



UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUIZ GALLO"

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**



**Relación clonal de cepas de *Escherichia coli* productoras de
β-lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con
infecciones urinarias de origen comunitario y de portadores fecales
humanos. Hospital Regional Lambayeque,
Noviembre 2015- noviembre 2016.**

TESIS

**Tesis para optar el Título de Licenciado en
Biología**

Presentado por:

Br. SANTAMARÍA VELIZ, Olivia.

Asesora:

Dra. VERGARA ESPINOZA, Martha Arminda

**Lambayeque-Perú
2017**



UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUIZ GALLO"

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**



**Relación clonal de cepas de *Escherichia coli* productoras de
β-lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con
infecciones urinarias de origen comunitario y de portadores fecales
humanos. Hospital Regional Lambayeque,
Noviembre 2015- noviembre 2016.**

TESIS

**Tesis para optar el Título de Licenciado en
Biología**

Presentado por:

Br. SANTAMARÍA VELIZ, Olivia.

Asesora:

Dra. VERGARA ESPINOZA, Martha Arminda

**Lambayeque-Perú
2017**

UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUIZ GALLO”
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

TESIS

Relación clonal de cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infecciones urinarias de origen comunitario y de portadores fecales humanos. Hospital Regional Lambayeque, Noviembre 2015- noviembre 2016.

Presentado por:

Br. SANTAMARIA VELIZ, Olivia

Aprobado por:

Dra. Ana María del Socorro Vásquez Castillo

PRESIDENTE DEL JURADO

Dra. Gianina Llontop Barandiarán

SECRETARIA

Lic. Julio Silva Estela

VOCAL

Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza

PATROCINADORA

*La motivación más importante para trabajar
tanto en la escuela como en la vida, es el
placer en su resultado y el valor de dicho
resultado para la comunidad.*

Albert Einstein

DEDICATORIA

A personas que considero infinitamente valiosas en mi vida: mi familia, especialmente a mis padres Carmen y Humberto, sabiendo que jamás encontraré la forma de agradecer su constante apoyo y confianza durante esta etapa de mi vida. Los amo...

A Ernestina, abuelita, estoy segura que estaría muy orgullosa de saber que logro esta meta, parte de la aventura de la vida.

A los jóvenes, futuros investigadores interesados en este valioso campo de la biología: Epidemiología molecular.

AGRADECIMIENTOS

Me queda corta esta hoja...

A DIOS, por la sabiduría y paciencia. Por haberme regalado la alegría de conquistar esta meta, así como personas de buen corazón: familia y amigos... Grandes tesoros de la vida.

A la Dra. Martha Vergara Espinoza por la paciencia y tiempo proporcionado durante el desarrollo de la investigación. Así como también, por su asesoría y sugerencias para mejorar estos manuscritos.

Gracias a la dirección de investigación del Hospital Regional Lambayeque, pero sobre todo al Dr. Heber, director de la presente dirección; al Mblgo. Franklin Aguilar y al Blgo. Luis Serquén, copatrocinadores, por su disponibilidad y amistad, así también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis...Aprendí de ustedes mucho en investigación... Gracias por la oportunidad... Con estima...

A mis mejores amigas: Sandy, Cecilia y Marielena, por acompañarme y brindar su más sincera amistad durante este largo camino, que aún falta por recorrer...

A mis compañeros de investigación y amigos a la vez Kelly y Kevin, por esos largos días y meses de estandarización de protocolos que pensábamos que no lograríamos ver ese genial patrón de bandas...Y que finalmente obtuvimos un excelente trabajo. ¡Lo logramos chicos!

...Y a todos aquellos, que tuvieron una actitud de apoyo y facilitaron la realización del presente trabajo de investigación...

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE

	Pág.
vi. RESUMEN	vi
vii. ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	4
III. MATERIAL Y MÉTODOS	8
3.1. Población y muestra.....	8
3.1.1. Población.....	8
3.1.2. Muestra.....	8
3.2. Material biológico.....	9
3.3. Metodología.....	10
3.3.1. Identificación de cepas de <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infecciones urinarias de origen comunitario y de portadores fecales.....	10
3.3.2. Caracterización molecular de cepas de <i>E. coli</i> productora de BLEE mediante ERIC-PCR y REP-PCR.....	14
3.5.5. Relación genética de las cepas de productoras de BLEE procedentes de pacientes emparentados.....	18
3.5.6. Análisis y procesamiento de datos.....	19
3.5.7. Consideraciones éticas.....	23
IV. RESULTADOS	24
4.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infecciones urinarias de origen comunitario y de portadores fecales de la ciudad de Chiclayo.....	24
4.2. Caracterización molecular mediante ERIC-PCR y REP-PCR de cepas de <i>E. coli</i> productora de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria de origen comunitario y de portadores fecales.....	27
4.2.1. Tipificación molecular mediante ERIC – PCR.....	27

4.2.2. Tipificación molecular mediante REP – PCR.....	30
4.2.3. Fusión de ERIC-PCR y REP PCR.....	33
4.2.4. Patrones clónales conservados.....	33
4.2.5. Análisis de coordenadas principales (PCoA).....	39
4.2.6. Análisis molecular de varianza (AMOVA).....	40
4.3. Relación genética de las cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE de pacientes emparentados.....	41
V. DISCUSIÓN.....	42
VI. CONCLUSIONES.....	53
VII. RECOMENDACIONES.....	54
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01. Diagrama de trabajo para la identificación de cepas de <i>E. coli</i> productora de BLEE aisladas de pacientes con infecciones urinarias de origen comunitario y de portadores fecales humanos. Hospital Regional Lambayeque, Noviembre 2015- noviembre 2016.....	13
Figura 02. Programa de temperatura para las técnicas ERIC-PCR y REP-PCR ingresada en el termociclador <i>Eppendorf</i>	17
Figura 03. Frecuencia de cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE en pacientes con ITUc, en pacientes (heces) y en sus familiares (heces). Hospital Regional Lambayeque, noviembre 2015-noviembre 2016.....	25
Figura 04. Dendrograma generado por UPGMA según ERIC-PCR de las 48 cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITUc y de portadores fecales. Los números en los nodos muestran los porcentajes de <i>bootstrap</i> obtenidos después de 1000 remuestreos. La escala superior corresponde a la similaridad entre aislados basada en el coeficiente de Dice.....	29
Figura 05. Dendrograma generado por UPGMA según REP-PCR de las 48 cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITU de origen comunitario y de portadores. Los números en los nodos del dendrograma muestran los porcentajes de <i>bootstrap</i> obtenidos después de 1000 remuestreos.....	32

Figura 06. Dendrograma generado por UPGMA según ERIC & REP PCR de las 48 cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITU de origen comunitario y de portadores. Los números en los nodos del dendrograma muestran los porcentajes de <i>bootstrap</i> obtenidos después de 1000 remuestreos.....	37
Figura 07. Distribución porcentual de las 48 cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE de pacientes con infección urinaria de origen comunitario y portadores fecales en patrones clónales y no agrupadas (A) y según los electroferotipos obtenidos por dos ERIC y REP-PCR (B).....	38
Figura 08. Distribución mediante PCoA en base a la matriz original de ERIC y REP -PCR de las 48 cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria de origen comunitario y de portadores. HRL, noviembre 2015 –noviembre 2016.....	39
Figura 09. Distribución de las 48 cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE de pacientes con ITUc y pacientes portadores por grupos familiares con y sin relación genética.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 01. Grupos conformados por las 48 cepas de <i>E. coli</i> productora de BLEE aisladas de pacientes con ITUc y portadores fecales. Hospital Regional Lambayeque, noviembre de 2015-noviembre de 2016.....	26
Tabla 02. Patrón clónales conservados según la técnica de ERIC-PCR de las cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria de origen comunitario y de portadores fecales. Hospital Regional Lambayeque. Noviembre 2015– noviembre 2016.....	28
Tabla 03. Patrón clónales conservados según la técnica REP-PCR de las cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria de origen comunitario y de portadores fecales. Hospital Regional Lambayeque. Noviembre2015– noviembre 2016.....	31
Tabla 04. Patrón clónales conservados por dos técnicas de rep-PCR y la combinación de ambas de las cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria de origen comunitario y de portadores fecales. Hospital Regional Lambayeque. Noviembre2015– noviembre 2016	36
Tabla 05. Análisis molecular de varianza obtenida de las 48 cepas de <i>E. coli</i> productora de BLEE aisladas de pacientes con ITUc y de portadores fecales.....	40

