $p = 0.111$ ), sin embargo, el grupo filogenético B2 fue el más predominante tanto en los aislamientos productores de BLEE como en los no productores y el grupo B1 que solo se encontró en los aislamientos no productores de BLEE (Figura 2).

Tabla 4. Asociación entre susceptibilidad a antibióticos y producción de BLEE

FENOTIPOS ASOCIADOS A LA RESISTENCIA DE ANTIBIÓTICO		PRUEBA DE BLEE - n(%)	PRUEBA DE BLEE + n(%)	Valor <i>p</i>
<b>Ampicilina</b>	Susceptible	20 (33.90)	0	< 0.001*
	Resistente	39 (66.10)	75 (100)	
<b>Ampicilina/Sulbactam</b>	Susceptible	22 (37.29)	24 (32)	0.522
	Resistente	37 (62.71)	51 (68)	
<b>Cefazolina</b>	Susceptible	50 (84.75)	1 (1.33)	<0.001*
	Resistente	9 (15.25)	74 (98.67)	
<b>Ceftriaxona</b>	Susceptible	56 (94.92)	1 (1.33)	<0.001*
	Resistente	3 (5.08)	74 (98.67)	
<b>Cefepima</b>	Susceptible	54 (91.53)	1 (1.33)	<0.001*
	Resistente	5 (8.47)	74 (98.67)	
<b>Aztreonam</b>	Susceptible	54 (91.53)	2 (2.67)	<0.001*
	Resistente	5 (8.47)	73 (97.33)	
<b>Gentamicina</b>	Susceptible	51 (86.44)	39 (52)	<0.001*
	Resistente	8 (13.56)	36 (48)	
<b>Tobramicina</b>	Susceptible	54 (91.53)	37 (49.33)	<0.001*
	Resistente	5 (8.47)	38 (50.67)	
<b>Ciprofloxacino</b>	Susceptible	43 (72.88)	14 (18.67)	<0.001*
	Resistente	16 (27.12)	61 (81.33)	
<b>Moxifloxacino</b>	Susceptible	43 (72.88)	14 (18.67)	<0.001*
	Resistente	16 (27.12)	61 (81.33)	
<b>Nitrofurantoina</b>	Susceptible	52 (88.14)	68 (90.67)	0.634
	Resistente	7 (11.86)	7 (9.33)	
<b>Trimetoprima/Sulfametoxazol</b>	Susceptible	26 (44.07)	17 (22.67)	0.008*
	Resistente	33 (55.93)	58 (77.33)	
<b>Multirresistencia</b>	No MDR	44 (74.58)	14 (18.67)	<0.001*
	MDR	15 (25.42)	61 (81.33)	

Los datos obtenidos fueron utilizando la prueba de  $X^2$  \*: Son valores  $p < 0.05$ , estadísticamente significativo, BLEE: Betalactamasas de Espectro Extendido,

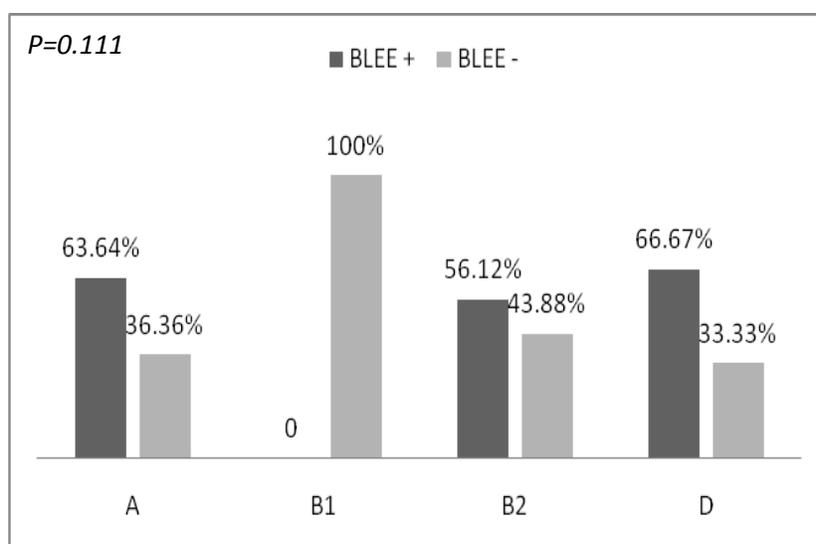


Figura 2: Grupo filogenético de *Escherichia coli* clasificados por producción de BLEE.

### Grupo O25b-ST131 de *E. coli*

En los aislamientos productores de BLEE positivos que pertenecen al grupo filogenético B2 se buscó el grupo O25b-ST131. Los aislamientos que amplificaron los productos de 347pb y de 300pb pertenecen a dicho grupo. El 36.36% de los aislamientos fueron pertenecientes al grupo O25b-ST131, el 58.18% al grupo ST131, el 3.64% al grupo O25b y el 1.82% no amplificó para este grupo. Es importante hacer mención que de las 8 cepas seleccionadas para conjugación no pertenecieron al grupo O25b-ST131 (Anexo 6.3).

### Caracterización de betalactamasas

Se identificaron los genes *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>CTX-M-15</sub>* en todos los aislamientos clínicos. En el 38.17% de los aislamientos se identificó el gen *bla<sub>CTX-M-15</sub>* con un producto de PCR de 544pb. El gen *bla<sub>SHV</sub>* se encontró en una frecuencia del 30.53% obteniendo un producto de 861pb. Es importante mencionar que solo el 8.11% de los aislamientos presentaron ambos genes tanto CTX-M-15 como SHV. Posteriormente se realizó la PCR del gen *bla<sub>TEM</sub>*, obteniendo una frecuencia del 54.96%, la cual pudiera representar una betalactamasa de amplio espectro, ya

que se encontró junto con las anteriores BLEE (Anexo 6.4). Una vez realizada la caracterización de los genes *bla* se buscó su relación con los grupos filogenéticos. El grupo B1 mostró valores significativos de *p* en los tres grupos genes, indicado que este grupo no está asociado con los genes *bla*, debido a que en este grupo no hubo aislamientos que amplificara para dichos genes. Los grupos A y D no presentaron valores significativos, indicado que los genes *bla* tampoco están asociados con estos dos grupos. Sin embargo, se observaron valores significativos en el grupo B2 con los genes SHV y CTX-M-15, indicado que este grupo se encuentra asociado con la presencia de estas dos BLEE (Figura 3). De los aislamientos que amplificaron para el grupo O25b-ST131 el 75% de los aislamientos presentó el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>.