RESUMEN

Objetivo. Establecer la relación clonal de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE de pacientes con ITU de origen comunitario (ITUc) y de portadores fecales humanos. Hospital Regional Lambayeque, noviembre 2015 – noviembre 2016. **Materiales y métodos.** Se identificaron las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de orina y de heces de los pacientes con ITUc y de portadores (pacientes y sus familiares), respectivamente, empleando el medio de MacConkey suplementado con cefotaxima, pruebas bioquímicas y el método de Jarlier. Se hizo la caracterización molecular mediante dos variantes de la técnica rep-PCR; se obtuvieron los dendrogramas referidos, con la unión de ambos marcadores; se realizó la validación de los datos y se empleó el AMOVA. **Resultados.** Se obtuvo un 20,7 % (18/87) y un 87,8 % (36/41) de cepas de *E. coli* productoras de BLEE de pacientes con ITUc y de pacientes portadores, respectivamente. El 47,9 % (23/48) de las cepas analizadas derivaron de siete clones (*bootstrap* del 83 al 100 %, ID 0,95 y $r=0,89$) que incluyeron aislamientos de portadores fecales y de pacientes con ITUc o solo del primer tipo que coincidieron o no con el grupo familiar y distrito. Hubo mayor variabilidad genética dentro de los grupos familiares que entre estos y los distritos ($p=0,001$). Además, se determinó que solo siete grupos presentaron al menos dos miembros con la misma cepa. **Conclusión.** Se estableció la relación clonal de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE de pacientes con ITUc y de portadores fecales humanos.

Palabras clave: *Escherichia coli*, betalactamasas de espectro extendido, infección del tracto urinario, comunidad, portador fecal.

ABSTRACT

Objective. To establish the clonal relationship of ESBL producing *Escherichia coli* strains from patients with community UTI and from human fecal carriers. Regional Lambayeque Hospital, November 2015 - November 2016. **Materials and methods.** ESBL producing *Escherichia coli* strains isolated from urine and fecal from patients with community UTI and from carriers (patients and their relatives), respectively, were identified by means of MacConkey supplemented with cefotaxime, biochemical tests and the method of Jarlier. The molecular characterization was made by two variants of the rep-PCR technique; the referred dendrograms were obtained, with the union of both markers; the data were validated and the AMOVA was used. **Results.** 20.7% (18/87) and 87.8% (36/41) of ESBL-producing *E. coli* strains were obtained from patients with community UTI and from carrier patients, respectively. 47.9% (23/48) of the strains analyzed were derived from seven clonal groups (bootstrap from 83 to 100%, ID 0.95 and $r = 0.89$) which included isolates from faecal carriers and from patients with community UTI or only the first type, which belong in the same or different group and district. There was greater genetic variability within the family than between itself and districts ($p = 0.001$). In addition, it was determined that only seven groups had at least two members with the same strain. **Conclusion.** The clonal relationship of ESBL-producing *E. coli* strains from patients with community UTI and human fecal carriers was established.

Key words: *Escherichia coli*, extended spectrum betalactamases, urinary tract infection, community, fecal carrier.

I. INTRODUCCIÓN

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), son enzimas que confieren resistencia a la mayoría de β -lactámicos, mas no a cefamicinas y carbapenemes, y son inactivadas por inhibidores de betalactamasas (Hunter *et al.*, 2010). Además, a través de mecanismos de resistencia genéticamente ligados, suelen inactivar a otros grupos de antibióticos, generando cepas multirresistentes; de manera que limita el arsenal terapéutico e incrementa la morbilidad y mortalidad de los pacientes (Kuenzli *et al.*, 2014). Por tanto, son consideradas como un problema de salud pública, con proporciones alarmantes de prevalencia a nivel mundial (Woerther, Burdet, Chachaty y Andremont, 2013). Según Galván *et al.*, (2016), mencionan que en los últimos años, se ha evidenciado un notable aumento de las infecciones procedentes de la comunidad por cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE, destacándose sobre todo la infección del tracto urinario (ITUc), el factor que comúnmente ha asociado es el uso desmesurado de antibióticos (Valentin *et al.*, 2014).

En la comunidad, se reporta el incremento de portadores fecales de cepas *E. coli* productoras de BLEE, siendo considerado como un potencial reservorio e indicador de su grado de diseminación; que según Lo *et al.*, (2010) en Hong Kong y Valverde *et al.*, (2008) en España, tendría importantes repercusiones en el aumento de las tasas de ITUc. Asimismo, en diversas parte del mundo, como en Colombia y Brasil, se ha documentado la presencia de clones asociadas a cepas de *E. coli* productoras de BLEE, tanto de pacientes con ITUc, como de portadores fecales, que debido a la gran capacidad de diseminación y de supervivencia durante largos períodos de tiempo, expresión de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos no β -lactámicos, crearían un problema de salud pública significativo (Blanco *et al.*, 2016; Gonçalves *et al.*, 2016; Mathers, Peirano y Pitout, 2015).

En la actualidad se emplean diversas técnicas de genotipificación para el análisis de clonalidad de una serie de patógenos comunitarios, los cuales son herramientas necesarias para determinar el número de clones circulantes en la comunidad, identificar el reservorio y la fuente de diseminación; de manera que complementan a los procedimientos fenotípicos, extendiendo los alcances de la epidemiología. Estos métodos son variados, así se tiene la técnica rep-PCR, que se fundamenta en la utilización de cebadores que hibridan de forma específica con unas secuencias de ADN repetitivas (secuencias rep), de función desconocida dispersas por todo el genoma de *Enterobacteriaceae*, siendo las más utilizadas las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) y las secuencias ERIC denominadas secuencias consenso repetitivas intergénicas de *Enterobacteriaceae* (Fernández, López y Pascual, 2013). Las cuales cumplen con la mayoría de criterios de tipificación, además que sus resultados son concordantes con la *gold standard* MSLT (en inglés *Multilocus sequence typing*, MLST) sugerida para estudios a nivel de la comunidad.

En el Hospital Regional Lambayeque (HRL), según los registros del Laboratorio de Bacteriología - Área de investigación, se ha aislado una frecuencia considerable de cepas *E. coli* productoras de BLEE en pacientes con ITUc del 31 % durante el periodo de mayo– setiembre del 2015; que además mostraron multirresistencia. Por otro lado, en la localidad se reporta la presencia de portadores fecales de cepas *E. coli* productoras de BLEE (Aguilar y Cubas, 2015). Asimismo, a nivel mundial como nacional, la mayoría de investigaciones se han centrado en evaluar la prevalencia y transmisión de estas cepas en el ámbito hospitalario (Celis, 2012; Woerther *et al.*, 2013); sin embargo, a nivel local no existe información sobre esta problemática. Según lo anterior, se cuestiona lo siguiente: ¿Existe relación clonal de cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITUc y de portadores fecales humanos, Hospital Regional Lambayeque. Noviembre 2015 –noviembre 2016?

Por esta razón, en este estudio se pretendió establecer la relación clonal de cepas de *E. coli* productoras de BLEE de pacientes con ITUc y de portadores fecales humanos. Hospital Regional Lambayeque. Noviembre 2015 – noviembre 2016. Asimismo, las cepas se identificaron y caracterizaron mediante las técnicas ERIC y REP-PCR, determinando su relación genética. Esto define la cantidad, distribución de clones circulantes y la fuente de diseminación de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en el ambiente extrahospitalario, que explican el aumento de los casos de ITUc, brindando información sobre su realidad epidemiológica en la localidad. Esto condiciona proponer medidas de control y su fortalecimiento dirigidas al control de las infecciones y prescripción de antimicrobianos, siendo el primer reporte a nivel regional como nacional.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En el norte de Sevilla (España) durante Junio de 2005 y septiembre de 2006, se investigó la epidemiología molecular de portadores fecales de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en la comunidad a partir de un total de 126 muestras fecales de pacientes que presentaron ITU producida por este microorganismo y a sus familiares. Determinó que el 44,4 % (56/126) eran portadores de cepas de *E. coli* productoras de BLEE. Además, el análisis molecular mediante REP-PCR y ECP determinó que de las 19 familias con más de un portador, ocho de ellas (42%) tenían dos miembros que compartían aislados con relación clonal. Estos resultados sugieren que la transmisión de persona a persona puede contribuir a la diseminación de BLEE en la comunidad (Rodríguez y López, *et al.*, 2008).