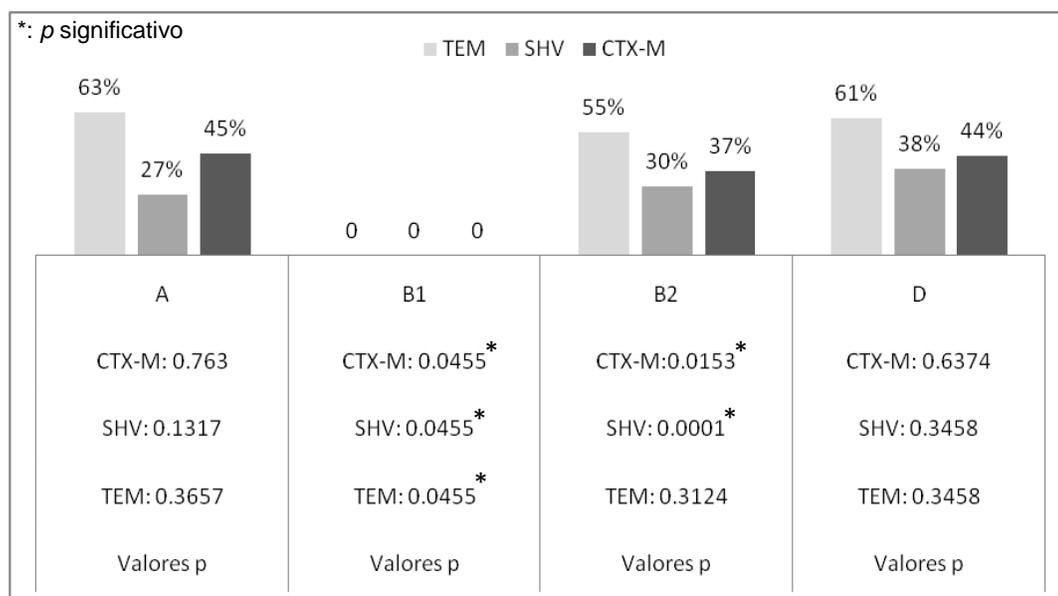
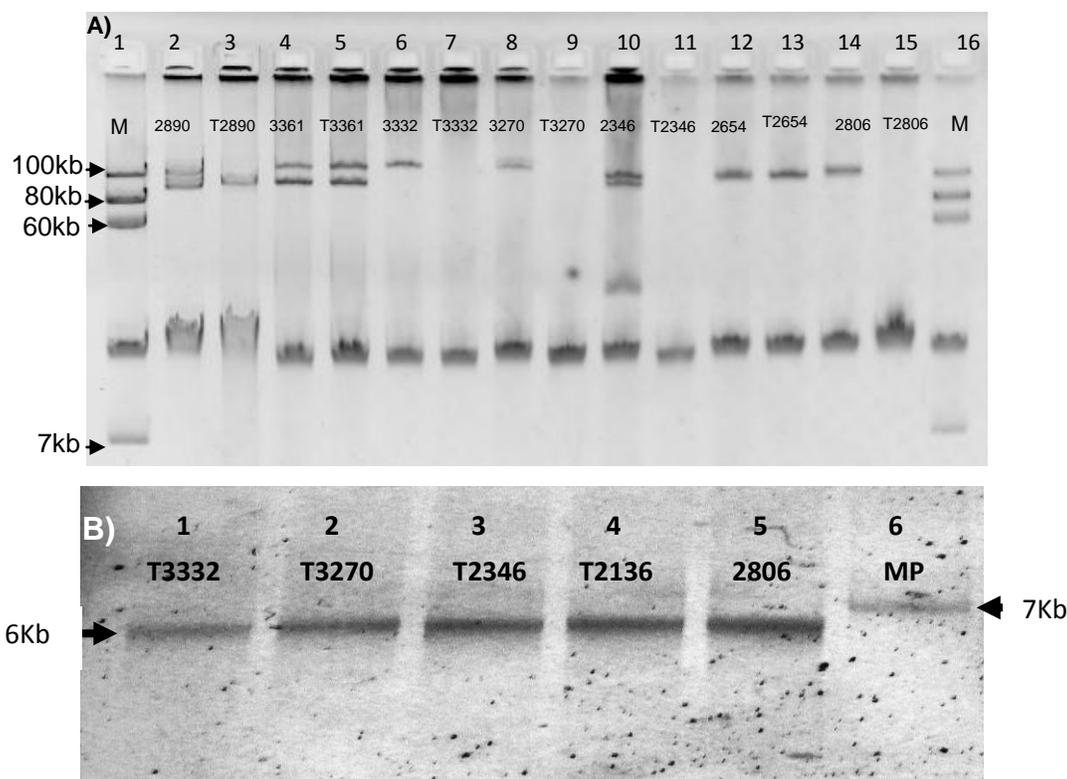


Figura 3: Grupo filogenético de *Escherichia coli* clasificados por prevalencia de genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>.

### Transferencia horizontal

En función al perfil de resistencia y el grupo filogenético de las cepas productoras de BLEE se seleccionaron 8 cepas para realizar las conjugaciones. Los aislamientos fueron seleccionados en medios con Amp+Azida y Caz+Azida y para corroborar la conjugación se replicaron en medios MM, M9 AMP, CAZ Y LB (Anexo 6.5). La extracción de plásmidos se realizó tanto en los aislamientos

clínicos como en transconjugantes. Tres aislamientos (2890, 3361 y 2654) lograron transferir megaplásmidos mayores a 80kb (figura 4A). En Cinco aislamientos (3332, 3270, 2346, 2136 y 2806) no se lograron detectar los plásmidos por la técnica de Kieser, por lo cual se utilizó el kit plasmid miniprep obteniendo plásmidos de 6kb en los 5 aislamientos (figura 4B).



**Figura 4 Gel de extracción de plásmidos.** (A) Carril 1 y 16 marcado 50192. Carril 2-15 aislamientos parentales y transconjugantes (B) Carril 1-5 aislamientos transconjugantes. Carril 6 marcador 50192

A los aislamientos seleccionados y sus transconjugantes se les determinó la MIC para los antibióticos de CAZ (Ceftazidima) y CTX (Cefotaxima) obteniendo puntos de corte  $>128\mu\text{g/ml}$  para el antibiótico CTX y  $>64\mu\text{g/ml}$  para el CAZ en las cepas parentales. En los aislamientos transconjugantes el punto de corte para el CTX fue de  $>256\mu\text{g/ml}$  y  $>128\mu\text{g/ml}$  para el CAZ con excepción de tres aislamientos (T2890, T2654 y T2136) que fueron sensibles a estos antibióticos. En estos

aislamientos solo se detectó la betalactamasa tipo SHV, la cual pudiera ser una betalactamasa de amplio espectro (tabla 6).

En la tabla 6 se muestran todas las características moleculares y fenotípicas de los 8 aislamientos seleccionados y los 8 transconjugantes. A las cepas transconjugantes se les realizaron las PCR de genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, como también los MIC y la extracción de plásmidos. También se realizaron PCRs para identificar genes QNRs, que median resistencia a las quinolonas, donde ninguno de nuestros aislamientos amplificó para dichos genes.

Tabla 6. Características genotípicas y fenotípicas de aislamientos de ITU y transconjugantes que adquirieron genes *bla* mediante plásmidos

No	FILOGENIA	PLÁSMIDO (Kb)	BLEE	TEM	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		X	PLÁSMIDO (kb)	BLEE	TEM	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
					CAZ	CTX					CAZ	CTX
3332	B2	130	CTX-M-15, SHV	+	64	>256	T3332	6	CTX-M-15,SHV	+	128	>256
2806	B2	110	CTX-M-15	+	>256	>256	T2806	6	CTX-M-15	+	128	>256
2136	B2	130	CTX-M-15, SHV	+	128	>256	T2136	6	SHV	+	0.06	0.25
2346	D	110, 100	CTX-M-15,SHV	+	64	>256	T2346	6	SHV	+	256	>256
3361	D	130, 100	CTX-M-15, SHV	+	>256	>256	T3361	130, 110	CTX-M-15, SHV	+	>256	>256
2654	B2	110	SHV	+	128	128	T2654	110	SHV	+	0.5	0.06
2890	A	100, 90	CTX-M-15,SHV	+	>256	>256	T2890	90	SHV	+	0.5	0.25
3270	B2	130	CTX-M-15,SHV	+	>256	>256	T3270	6	SHV	+	>256	>256

X: Aislamientos transconjugantes, MIC: Concentración Mínima Inhibitoria, CAZ: Ceftazidima, CTX: Cefotaxima, BLEE: Betalactamasa de espectro extendido, S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente

## Puntos de corte

CTX: S:  $\leq 8$  I: 10-32 R:  $\geq 64$

CAZ: S:  $\leq 8$  I: 16 R:  $\geq 32$

## VI.-DISCUSIÓN

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido descritas en bacilos Gram negativos, son consideradas como un mecanismo significativo de resistencia a antibióticos betalactámicos y que está asociada a la multidrogoresistencia (Mukherjee *et al* 2013). En el presente estudio realizado en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, el 56.5% de las cepas aisladas fueron productoras de BLEE, este porcentaje se correlacionó con la frecuencia de resistencia a Ceftriaxona (57%), Cefepime (59%) y Aztreonam (58%). En un estudio realizado en la misma comunidad en aislamientos de *E. coli* de ITU en pacientes ambulatorios durante el periodo de septiembre 2010 a Agosto 2011 (Castro, *et al.*,2014), reportaron que el 62% de los aislamientos fueron productores de BLEE. Esta pequeña reducción en nuestro estudio de la producción de BLEE, puede deberse a que el 27 de Mayo del 2010 se aprobó y publicó en el Diario Oficial de la Federación la ley sobre la venta de antibióticos con receta médica en México, por lo que su aplicación en años puede estar influyendo a la reducción de la resistencia a antibióticos de amplio espectro. Además, la producción de BLEE se correlacionó con la MDR (57%), debido a que los aislamientos clínicos causantes de ITU en la población de estudio, mostraron una alta frecuencia de resistencia a Aminoglucósidos (Gentamicina 33% y Tobramicina 32%), Quinolonas (Ciprofloxacino y Moxifloxacino 58%), al Trimetoprima/Sulfametoxazol 68% y a la Nitrofurantoina 10%, antibióticos no betalactámicos usados comúnmente para tratamiento de ITU. Esta MDR puede ser atribuida a la diseminación de elementos genéticos transferibles como los integrones, trasposones y plásmidos, que portan genes de resistencia a estos antibióticos (Paterson, 2006). Además, se ha sugerido que el tratamiento empírico inadecuado de antibióticos puede generar una presión selectiva en las bacterias (Guajardo, *et al.*,2009). La MDR (57%) asociada a la producción de BLEE ha sido reportada en diversas regiones geográficas, evidencia de ello es lo reportado por Rijavec *et al.*, 2006 quienes informaron que la MDR estimada para el 2006 en Eslovenia fue del 42%. Mientras que en EE.UU

fue del 7.1% (Gonzales *et al.*, 2001), esto probablemente es atribuido al estricta farmacovigilancia y restricciones del comercio de la FDA sobre los antibióticos.