Valverde *et al.*, (2008), en España analizaron el transporte fecal de cepas de *E. coli* productores de BLEE en un grupo de pacientes con ITUc debido a esta misma cepa y en las personas que vivieron con ellos. Se detectó que el 70% (28/40) y el 42,1% (8/19) de los pacientes y sus familiares, respectivamente estaban colonizados por la especie de interés. Por otro parte, según ECP, el 75 % (21/28) de las cepas clínicas de *E. coli* productoras de BLEE de los pacientes presentaron patrones indistinguibles con las de sus muestras fecales y el 66% (6/9) de las cepas de los casos índice fueron iguales con los aislamientos de sus familiares. Lo obtenido indicó que los pacientes con infecciones de la comunidad y los miembros de sus hogares representan un reservorio para los productores de BLEE, aumentando la dispersión de la resistencia en personas sanas.

Herindrainy *et al.*, (2011) en Madagascar durante febrero a junio de 2009 estimaron que un 6,4 % (31/ 484) de pacientes de la comunidad que no habían consumido antibióticos en los tres últimos meses eran portadores fecales de *E. coli* productoras de BLEE y no se halló ningún factor de riesgo con ser portador fecal de esta cepa productora de BLEE. Por otro lado, el análisis de epidemiología molecular mediante REP-PCR y ERIC-PCR evidenció una gran diversidad, lo que reflejaría la difusión de genes de resistencia en la comunidad, sin embargo se evidenció tres clones, conformados por dos a tres aislados.

En Colombia durante agosto a diciembre de 2011, se determinó la prevalencia del gen *bla*_{CTX-M-15} y la tipificación mediante rep-PCR y MLST de cepas de *E. coli* productoras de BLEE de pacientes con diagnóstico probable de ITUc admitidos a urgencias en tres instituciones de salud de tercer nivel. Se obtuvo un 12,5 % de casos positivos (54/431), de los cuales solo 29 aislamientos fueron portador del gen *bla*_{CTX-M-15}; además por rep-PCR se mostró la presencia de diez electroferotipos diferentes, donde 19 de los aislados pertenecían a cuatro patrones clónales (PT1 al PT4). Al comparar estos resultados con el de MLST, se pudo identificar que dos patrones clónales (PT1 y PT4) pertenecían al clon ST 131, el cual ha sido asociado a mayor virulencia. (Blanco *et al.*, 2016)

Wickramasinghe *et al.*, (2012) analizaron la proporción de genotipos de *E. coli* productora de BLEE en muestras de heces en una población comunitaria del este y norte de Birmingham (Reino Unido), para posteriormente, caracterizar y determinar la prevalencia del clon global ST131 (donde ST significa tipo de secuencia) mediante ECP y MLST, que se ha asociado con el transporte de CTX-M-15 y resistencia a quinolonas. De las 723 muestras, 80 fueron identificadas como cepas de *E. coli* productoras de BLEE (11,3 %) y CTX-M-15 fue el genotipo dominante con el 72,5 % de los casos positivos. Además, el 24,1 % (14/58) mostraron pertenecer al clon mundial ST131, que mediante ECP, formaron un gran grupo con el 65% de similitud. Lo que señalaron que esta técnica posee un alto poder de discriminación. Al mismo tiempo, mediante un punto de corte al ≥ 85 % se obtuvieron ocho agrupaciones (de dos a tres cepas) y 41 perfiles únicos.

Woether *et al.*, (2013) determinaron una tasa de 5,3 % (8/151) de portadores de *E. coli* productoras de BLEE durante el 2010, en pacientes de la comunidad de un valle lejano de la Guyana Francesa. Esto no se asoció con ningún factor individual incluida la exposición antimicrobiana. La comparación entre cada aislamiento mediante rep-PCR evidenció dos clones que correspondieron a aislamientos provenientes de cuatro voluntarios que vivían en la misma aldea, y tres de ellos eran vecinos directos. Estos resultados sugieren que la propagación puede ser el resultado de la difusión de cepas de *E. coli* productoras de BLEE y la transferencia de plásmidos en la microbiota intestinal.

En el Oeste de Irán durante febrero de 2012 a 2013, con la finalidad de determinar la distribución clonal y clones predominantes se genotipificó mediante ECP a 49 cepas de *E. coli* productoras de BLEE de pacientes ambulatorios con ITU. Así, se obtuvieron un total de 10 genotipos diferentes, que incluyeron nueve clones comunes, constituidos por dos a 16 cepas y un único perfil. Esto permitió evidenciar la gran diversidad en genotipos, los que podrían ser indicativos de diferentes fuentes de infección adquirida en la comunidad y sugieren el riesgo de un brote en el futuro (Mohajeri, Darfarin y Farahani, 2014).

Leal *et al.*, (2013) en Colombia, determinaron que solo el 3,1 % (9/287) de aislamientos correspondían a *E. coli* productora de BLEE procedentes de pacientes con ITUc atendidos en diferentes centros de salud durante 12 meses. La genotipificación mediante REP-PCR evidenció un patrón clonal conformado por cuatro aislamientos procedentes de dos ciudades de Colombia, que además de relacionarse genéticamente, producían BLEE tipo CTX-M y correspondían al clon ST131. Mediante estos hallazgos, confirmaron la emergencia de enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación como causa de ITU de inicio comunitario.

En Suiza Kuenzli *et al.*, (2014), durante diciembre de 2012 a octubre de 2013, realizaron un estudio prospectivo observacional para determinar la tasa de colonización y la caracterización molecular de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en 170 personas saludables que viajaron a países del Sur de Asia. El 69.4 % presentó colonización por *E. coli* productora de BLEE después del viaje y mediante rep –PCR la mayoría de aislados fueron esporádicos y clonalmente no relacionados. Por MLST solo se encontraron tres cepas pandémicas (ST 131 y ST 648) y la BLEE más predominante fue CTX M-15.

Gonçalves *et al.*, (2016), caracterizaron mediante ERIC-PCR y MLST a 23 cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE, resistentes a múltiples fármacos (MDR), aislada de pacientes con infección urinaria adquirida en la comunidad de la Región Centro-Oeste de Brasil durante el período julio 2013 a abril 2014. El análisis del dendrograma mostró que la resistencia a múltiples fármacos y los grupos de CTX-M se distribuyeron entre todas las cepas, independiente de la clonalidad. Además encontraron que dos aislamientos presentaron el mismo perfil de bandas. Se observaron entre los aislamientos los tipos de secuencia (STs) asociados con clones de resistencia pandémica tales como ST131 y ST648. Estos hallazgos mostraron una evidencia preocupante del potencial de diseminación multirresistencia en la comunidad.

En el área de Lima metropolitana Carbajal, (2016) determinó una la prevalencia del 17,7 % (32/181) de cepas de *E. coli* productora de BLEE causantes de ITUc. Además el análisis de los perfiles generados por REP-PCR y PFGE, demostró que todas fueron distintas genéticamente (diferentes perfiles amplificados por rep PCR y diferentes perfiles de fragmentos de DNA mediante PFGE), lo que significa que las cepas proceden de distintas fuentes y localización geográfica, es decir, no tienen origen clonal y por tanto cada una de las cepas es prácticamente un genotipo y circulan indistintamente entre los distritos de esta comunidad, sin asociación epidemiológica entre ellas. Los resultados obtenidos en este estudio permiten sugerir el empleo de las dos técnicas PFGE y rep-PCR, ya que cumplieron con los criterios de evaluación de métodos de tipificación como: la capacidad de tipificación y de reproducibilidad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en los laboratorios de Bacteriología y de Biología Molecular del Área de Investigación del Hospital Regional Lambayeque durante noviembre del 2015 a noviembre del 2016.

3.1. Población y muestra

3.1.1. Población:

La población estuvo constituida por las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aislada de pacientes con ITUc y de portadores fecales. Hospital Regional Lambayeque, noviembre 2015- noviembre 2016.

3.1.2. Muestra:

Se trabajó con 12 y 36 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITUc y de portadores fecales, respectivamente. Hospital Regional Lambayeque, noviembre 2015- noviembre 2016, que cumplieron con criterios de inclusión y exclusión.

Diseño muestral.