En relación con el grupo filogenético, el grupo patógeno B2 es el grupo que más prevaleció en la población, esto debido a que dicho grupo contiene genes que codifican factores de virulencia responsables de promover las etapas de colonización, adherencia, invasión y la evasión de los mecanismos de defensa del hospedero (Bien *et al.*, 2012). Un factor que puede influir dentro de este grupo también es la presencia del grupo O25b-ST131, debido a que dicho grupo se relaciona con genes de virulencia, patogenicidad y de resistencia (Clermont, *et al.*, 2008). En un estudio realizado en la región de Faisalabad en Pakistán, se reportó que el 50% de los aislamientos de UPEC pertenecieron al grupo B2, y el 19% perteneció a los grupos A y B1 (19%) (Bashir, *et al.*, 2012); lo que sugiere que cepas consideradas como comensales pueden ocasionar ITU y estas pueden presentar genes de resistencia a los antibióticos, debido a que dichas bacterias pueden adquirir genes de resistencia y patogenicidad en el tracto gastrointestinal por la transferencia horizontal de genes (Moreno, *et al.*, 2006). Los aislamientos del presente estudio no mostraron una relación significativa entre el grupo filogenético y susceptibilidad a antibióticos, lo cual sugiere que el grupo filogenético no se asocia con la resistencia, sin embargo, se encontró asociación entre la susceptibilidad a antibióticos y la producción de BLEE.

En este estudio se realizó la caracterización molecular de genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> en donde la asociación de estas BLEE fue un hallazgo común entre los aislamientos, pudiéndose observar la prevalencia de CTX-M-15 (38.17%) del total de aislamientos, esto es probablemente por la presencia del grupo O25b-ST131, debido a que el 75% de los aislamientos positivos para este grupo presenta el gen CTX-M-15 lo que sugiere que la presencia del grupo O25b-ST131 puede influir en la presencia del gen CTX-M-15 (Clermont *et al.*, 2009). Estudio realizado en la misma comunidad por Castro, *et al.*, en el 2008 obtuvieron una prevalencia del 43% entre las BLEE positivas. Sin embargo, en el periodo 2010 y 2011 reportaron CTX-M con una frecuencia del 50% (Castro, *et al.*, 2014). Estudio realizado en

Monterrey México por Garza, *et al.*, 2011, detectaron el gen CTX-M-15 en un 66.7%, otro estudio realizado en la comunidad de México por Reyna *et al.*, 2013 detectaron el gen CTX-M-15 en 96,4%. Esto nos sugiere que la BLEE CTX-M es la que prevalece en nuestra comunidad al igual que en otras partes del mundo, ya que estudios han reportado que la BLEE de tipo CTX-M es la de mayor distribución (Blomberg, *et al.*, 2005), la cual ha causado brotes en Canadá, Francia, Reino Unido, España y Túnez (Livermore, *et al.*, 2007). La BLEE tipo SHV también estuvo presente entre nuestros aislamientos (54%), Es importante mencionar que hace algunos años esta BLEE predominaba en diversas partes del mundo en aislamientos de *K. pneumoniae* (Jacoby, *et al.*, 1991). Sin embargo con el paso del tiempo esta BLEE se encuentra en una menor proporción de cepas de *Escherichia coli*. En un estudio realizado en el estado de Guerrero en el periodo 2004-2006 se encontró que el 16.1 % de los aislamientos *E. coli* eran portadores del gen SHV (Castillo, 2007). En Guadalajara, México, en el periodo 2010-2011 fue detectada la SHV-5 en el 17% de aislamientos de *E. coli* (Morfín-Otero *et al.*, 2013). Otro estudio realizado en Chiclayo Perú en el periodo 2011 detectaron la prevalencia de SHV solo en un 16% de los aislados de *E. coli* (Arce, *et al.*, 2012) y Reyna *et al.*, 2013 en México detectaron que solo el 3% tenía el gen SHV. Esto indica que las bacterias de diferentes géneros están intercambiando genes de resistencia lo que ha favorecido la diseminación de CTX-M-15 (Cantón, *et al.*, 2006). La prevalencia de la TEM fue de 54.96%, en su mayoría esta enzima estuvo junto con Betalactamasas CTX-M-15 y SHV, por lo que esta betalactamasa tipo TEM puede ser de amplio espectro y su vigilancia es muy necesaria, ya que estas  $\beta$ -lactamasas pueden originar nuevos tipos de BLEE como lo reporta Du Bois y colaboradores en 1995.

En el presente estudio se demostró la transferencia horizontal de genes que codifican para BLEE. Estos genes estuvieron codificados tanto en megaplásmidos de 80-130 Kb, como en plásmidos de menor tamaño (6Kb). Nosotros identificamos genes CTX-M-15 y SHV en plásmidos pequeños, sin embargo, no podemos descartar el que también pudieran tener otro tipo de mecanismo de resistencia en los aislamientos clínicos que pudieran ser los responsables de la resistencia a

cefotaxima y ceftazidima. Nuestros resultados en este estudio tienen gran importancia debido a que se reporta que los genes que codifican para genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, se localizan en megaplásmidos. Como lo reportado por Reyna-Flores *et al.*, 2013 donde localizaron en plásmidos de 160Kb los genes de CTX-M-15. Wang y colaboradores en el 2013 también lograron detectar el gen CTX-M en plásmidos de 30-600Kb haciendo mención que los genes para BLEE se localizan en plásmidos de entre 20 - 200Kb. La diseminación de genes *bla* en megaplásmidos ha sido ampliamente documentada (Garza *et al* 2007; Millan *et al* 2012). Sin embargo, la presencia de plásmidos pequeños debe ser ampliamente estudiada, ya que podría ser que la diseminación de la resistencia en la comunidad, se debe a plásmidos de menor tamaño que facilitan la movilidad entre las diferentes especies causantes de ITU.