Se utilizó un muestreo no probalístico consecutivo. Se tomaron en cuenta las cepas de *E. coli* productoras de BLEE de los pacientes y de los portadores fecales que cumplieron los criterios de la investigación:

Criterios de inclusión

Se incluyeron cepas de E. coli productoras de BLEE de:

a. Pacientes con ITUc:

- De consultorio externo
- De ambos géneros, mayores de 18 años

- Con orden de urocultivo, con reacción inflamatoria en orina y con un crecimiento mayor a 100 000 UFC/ mL en placa.
- Sin registro de hospitalización y tratamiento antimicrobiano durante los últimos tres meses y 15 días respectivamente (Armando, Machado y Esther, 2011).
- Con residencia estable en la ciudad de Chiclayo y que no reporten viajes en los tres últimos meses fuera del departamento de Lambayeque.

b. Portadores fecales procedentes de:

- Los pacientes incluidos en el “criterio a”.
- Los familiares del paciente del “criterio a” mayores de 18 años, que residan en la misma vivienda y compartan los mismos ambientes.

Criterios de exclusión

No se tomaron en cuenta:

- Microorganismos distintos a *E. coli* productoras de BLEE aisladas de los pacientes con ITU comunitaria y familiares del mismo.
- Cepas de *E. coli* productoras de BLEE de los pacientes con enfermedad diarreica aguda (EDA).

3.2. Material biológico

Cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de los pacientes con ITU de origen comunitario y de portadores fecales humanos del Hospital Regional Lambayeque, obtenidas durante el periodo de la investigación.

3.3. Metodología

3.3.1. Identificación de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infecciones urinarias de origen comunitario y de portadores fecales.

Se trabajó con dos tipos de muestras biológicas:

- Muestras de orina: Se consideraron las muestras de orina de pacientes de consultorio externo de la ciudad de Chiclayo que llegaron por diagnóstico de ITU al laboratorio de bacteriología del HRL. Posteriormente a los pacientes con cultivos positivos para *E. coli* productora de BLEE se les aplicó una ficha de recolección de datos (ANEXO 02), lo que permitió determinar si las cepas provenían de pacientes que cumplían con los criterios establecidos y así considerarlas dentro del estudio.
- Muestras de heces: Para este caso fueron las muestras de heces provenientes de los pacientes con ITUc y de sus familiares, debidamente identificadas con los datos completos. También se le aplicó una ficha de recolección de datos (ANEXO 03).

a. *Detección de bacterias productoras de BLEE*

Las muestras obtenidas se sembraron en medio de MacConkey suplementado con cefotaxima (4 ug/mL) (Hernández, Araque, Millán, Millán y Vielma, 2014) para promover la selección de cepas productoras de BLEE y garantizar la selección de *Enterobacteriaceae*, posteriormente se incubaron las placas de Petri sembradas a 37°C por 24 horas. Se seleccionaron las colonias sospechosas para *Escherichia coli* (Figura 01).

b. Identificación de cepas de E. coli y confirmación del fenotipo BLEE.

Las cepas de los pacientes con ITUc seleccionadas se identificaron mediante las pruebas bioquímicas según lo recomendado por el manual del INS (Negat, Posit, Gluc y Gluc, 2005). En el caso de la cepas de los portadores fecales se conservaron en TSA hasta terminado el tiempo de muestreo. Posteriormente se reactivaron los aislados conservados por dispersión y agotamiento en el medio de MacConkey y se incubaron a 35 °C por 18 a 24 horas y se identificaron mediante pruebas bioquímicas.

La confirmación de la producción de BLEE se hizo por el método de Jarlier descrito por el Comité de la Sociedad Francesa de Microbiología (como se citó en Lezameta, Gonzáles y Tamariz, 2010):

- En el centro de una placa de Petri con agar Müeller Hinton con 4 mm de alto se le inculó una suspensión bacteriana de una turbidez visible igual a la densidad correspondiente al 0,5 de la escala de McFarland, sobre esta se colocaron los discos de susceptibilidad antimicrobiana: Ceftazidima, CAZ (30 µg); Cefotaxima, CTX (30 µg); Ceftriaxona, CRO (30µg) y Aztreonam a ATM (30ug) a 20 mm de distancia de centro a centro de un disco central de amoxicilina/ácido clavulánico, AMC (20/10 µg). Se incubó a 35°C por 18 - 24h. La presencia de producción de BLEE se manifestó con el efecto sinérgico entre el inhibidor (AMC) y los discos de antimicrobianos (efecto de huevo, cola de pez o balón de fútbol americano). Este proceso de ilustra en la Figura 01.

Control de calidad de discos

Antes de realizar la prueba de confirmación del fenotipo BLEE se realizó el control de los discos utilizando una cepa de *E. coli* ATCC 25922, cuyos valores de los halos de deberán ingresar en el rango establecido por el CLSI, (2014). También se realizó un control del método para la detección de BLEE utilizando una cepa ATCC 700603 de *K. pneumoniae* productora de BLEE.

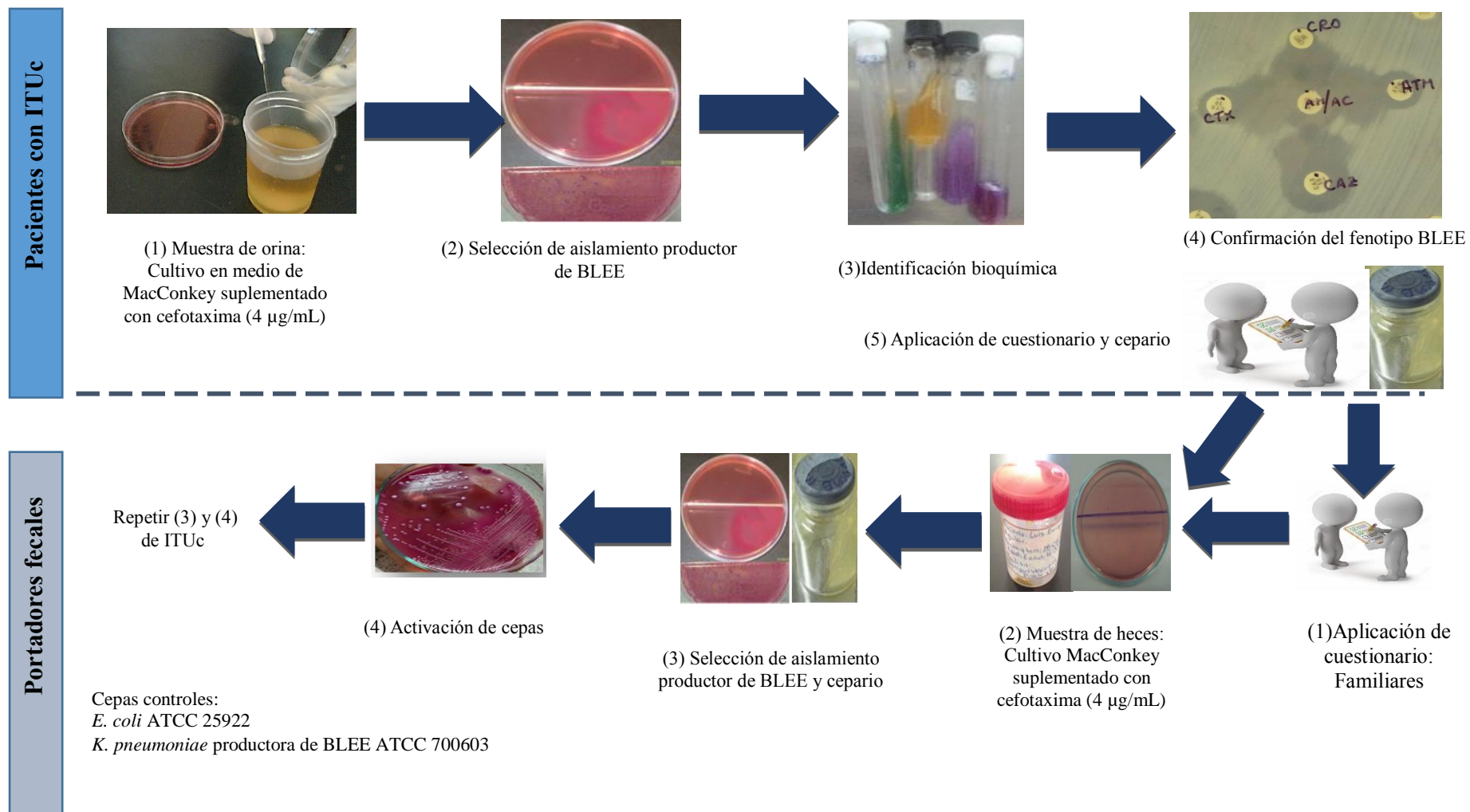


Figura 01. Diagrama de trabajo para la identificación de cepas de *E. coli* productora de BLEE aisladas de pacientes con infecciones urinarias de origen comunitario y de portadores fecales humanos. Hospital Regional Lambayeque, noviembre 2015- noviembre 2016.