## VII.-CONCLUSIÓN

1. La producción de BLEE, determinada fenotípicamente está relacionada significativamente con la MDR, en aislamientos clínicos de *E. coli* causante de infecciones del tracto urinario en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero.
2. Las cepas de *Escherichia coli* aisladas de ITU en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, pertenecen principalmente al grupo filogenético B2, seguido del grupo D.
3. Las betalactamasas CTX-M-15 y SHV están relacionadas al grupo filogenético B2 principalmente al grupo O25b-ST131, el cual se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo.
4. Los genes que codifican para BLEE están codificados en megaplásmidos de (aproximadamente 90, 110 y 130 kb) y en plásmidos de 6Kb, los cuales pueden ser transferidos por conjugación.

## VIII.- ANEXOS

### ANEXO 1

#### **Prueba doble disco combinado.**

- A partir de un cultivo fresco de agar, se tomarán de 3-5 colonias.
- Se inocularán en tubos con 3 ml de solución salina al 0.9%.
- La suspensión se ajustará a la turbidez a 0.5 en escala de Mc Farland (Alternativamente se puede ajustar con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm con una DO de 0.08-0.10 de absorbancia).
- En un lapso de tiempo no mayor a 15 minutos, después de ajustar la turbidez, se sumergirá un hisopo dentro de la suspensión, rotando unas veces y presionando firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel del líquido para eliminar el exceso de inóculo.
- Posteriormente se inoculará la superficie de una placa de agar Muller-Hinton por rayado con hisopo, repitiendo de 3-4 veces con la finalidad de una distribución constante del inóculo rotando la placa aproximadamente 60% cada vez.
- Por último se deslizará el hisopo sobre los bordes de la placa.
- Se utilizarán discos con CAZ (30  $\mu$ g) y CTX (30  $\mu$ g) y discos de estos mismos antibióticos adicionados con 10  $\mu$ g de clavulanato de potasio recomendado por el CLSI.
- Los discos se colocarán a una distancia mayor de 30 mm uno de cada otro, presionando ligeramente para asegurar el contacto con la superficie, después de 15 min de haber colocado los discos se depositarán en las cajas de Petri y se incubarán a 35°C durante 16-18 horas.
- La producción de BLEEs será inferida si los halos de inhibición de los discos con clavulanato fueron  $\geq$  5 mm que los discos que no tenían inhibidor.

## ANEXO 2

### TÉCNICA PARA CONJUGACIÓN

#### **Fundamento:**

Constituye el mecanismo de transferencia de genes de resistencia antibiótica. La conjugación bacteriana es la transferencia de una hebra de DNA de un donador, a través de un pili, a una célula receptora durante una forma de fusión celular altamente localizada.

#### **Procedimiento:**

- 1.- En 1ml de LB sembrar una colonia fresca de la célula donadora (R).
- 2.- En 10 ml de lb sembrar una colonia de J53 e incubar 3 hrs a 37°C en agitación lenta (30 rpm)
- 3.- Se espatulan 100  $\mu$ l en cajas selectivas (AZ+CTX y AZ+AMP) de las cepas donadoras y receptoras (controles).
- 4.- Mezclar 800  $\mu$ l de la J5 200 $\mu$ l de donadora (R) se incuba 37° sin agitación durante 3 hrs.
- 5.- Se toman 100 $\mu$ l y se espatulan en medios selectivos (AZ+CTX y AZ+AMP).
- 6.- A la mezcla se le adiciona 1.8 ml de LB y se incuba a 37°C durante toda la noche.
- 7.- Al día siguiente se plaquean 200 $\mu$ l de la mezcla diluida en medios selectivos.
- 8.- De lo que queda se toman 200 $\mu$ l para colocar en el filtro que está en la caja del medio LB. NOTA en los controles no debe haber crecimiento y en la conjugación de 3 hrs se seleccionan las colonias.
- 9.- Replicar con palillos en medios M9 y MM del cultivo de 3 y 24 hrs.
- 10.- Con un hisopo recolectar la cosecha del filtro y diluir en 1 ml de agua destilada,
- 11.- De esta dilución replicar en medios selectivos 100 $\mu$ l
- 12.- Si no se aíslan transconjugantes hacer diluciones y plaquear nuevamente en medios selectivos.

### ANEXO 3

#### EXTRACCIÓN DE MAGA PLÁSMIDOS (MÉTODO DE KIESER)

##### **Fundamento:**

En un gel de agarosa tratado con bromuro de etidio, el ADN de cada plásmido aparece como una banda, que migra a una distancia inversamente proporcional al logaritmo de su tamaño.

##### **Preparación de la muestra:**

- 1.- Sembrar las cepas en 5 ml de LB y dejar a 37°C durante toda la noche en agitación.
- 2.- Se toman 3 ml y se centrifugan para empastillar
- 3.- Se decanta y se re suspende las pastilla en 400  $\mu$ l de la SOLUCIÓN I.
- 4.- Vortexear y se agregan 100 $\mu$ l de lisozima (10mg/ml) NOTA la lisozima se debe mantener en hielo.
- 5.- Mezclar muy suavemente varias veces x inversión
- 6.- Incubar 30 min en hielo
- 7.- Agregar 200 $\mu$ l de SOLUCIÓN II e inmediatamente mezclar varias veces por inversión
- 8.- Incubar a 55 °C por 30 min y posteriormente enfriar en agua a temperatura ambiente por 5 min
- 9.- Agregar 80  $\mu$ l de fenol ácido-cloroformo a temperatura ambiente y vortexear NOTA hasta que quede lechoso.
- 10.- Centrifugar 20 min a 4°C a 14000 rpm.
- 11.- Tomar 350-400  $\mu$ l de sobrenadante, evitando tomar pastilla.
- 12.- Mantener el sobrenadante a 4°C o congelar.
- 13.- Corren en un gel de agarosa al 0.7% con TBE y teñir.
- 14.- Correr en cámara mediana 6 horas o grande toda la noche a 69 V.

## Corrimiento del gel

15.- Una vez que se prepara el gel de agarosa al 0.7% correr 45  $\mu$ l del sobrenadante (más de 6 $\mu$ l del colorante 6X, azul de bromofenol).

## Preparación de la cámara

16.- Se coloca TBE 1X suficiente para cubrir el gel ya puesto en la cámara.

17.- Colocar la muestra en pozos del gel.