3.3.2. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* productora de BLEE mediante ERIC-PCR y REP-PCR.

Se seleccionaron las cepas de *E. coli* productoras de BLEE que provenían de pacientes con ITUc y de portadores fecales (pacientes y sus familiares), las cuales conformaron un grupo. Posteriormente las cepas elegidas se propagaron en medio BHI (*Brain Heart Infusion*) (1,5 mL) y luego se incubaron a 35°C durante 18-24 horas.

Extracción y purificación de ADN genómico.

Se empleó el método de extracción con fenol y precipitación con etanol dada a las buenas amplificaciones previas estandarizaciones. Según describe Sambrook y Russell, (2001), emplea una mezcla de fenol: cloroformo : alcohol isoamílico (P: C: I) para remover proteínas contaminantes, y la precipitación con etanol al 70 % para remover sales y pequeñas moléculas orgánicas.

Procedimiento.

Se centrifugó cada criovial que contenía el cultivo bacteriano. El sobrenadante obtenido se descartó totalmente y se agregó 250 µL de agua bidestilada al paquete celular y se llevó a vórtex. Para la precipitación de proteínas, se adicionó 250 µL de disolventes orgánicos P: C: I y se llevó a vórtex, posteriormente se sumó cloroformo, que aparte de desnaturalizar proteínas estabiliza la fase acuosa con la del fenol.

Se llevó a centrifugar por 14000 rpm por 5 min y se recuperó la fase superior y se colocó en otro tubo de polipropileno de 1.5 mL. Para eliminar el exceso de fenol se adicionó nuevamente cloroformo y se centrifugó. La fase superior recuperada (ADN queda en la fase acuosa y en la fase orgánica quedan las proteínas y otros contaminantes) se colocó en un tubo nuevo.

Posteriormente se añadió 20 μ L de acetato de sodio 3M. Para precipitar el ADN se adicionó de etanol absoluto frío y se centrifugó por 30 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó nuevamente pero con etanol frío al 70%. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet *overnight* (toda la noche), así el exceso de etanol se volatilizó. Al día siguiente las muestras fueron rehidratadas en 50 μ L de agua PCR y se conservó hasta su utilización a 4°C (Protocolo detallado en ANEXO 08).

Evaluación de la integridad de ADN mediante electroforesis.

La evaluación de la integridad del ADN extraído se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % en buffer TAE 1X en un sistema de electroforesis BIO-RAD Sub CELL GT. Seguidamente, se colocó 5 μ L de cada muestra de ADN previamente mezclada con 1 μ L de buffer de carga al 1X que ayuda de dos maneras: contiene glicol que hace a la muestra más densa que el amortiguador TAE, permitiendo que el ADN se quede en el pozo del gel; y debido a su color, es posible seguir el movimiento de las muestras durante la electroforesis.

La corrida electroforética se realizó por 60 minutos a 80V. Posteriormente, el teñido se realizó en una solución que contenía BrEt (0,5 mg/mL) por 20 min. Transcurrido ese tiempo se fotodocumentó el gel mediante el scanner molecular PHAROS FX Plus y el software *Quantity one* BIORAD.

Tipificación por ERIC PCR y REP PCR.

Previa estandarización de los componentes del sistema de PCR de cada técnica, se realizaron las amplificaciones para ERIC-PCR y REP-PCR, utilizando las muestras de ADN pertenecientes a las cepas seleccionadas. Adicionalmente, se consideró la muestra de ADN genómico de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE de un familiar portador como *outgroup* o grupo externo, el cual es un taxón terminal y que preferentemente suele ser un grupo hermano del grupo en estudio o *ingroup*. Los grupos externos son utilizados para anclar un dendrograma, de manera que la raíz del dendrograma se coloca entre el grupo externo y el grupo en estudio. Por otro lado, se colocaron dos muestras más como estándares, estos últimos son para mejorar la determinación de la igualdad de bandas al momento de realizar el *scoreo*. Se realizó dos a tres repeticiones para cada técnica dependiendo de la repetitividad del patrón de bandas obtenido, haciendo un total de 298 reacciones.

Técnica ERIC-PCR.

Se emplearon los cebadores ERIC 1R (5'-ATC TAA GCT CCT GGG GAT TCA-3') y ERIC 2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGA GCG-3') de acuerdo a lo reportado por Versalovic, Koeuth y Lupski (1991). Se preparó un mix PCR (ANEXO 11). Este fue mezclado de manera uniforme (llevó a vortex), posteriormente se repartió a cada tubo de PCR 10,5 µL del mix y se adicionó los 2 µL de ADN correspondiente a cada muestra, finalmente se mezcló bien toda la reacción. Posteriormente se realizó un golpe de centrifuga antes de llevar las reacciones al termociclador.

Las condiciones de ciclaje estuvieron conformadas por la fase de desnaturalización inicial a 94 °C por siete minutos seguida por 45 ciclos de desnaturalización a 94°C por un minuto, hibridación o *annealing* con 41,2 ° C por un minuto y extensión a 72 °C por cinco minutos, luego un ciclo de extensión final a 72 ° C por siete minutos (Figura 02).

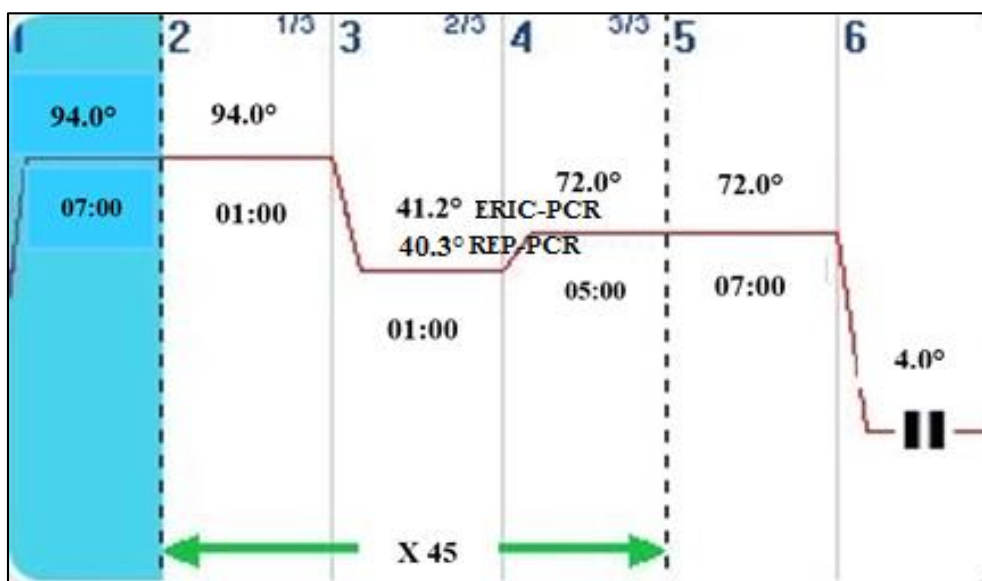


Figura 02. Programa de temperatura para las técnicas ERIC-PCR y REP-PCR ingresada en el termociclador *Eppendorf*.

Técnica REP – PCR

Se trabajaron con los iniciadores de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP): REP 1R-Forward (5'- III ICG ICG ICA TCI GGC-3') y REP 2-I Reverse (5'-ICG ICT TAT CIG GCCTAC-3') y se consideraron las mismas especificaciones de preparación del mix PCR y las condiciones de ciclaje mencionadas en las técnicas de ERIC -PCR, para este último solo se consideró la temperatura de *annealing* a 40,3°C (Figura 02).

Electroforesis de los productos de PCR.

Luego de las amplificaciones, se sacó cada grupo de reacciones de PCR obtenidos para cada tipo de marcador y fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 2%, empleando buffer TAE al 1X. Se cargaron los 12,5 μ L de muestra de PCR mezclada con 1 μ L buffer de carga en un gel con 15 pocillos. Adicionalmente, se colocaron en el primero y ultimo pocillo 5 μ L del marcador de peso molecular de 100 pb del fago λ y se consideró la reacción de PCR procedente muestra de ADN en estudio como estándar en el segundo y penúltimo carril.

Se consideraron 60 V/11 min, 110 V/1 h 26 min y 60 V/10 min para pre corrida, corrida y post corrida individualmente. Estas variaron dependiendo del número de usos del buffer de corrida. La fuente poder se apagó cuando el frente esté a 2,5 cm del extremo positivo. Posteriormente el teñido se realizó en una solución que contenía BrEt (0,5 mg/mL) por 15 min.

Fotodocumentación.

Los geles se fotografiaron con el scanner molecular PHAROS FX Plus, donde se registró y almacenó con el software *Quantity one* BIORAD.

3.3.3. Relación genética de las cepas de productoras de BLEE procedentes de pacientes emparentados.

De acuerdo al resultado obtenido en la fase anterior, se determinó cuántos grupos familiares presentaron cepas con relación genética: cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE de pacientes con ITUc, cepas de pacientes y de sus familiares, que fueron aisladas para estos últimos casos de muestras de heces.

3.3.4. Análisis y procesamiento de datos

Análisis estadístico

La base de datos se elaboró en el programa de computación Microsoft Excel. Los datos de las variables consideradas en los cuestionarios, solo en base a los casos positivos de *E. coli* productoras de BLEE en pacientes con ITUc y en portadores fecales, así como para analizar las características de los pacientes y el perfil genético de los aislamientos, se presentaron en forma de tablas o gráficos, en las que se especificó la frecuencia absoluta y/o relativa. Por otro lado, se realizó la prueba estadística de Fisher exacta, para determinar asociación entre las variables independientes respecto a los casos positivos de *E. coli* productora de BLEE en los portadores fecales. Se consideró un nivel de significancia del 0,05 y significativo un valor de $p < 0,05$. Para tales cálculos se utilizó los softwares Past3 y XLSTAT.

Análisis bioinformático.

A continuación se describen los siguientes procedimientos en la que se sometieron por separado los geles obtenidos por ERIC-PCR y REP-PCR.

a. Análisis de los geles.

Esto se realizó mediante el software *Gel Compar II v 6,6 (Applied Maths Company)*:

- **Bandeo o scoring:** Se identificó cada una de las bandas incluyendo los estándares, para esto se tomaron en cuenta la repetitividad de su presencia en cada gel. Estas se detectaron con una sensibilidad del 60 % y con una tolerancia del 1,4 %. Las bandas que están sujetas a interpretaciones ambiguas fueron excluidas. Posteriormente el perfil de cada una se ajustó según los picos mostrados en el electroferograma.

- **Matching:** A las bandas individuales identificadas dentro de una línea en el gel se les asignó una posición particular (esto es frecuentemente hecho por fragmentos indicadores del peso molecular y una muestra de ADN que fueron tomados como estándares secundarios) y diferentes líneas fueron simultáneamente analizadas por comigración de bandas del mismo peso molecular (pb).
- **Registro de patrones de bandas obtenidas:** Una vez analizados los geles, el programa exportó un archivo en formato Excel. Esta era una matriz binaria o matriz de presencia o ausencia, así la presencia de una banda en una cepa era expresada como uno y su ausencia como cero. Se consideraron todas las bandas registradas, con una frecuencia a $> 2 \%$. Adicionalmente se unieron las matrices binarias de ERIC PCR y REP PCR, según los pesos moleculares que presentaba cada banda.
- **Matriz de similaridad:** A partir de la matriz binaria y aplicando coeficiente de Dice se generó una matriz de similitud.

DICE es uno de los más apropiados para este análisis, debido a que le da más importancia a las bandas presentes en ambos individuos, es decir tiene un significado completo en función de la similitud del ADN. Dice, 1945; Nei y Lei, 1979(como se citó en Castañón, Ramírez, Ruiz y Mayek, 2011).

$$DICE = \frac{2a}{(2a + b + c)}$$

Donde:

a: número de bandas presentes en las dos cepas

b: número de bandas presentes en la cepa A pero no en la cepa

c: número de bandas presentes en la cepa B pero no en la cepa A

- **Dendrograma:** Este se construyó a partir de la matriz de similitud, mediante el algoritmo de agrupamiento jerárquico conocido como UPGMA (método de agrupamiento de pares no ponderados usando la media aritmética), que une ramas en un dendrograma basándose en el criterio de maximizar la similitud entre pares y entre promedios de pares ya unidos.

b. Clasificación de los patrones clónales y determinación de categorías genéticas

El punto de corte para los dendrogramas fue según la concordancia de la agrupación que se obtuvo para cada técnica de genotipaje y a partir de este se definieron los patrones clónales. Posteriormente, se consideraron las categorías genéticas sugeridas por Tenover *et al.*, (1995):

- Cepas indistinguibles: Aquellas que presenten de 0 a 1 de diferencia.
- Cepas cercanamente relacionadas: Con diferencia de dos a tres bandas.
- Cepas posiblemente relacionadas: Cepas que difieren de cuatro bandas.

c. Análisis molecular de varianza (AMOVA) y PCoA (análisis de coordenadas principales)

Mediante el programa Gen alex versión 6,5, se realizó un análisis molecular de varianza entre y dentro de los 12 grupos de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE. Empleando el mismo programa se realizó un PCoA para tener una mejor visualización de la distribución de las cepas.

d. *Grado de confianza de los resultados.*

- Métodos de remuestreo en las matrices binarias (*Bootstrapping*): Se empleó el software PAST3 para evaluar la robustez de la topología del dendrograma mediante un test de 1000 *bootstraps*. Este señala el porcentaje de probabilidad que tiene cada rama del dendrograma en aparecer. Así si se generó un determinado número de dendrogramas eliminando de manera aleatoria un dato cada vez (Merino, 2006, p. 42). El análisis se realizó a partir de la matriz de presencia y ausencia, se generaron 1000 matrices de entrada, de esta se obtuvo una matriz de similitud por cada una de las matrices remuestradas y una matriz de similitud promedio, y de esta última un dendrograma.
- Cuantificación de la distorsión mediante la elaboración de la matriz cofenética: Esto se obtuvo mediante el mismo software empleado para el análisis de geles. Se generó una matriz cofenética (matriz diagonal) a partir del dendrograma, la cual se comparó con la matriz original de similitud calculando el coeficiente de correlación de mantel (r). Esto nos permitió conocer qué tan bien el dendrograma representa los datos de la matriz de similitud. Se empleó 999 permutaciones. El resultado aparece como un valor de r (ajuste entre los valores de ambas matrices). Este valor, generalmente, varía entre 0.7 y 0.95, dependiendo del método de encadenamiento (u ordenación), y de la naturaleza de los OTUs (cepas) clasificados.

A continuación se muestran los valores según corresponde:

- $0.9 < r$: ajuste muy bueno
- $0.8 < r < 0.9$: ajuste bueno
- $0.7 < r < 0.8$: ajuste pobre
- $0.7 < r$: muy pobre

- Poder discriminativo: Se calculó el poder de discriminación (ID) según los datos obtenidos de los dendrogramas de ERIC PCR, REP PCR y la fusión de ambos. Este se cuantificó con el índice de diversidad de Simpson (Coll, Teresa, Angeles, Vázquez y Vila, 2005) e idealmente, este debe ser superior a 0.95.

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1) \sum_{j=1}^S nj(nj-1)}$$

Donde:

N= n° de cepas;

S=n° tipos distintos;

nj= n° cepas pertenecientes al tipo J.

3.3.5. Consideraciones éticas.

Para el aislamiento de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE se solicitó al Comité de ética en investigación del HRL el uso de las muestras de orina de los pacientes con infección urinaria provenientes de consultorio externo de la ciudad de Chiclayo. Posteriormente se solicitó el consentimiento informado de los pacientes con casos positivos de *E. coli* productora de BLEE, así como el consentimiento informado de sus familiares para su participación en el estudio y poder determinar si eran portadores fecales del microorganismo.

IV. RESULTADOS

4.1. Cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infecciones urinarias de origen comunitario y portadores fecales de la ciudad de Chiclayo

Durante el período de muestreo de enero a mayo de 2016, se atendieron un total de 87 pacientes provenientes de la ciudad de Chiclayo. De estos, se aislaron 30 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, de los cuales solo 18 pertenecieron a pacientes con ITUc y cumplieron con criterios para la investigación, esto representó el 20,7% (figura 03B) del total de pacientes atendidos procedentes de la localidad (IC 95 %: 12,2 a 29,2 %). De estos pacientes, 12 dejaron muestras de heces y todas fueron positivas para *E. coli* productoras de BLEE (figura 03). Asimismo, se obtuvieron 29 muestras de heces, que correspondieron a los familiares de los pacientes y se aislaron 24 (82,8 %) cepas de interés (IC 95%: 69 a 96,5) (Figura 03).