18.- Correr la muestra de 30-60 minutos a temperatura ambiente a 95 voltios posteriormente a 4°C por 6 horas a 95 voltios.

19.- Se seca el gel y se tiñe por 20 minutos en bromuro de etidio.

20.- Se observan las bandas en luz ultravioleta y se toma la foto.

21.- Utilizando como control para la extracción de plásmidos las siguientes cepas:

## Cepas con diferentes pesos moleculares.

<i>Escherichia coli</i>	
S4	170 kb
R 1	93 kb
Rp4	54 kb
R6K	40 kb

## Soluciones para plásmidos

### Solución No. I

	STOCK	VOLUMEN (100 ml)	CONCENTRACIÓN FINAL
SACAROSA	1 M	30 ml	0.3 M
TRIS HCl (Ph=8)	1 M	2.5 ml	25 mM
EDTA (Ph=8)	0.5 M	5.0 ml	25 mM
H <sub>2</sub> O		62.5 ml	

**Nota:** Esta solución debe permanecer el hielo, después se guarda a -4°C.

### Solución No. II

	STOCK	VOLUMEN (5 ml)	VOLUMEN (1 ml)	CONCENTRACIÓN FINAL
NAOH	5 M	300 $\mu$ l	60 $\mu$ l	0.3 M
SDS	10 %	1 ml	200 $\mu$ l	2 %
H <sub>2</sub> O		3.7 ml	740 $\mu$ l	

**Nota:** Se prepara lo necesario para la reacción y se desecha el sobrenadante.

## ANEXO 4

### PLASMID MINIPREP KIT

- 1.- Añadir 600  $\mu$ l de la cepa crecida en caldo LB a un tubo de Ependorff de 1.5 ml
- 2.- Añadir 100  $\mu$ l de 7X Lisis Buffer (Blue) y mezclar invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces (la solución debe quedar de color azul)
- 3.- Añadir 350  $\mu$ l de cold Neutralization Buffer (Yellow) y mezclar bien. La mezcla se vuelve de color amarillo y se forma un precipitado amarillento.
- 4.- Centrifugar de 11000 a 16000 rpm de 2-4 minutos
- 5.- Transferir 900  $\mu$ l del sobrenadante a una columna Zymo-Spin™
- 6.- Colocar la columna en un tubo y centrifugar 15 segundos
- 7.- Deseche el filtrado y coloque la columna en el mismo tubo
- 8.- Añadir 200  $\mu$ l del Endo-Wash Buffer a la columna. Centrifugar durante 30 segundos
- 9.- Añadir 400  $\mu$ l del Zyppy™ Wash Buffer a la columna
- 10.- Transferir la columna a un tubo de microcentrifuga 1.5 ml limpio. Añadir 30  $\mu$ l Zyppy™ Elution Buffer directamente a la matrix de la columna y se deja reposar durante un minuto a temperatura ambiente
- 11.- Centrifugar durante 30 segundos para eluir el DNA plasmídico

## ANEXO 5

### MEDIO LURIA – BERTONI (LB) (Anon, n.d.)

#### Formula:

- 10 gr. De NaCl
- 5 gr. De extracto de levadura
- 10 gr. De Bactotriptono o peptona de caseína
- 15 gr. De agar bacteriológico

#### Preparación:

Disolver en 1000 ml de agua bidestilada, ajustar a pH de 7.5, aforar a un litro con agua bidestilada, esterilizar y vaciar en placas.

#### Antibióticos:

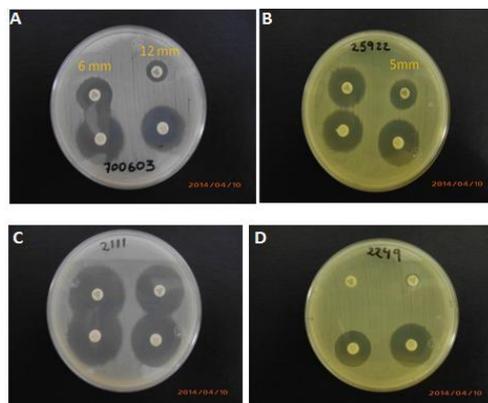
Para preparar LB con antibióticos, se prepara una solución stock de cada antibiótico y se adiciona volúmenes de esta solución para llevar a una concentración final de:

- Ampicilina 100  $\mu\text{g/ml}$
- Cefotaxima 4  $\mu\text{g/ml}$

ANEXO 6

FIGURAS DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS

1.-Produccion de BLEE



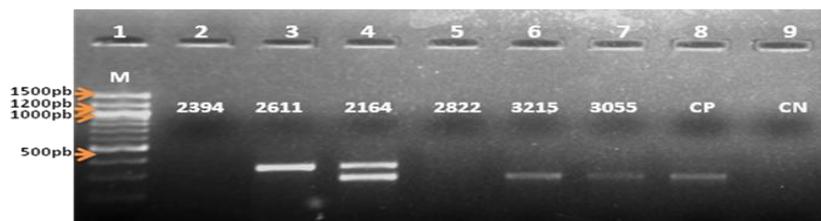
**Prueba de doble disco combinado.** A) control positivo de BLEE B) control negativo de BLEE C) Muestra 2111 negativa D) Muestra 2249 positiva.