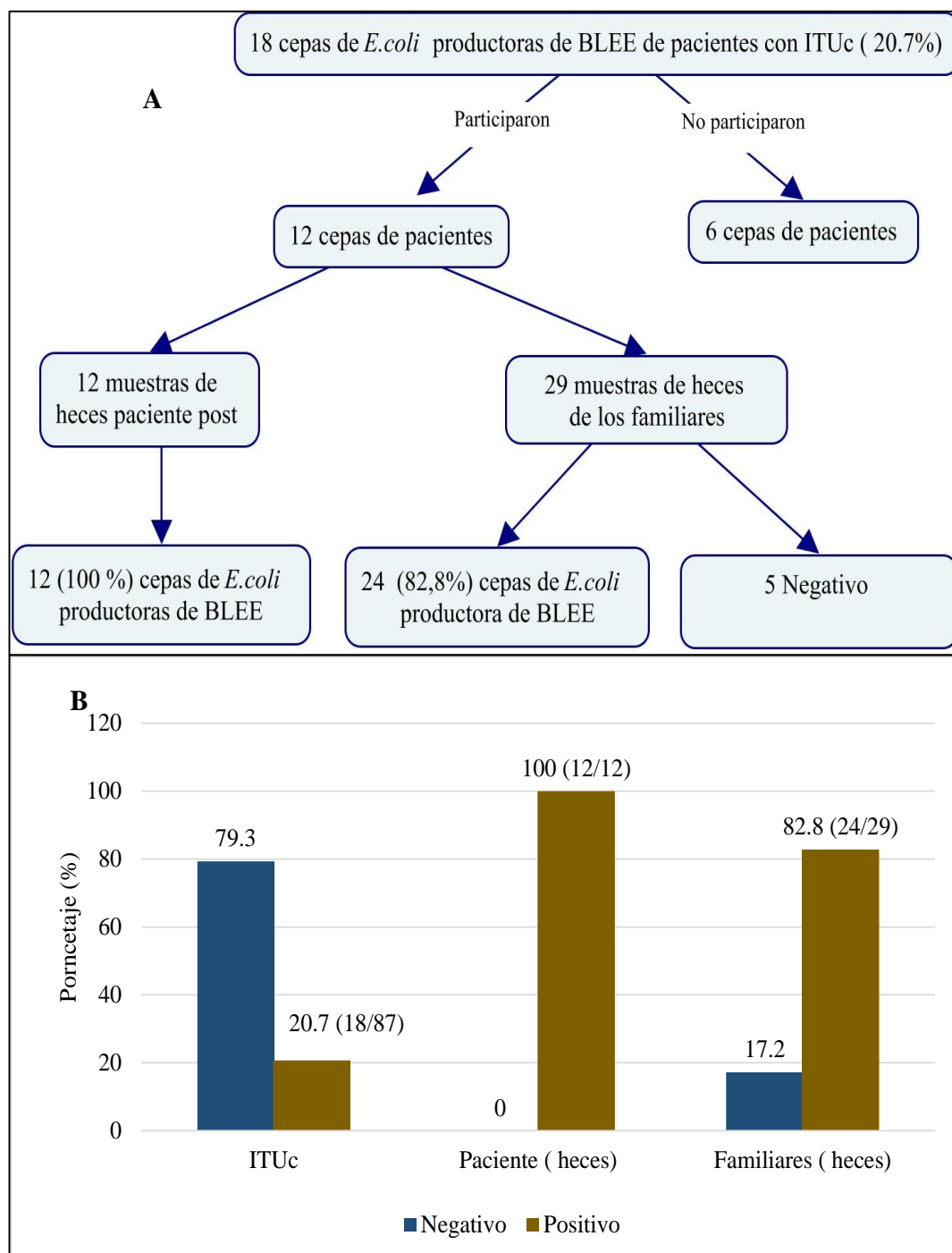


Figura 03. Frecuencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en pacientes con ITUc, en pacientes (heces) y en sus familiares (heces). Hospital Regional Lambayeque, noviembre 2015-noviembre 2016.

Adicionalmente, de todos los casos positivos en heces para *E. coli* productora de BLEE no se encontró asociación estadística con las características consideradas en los cuestionarios ($p > 0.05$). Los datos del presente se encuentran detallados en el ANEXO 15.

A partir de los casos positivos de *E. coli* productoras de BLEE provenientes de 12 pacientes de ITUc, paciente y sus familiares se constituyeron 12 grupos familiares (Tabla 01).

Tabla 01. Grupos conformados por las 48 cepas de *E. coli* productora de BLEE aisladas de pacientes con ITUc y portadores fecales. Hospital Regional Lambayeque, noviembre de 2015-noviembre de 2016.

Grupo familiar	N° de cepas			Total
	ITUc	Heces		
	Paciente	Paciente	Familiar	
G1	1	1	1	3
G2	1	1	1	3
G3	1	1	3	5
G4	1	1	4	6
G5	1	1	1	3
G6	1	1	3	5
G7	1	1	3	5
G8	1	1	1	3
G9	1	1	2	4
G10	1	1	1	3
G11	1	1	1	3
G12	1	1	3	5
Total	12	12	24	48

4.2. Caracterización molecular mediante ERIC-PCR y REP-PCR de cepas de *E. coli* productora de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria de origen comunitario y de portadores fecales

Se seleccionaron 48 cepas de *E. coli* productoras de BLEE que pertenecieron a 12 grupos familiares (G1-G12), procedentes de los distritos de La Victoria, Chiclayo y José Leonardo Ortiz (ANEXO 16). Por otro lado, el cálculo del coeficiente de correlación cofenético para los tres dendrogramas de cada técnica de tipificación y el consenso de ambas arrojó un valor de $r = 0,88$ y $0,89$ respectivamente, dando un alto grado de confiabilidad que estos representaron las matrices de similitudes originales de las 48 cepas analizadas. Además, el poder de discriminación para los tres casos fue al $0,95$, lo que indicó que las técnicas tuvieron una alta capacidad de diferenciar un aislado de otro.

4.2.1. Tipificación molecular mediante ERIC – PCR.

Se obtuvieron de 12 a 27 bandas por perfil (*fingerprints* o electroferotipo), con un promedio de 17 y con tamaños entre 209,9 a 1081 pb. Además, a un punto de corte (*cut off*) al 86,6 % se mostró la presencia de 32 electroferotipos, constituidos por siete patrones clónales y 25 perfiles únicos (ver figura 08). Los patrones clónales mostraron del 86,6 al 93,4 % de similitudes genéticas y estuvieron soportados por altos valores de *bootstsrp* entre el 57 a 97%. Estos presentaron de dos a 11 cepas de familiares portadores o de pacientes con ITUc y de los familiares, que se categorizaron para cada caso como estrechamente relacionadas.

Se destacó el patrón clonal **E1**, que presentó la mayor cantidad de aislamientos de pacientes con ITUc y de familiares de distintos grupos y lugares de origen, que se distribuyeron en dos sub patrones clónales e integraron cepas idénticas y una cepa posiblemente relacionada. Por otro lado, los patrones clónales **E6**, **E14**, **E24** y **E27** reunieron cepas del mismo grupo familiar, mientras que **E3** y **E5**, conformaron cepas que coincidieron solo con el lugar de procedencia y **E24** incluyó las cepas del mismo paciente (Tabla 02 y Figura 04).