2.- Filogenia de *Escherichia coli*



**PCR de grupo filogenético.** Todos los carriles de las muestras 2194, 2412, 2249, 2188, 2094, 2235, 2128 y 2091 pertenecen al grupo filogenético B2 obteniendo los productos de 279, 211 y 152pb

3.- Detección de grupo O25b-ST131

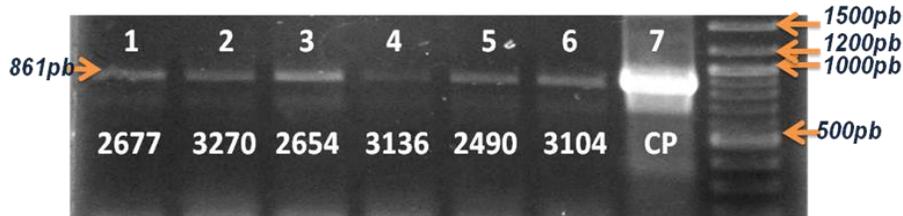


**Electroforesis en gel del grupo O25b-ST131.** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2-7 aislamientos clínicos. Carril 7: control positivo. Carril 8: control negativo carril 4: muestra positiva al gen O25b-ST131

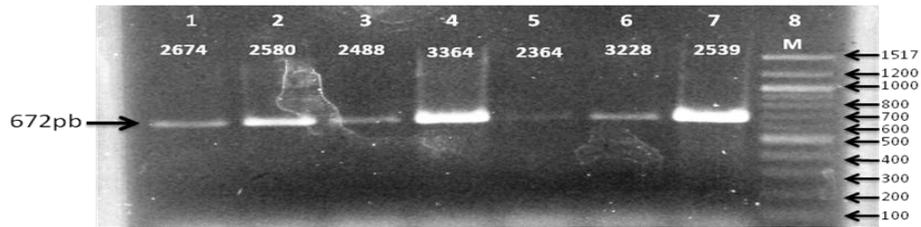
4.- Detección de genes *bla*



**Electroforesis del gen *bla*<sub>CTX-M</sub>.** Carril 1 ATCC productora de CTX-M-15. Carril 2, 5, 6, 7 y 8 aislamientos positivos de gen *bla*<sub>CTX-M</sub> carril 3 y 4 aislamientos de *E. coli* negativos.

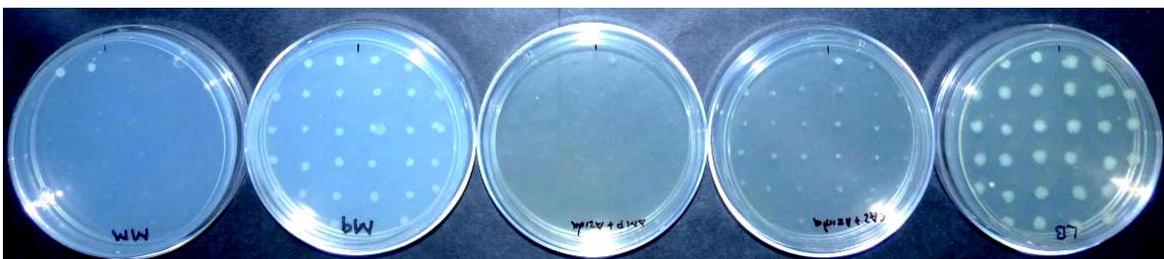


**Electroforesis del gen *bla*<sub>SHV</sub>** Carril 1-6 muestras positivas al gen *bla*<sub>SHV</sub> de 861pb. Carril 7 control positivo SHV y carril 8 marcador de peso molecular



**Electroforesis del gen *bla*<sub>TEM</sub>.** Carril 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 aislamientos de *E. coli* productores de *bla*<sub>TEM</sub> amplificando un producto de 672pb, Carril 8 marcador de peso molecular

5.- Replicación en medios selectivos



**Figura 9 . Replicación de los aislamientos.** Replicación del aislamiento 3361 en medios con MM, M9, AMP CAZ y LB

## IX.- BIBLIOGRAFÍA

- Anon, D. (n.d.). *Medio de cultivo Luria Bertani*.
- Arce, Z., Alarcón, E., Limo, J., Llontop, J., y Valle, J. (2012). Detection of SHV and TEM genes in extended spectrum B-lactamase producing *Escherichia coli* strains from two hospitals of Chiclayo-Peru: January-August, 2011. *Rev. Cuerpo Méd. HNAAA* 5(3), 13–16.
- Bashir, S., Haque, A., Sarwar, Y., Ali, A., y Anwar, M. I. (2012). Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic *E. coli* from Faisalabad region of Pakistan. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11(1), 23.
- Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153, S347–57.
- Bien, J., Sokolova, O., y Bozko, P. (2012). Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *International Journal of Nephrology*, 1–15.
- Blomberg, B., Jureen, R., Manji, K. P., Bushir, S., Mwakagile, D. S. M., *et al.*, (2005). High Rate of Fatal Cases of Pediatric Septicemia Caused by Gram-Negative Bacteria with Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Dar es Salaam, Tanzania. High Rate of Fatal Cases of Pediatric Septicemia Caused by Gram-Negative Bacteria with Extended-Spectrum B. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 745–749.
- Bush, K., y Jacoby, G. a. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–76.
- Cantón, R., y Coque, T. M. (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), 466–75.
- Canton, R., Valdezate, S., y Mir, N. (1999). Resistencia a los antimicrobianos. *Antimicrobianos En Medicina. Sociedad Española de Quimioterapia.*, 41–7.
- Castillo, M. S. M. (2007). *Identificación de beta-lactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas de dos hospitales del estado de Guerrero, Mexico*. Universidad Autónoma de Guerrero.

- Castro, N., Carreón, E., Moreno, M., y Alarcón, L. (2008). Molecular characterization of extended spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Escherichia coli*. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología*, 28(3), 114–120.
- Castro, N., Salgado, J., Ocampo, R., Silva, J., y Ruiz, M. (2014). Caracterización de betalactamasas de espectro extendido producidas por *Escherichia coli* de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, Mexico. *Tlamati Sabiduria*, 5(1), 14–23.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., y Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–8.
- Clermont, O., Dhanji, H., Upton, M., Gibreel, T., Fox, A., et al., (2009). Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(2), 274–277.
- Clermont, O., Lavollay, M., Vimont, S., Deschamps, C., Forestier, C., et al., (2008). The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(5), 1024–1028.
- CLSI. (2014). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement M100-S24.pp 110-112.
- Du Bois, S. K., Marriott, M. S., y Amyes, S. G. (1995). TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases: relationship between selection, structure and function. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35(1), 7–22.
- Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., y Stratchounski, L. (2003). Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M in Russian Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(12), 3724–3732.
- Garza, E., Ibarra, S., Llaca, J., y Gonzalez, G. (2011). Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates at a tertiary-care centre in Monterrey, Mexico. *Journal of Medical Microbiology*, 60(1), 84–90.
- Garza-Ramos, U., Martínez-Romero, E., y Silva-Sánchez, J. (2007). SHV-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) are encoded in related plasmids from enterobacteria clinical isolates from Mexico. *Salud Publica de Mexico*, 49(6), 415–421.

- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., y Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 47(3), 137–46.
- Gonzales, R., Malone, D. C., Maselli, J. H., y Sande, M. a. (2001). Excessive antibiotic use for acute respiratory infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(6), 757–762.
- Guajardo, C., González, P., y Ayala, J. (2009). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections. What antimicrobial to use? *Salud Pública de México*, 51(2), 155–159.
- Horcajada, J. P., Garcia-Palomo, D., y Carmen, M. (2005). Treatment of uncomplicated lower urinary tract infections. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 22, 22–27.
- Howard, C., Van Daal, A., Kelly, G., Graeme Nimmo, J. S., y Giffard, P. M. (2002). Identification and Minisequencing-Based Discrimination of SHV B-Lactamases in Nosocomial Infection-Associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(3), 659–664.
- Jacoby, G. a, y Medeiros, A. a. (1991). More Extended-Spectrum B-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(9), 1697–1704.
- Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*, 12, 19–36.
- Livermore, D. M. (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 557–584.
- Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G. M., Arlet, G., ... Woodford, N. (2007). CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), 165–174.
- Manjarrez, A. (2012). *Escherichia Coli* Uropatógena , peligrosa bacteria causante de diversas infecciones urinarias. *Departamento de Salud Publica UNAM*, 1–3.
- Millan, B., Castro, D., Araque, M., Ghiglione, B., y Gutkind, G. (2012). ISCR1 associated with blaCTX-M-1 y blaCTX-M-2 genes in IncN and IncFIIA plasmids isolated from *Klebsiella pneumoniae* of nosocomial origin in Mérida, Venezuela. *Biomédica*, 33(2), 268–75.
- Miller, J. (1992). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.

- Moreno, E., Prats, G., Planells, I., Planes, A. M., Pérez, T., *et al.*, (2006). Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. *Enferm Infecc Microbiol*, 24(8), 483–489.
- Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Silva-Sánchez, J., Rodríguez-Noriega, E., Laca-Díaz, J., *et al.*, (2013). Characterization of Enterobacteriaceae isolates obtained from a tertiary care hospital in Mexico, which produces extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 19(5), 378–83.
- Mosquito, S., Ruiz, J., y Ochoa, T. J. (2011). Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* associated diarrhea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(4), 9–11.
- Mukherjee, M., Basu, S., Mukherjee, S. K., y Majumder, M. (2013). Multidrug-Resistance and Extended Spectrum Beta-Lactamase Production in Uropathogenic *E. Coli* which were Isolated from Hospitalized Patients in Kolkata, India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 7(3), 449–53.
- Navarro-Navarro, M., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Ruiz-Bustos, E., y Velázquez-Contreras, C. A. (2013). High prevalence of antibiotic resistance in community-acquired uropathogenic *Escherichia coli* determined in hospitals from Hermosillo, Sonora. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología*, 33(2), 66–70.
- Pallecchi, L., Bartoloni, A., Fiorelli, C., Mantella, A., Di Maggio, T., *et al.*, (2007). Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8), 2720–5.
- Paterson, D. L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *American Journal of Infection Control*, 34(5 SUPPL.), 20–28.
- Paterson, D. L., y Bonomo, R. a. (2005). Extended-Spectrum B-Lactamases : a Clinical Update. *Society*, 18(4), 657–686. doi:10.1128/CMR.18.4.657
- Prodinger, W. M., Fille, M., Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Amann, S., *et al.*, (1996). Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Producing SHV-5 B -Lactamase : Parallel Outbreaks Due to Multiple Plasmid Transfer, 34(3), 564–568.

- Quinteros, M., Radice, M., Gardella, N., Rodriguez, M. M., Costa, N., *et al.*, (2003). Extended-Spectrum B-Lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires , Argentina , Public Hospitals, 47(9), 2864–2867. doi:10.1128/AAC.47.9.2864
- Rawat, D., y Nair, D. (2010). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in gram negative bacteria. *Jornual of Global Infectious Diseases*, 2(3), 263–274. Retrieved from
- Reyna-Flores, F., Barrios, H., Garza-Ramos, U., Sánchez-Pérez, A., Rojas-Moreno, T., *et al.*, (2013). Molecular epidemiology of Escherichia coli O25b-ST131 isolates causing community-acquired UTIs in Mexico. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76(3), 396–8.
- Rijavec, M., Starcic Erjavec, M., Ambrozic Avgustin, J., Reissbrodt, R., Fruth, A., *et al.*, (2006). High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic Escherichia coli (UPEC) of the four major phylogenetic groups. *Current Microbiology*, 53(2), 158–62.
- Rubtsova, M. Y., Ulyashova, M. M., Bachmann, T. T., Schmid, R. D., y Egorov, a. M. (2010). Multiparametric determination of genes and their point mutations for identification of beta-lactamases. *Biochemistry (Moscow)*, 75(13), 1628–1649.
- Wang, J., Stephan, R., Karczmarczyk, M., Yan, Q., Hächler, H., *et al.*,. (2013). Molecular characterization of blaESBL–harboring conjugative plasmids identified in multi-drug resistant Escherichia coli isolated from food-producing animals and healthy humans. *Frontiers in Microbiology*, 4(July), 1–9. doi:10.3389/fmicb.2013.00188
- Woerther, P.-L., Angebault, C., Lescat, M., Ruppé, E., Skurnik, D., *et al.*,(2010). Emergence and dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in the community: lessons from the study of a remote and controlled population. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(4), 515–23.
- Woodford, N., Ward, M. E., Kaufmann, M. E., Turton, J., Fagan, E. J., *et al.*, (2004). Community and hospital spread of Escherichia coli producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(4), 735–43.