Tabla 02. Patrones clónales revelados según ERIC-PCR de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria de origen comunitario y de portadores fecales. Hospital Regional Lambayeque. Noviembre 2015– noviembre

Patrones clónales	Bootstrap (%)	Origen distrital	Mes	Aislamiento		Categorías y similitudes genéticas (%) ^a
				ITUc	Portador	
E1		Chiclayo	Marzo	G8 ITUc	G8 PX	
E1		Chiclayo	Marzo	-	G8 P1	
E1		Chiclayo	Marzo	G9 ITUc	G9 P4	
E1	88	José Leonardo Ortiz	Marzo	G1 ITUc	-	93,4 (B)
E1		José Leonardo Ortiz	Marzo	G3 ITUc	G3 P1	
E1		José Leonardo Ortiz	Abril	G5 ITUc	G5 P1	
E1		La Victoria	Abril	G12 ITUc	-	86,6 (C)
E3	85	Chiclayo	Marzo	-	G9 PX	87,5 (B)
E3		Chiclayo	Abril	-	G10 PX	
E5	93	José Leonardo Ortiz	Febrero	G2 ITUc	-	92 (B)
E5		José Leonardo Ortiz	Marzo	-	G3 PX	
E6	71	La Victoria	Abril	-	G12 P2	91,4 (B)
E6		La Victoria	Abril	-	G12 P3	
E14	57	Chiclayo	Abril		G7 PX	90,3 (B)
E14		Chiclayo	Abril		G7 P1	
E24	57	La Victoria	Marzo	G11 ITUc	G11 PX	86,7 (B)
E27	97	José Leonardo Ortiz	Abril	-	G4 P1	89,5 (B)
E27		José Leonardo Ortiz	Abril	-	G4 P3	

Gn: Grupo familiar; Gn ITUc: cepa de paciente con ITUc; Gn PX: Cepa del paciente (heces); Gn Pn: Cepa del familiar (heces)

A: Idénticas, B: Estrechamente relacionadas, C: posiblemente relacionadas.

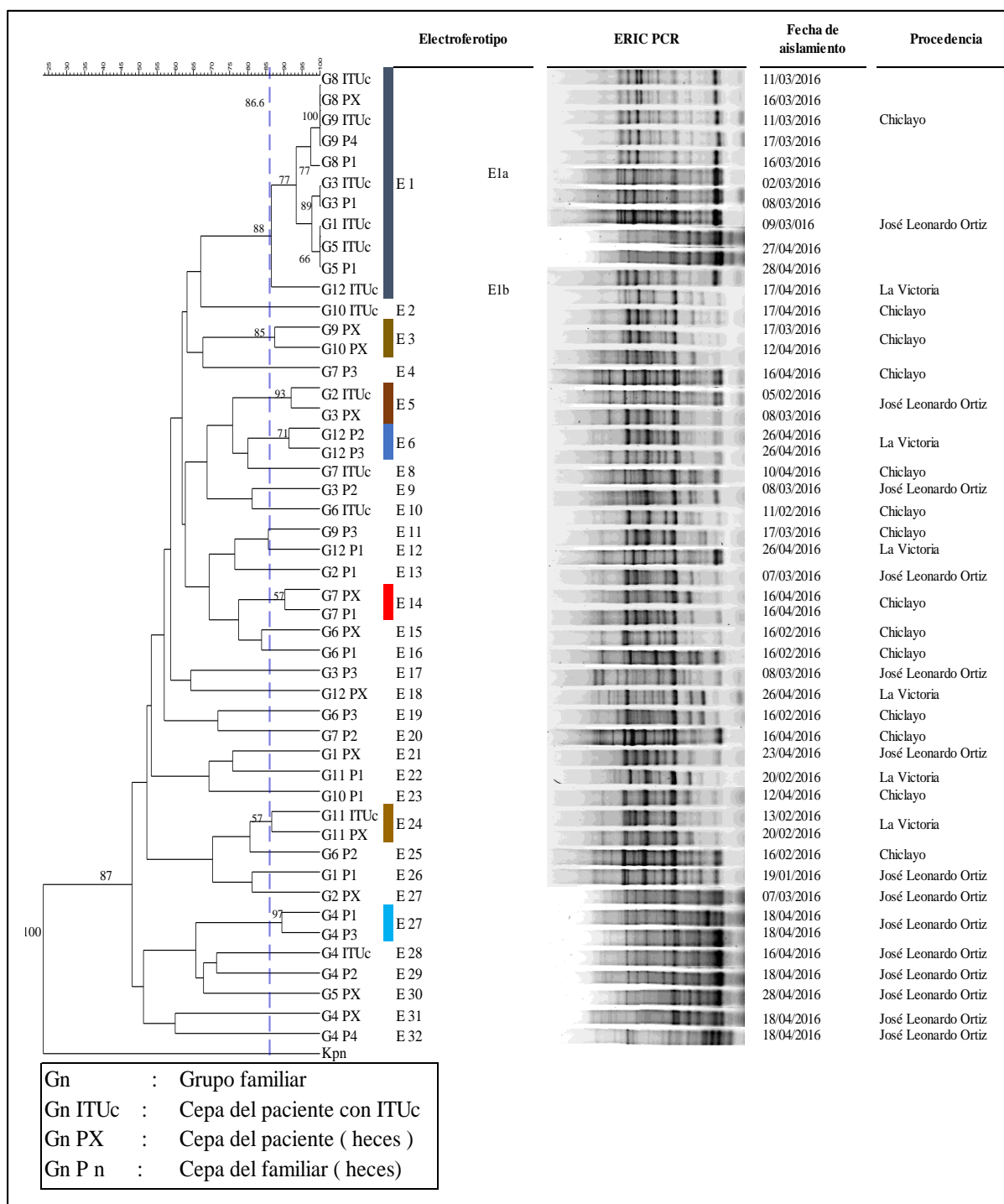


Figura 04. Dendrograma generado por UPGMA según ERIC-PCR de las 48 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITUc y de portadores fecales. Los números en los nodos muestran los porcentajes de *bootstrap* obtenidos después de 1000 remuestreos. La escala superior corresponde a la similaridad entre aislados basada en el coeficiente de Dice.

4.2.2. Tipificación molecular mediante REP – PCR.

Por la técnica de REP-PCR, se amplificaron de 10 a 23 bandas por perfil electroforético, con un promedio de 17,6 y con pb variables de 199,9 a 1113. Se consideró un punto de corte al 89 % y como resultado se mostraron 31 electroferotipos conformados por seis patrones clónales y 25 genotipos únicos. Las similitudes genéticas de los patrones clónales oscilaron del 89,7 al 95,6 % y presentaron un alto soporte estadístico de *bootstrap* de 64 a 97%, excepto el patrón **R19** con un valor discreto de 39. Las cepas que los integraron se discriminaron como estrechamente relacionadas y conglomeraron las mismas de los grupos obtenidos por ERIC-PCR, salvo el patrón E14. No obstante, la distribución varió un poco en el **patrón clonal R1**, así los aislados se distribuyeron en tres subtipos, con cepas indistinguibles. Además, **R19** presentó los subpatrones clónales R19a y R19b que contenían las mismas cepas presentes en E27 y E3 para cada uno (Tabla 03 y Figura 05), por otra parte, mediante esta técnica las cepas G6P2 y G7PX se conglomeraron en **R10** y solo concordaron en el distrito de procedencia.

Tabla 03. Patrones clónales revelados según REP-PCR de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria de origen comunitario y de portadores fecales. Hospital Regional Lambayeque. Noviembre 2015– noviembre

Patrón clonal rep-PCR	Bootstrap (%)	Origen distrital	Mes de aislamiento	Aislamiento		Categorías y similitudes genéticas (%) ^a
				ITUc	Portador	
R1		Chiclayo	Marzo	G8 ITUc	G8 PX	
R1		Chiclayo	Marzo	-	G9 P4	A(100)
R1		Chiclayo	Marzo	G9 ITUc	G8 P1	A(100)
R1	97	José Leonardo Ortiz	Marzo	G1 ITUc	-	B (95,6)
R1		José Leonardo Ortiz	Marzo	G3 ITUc	G3 P1	
R1		José Leonardo Ortiz	Abril	G5 ITUc	G5 P1	A(100)
R1		La Victoria	Abril	G12 ITUc	-	
R10	71	Chiclayo	Febrero	-	G6P2	B(93)
R10		Chiclayo	Marzo	-	G7PX	
R13	90	La Victoria	Abril	-	G12 P2	B (89,7)
R13		La Victoria	Abril	-	G12 P3	
R14	90	José Leonardo Ortiz	Febrero	G2ITUc	-	B (89,7)
R14		José Leonardo Ortiz	Marzo	-	G3 PX	
R19a	81	José Leonardo Ortiz	Abril	-	G4 P1	
R19a		José Leonardo Ortiz	Abril	-	G4 P3	B (90)
R19b	34	Chiclayo	Marzo	-	G9 PX	
R19b		Chiclayo	Abril	-	G10 PX	B (92,7)
R20	64	La Victoria	Marzo	G11ITUc	G11 PX	B (93)

Gn: Grupo familiar; Gn ITUc: cepa de paciente con ITUc; Gn PX: Cepa del paciente (heces); Gn Pn: Cepa del familiar (heces)

A: Idénticas, B: Estrechamente relacionadas

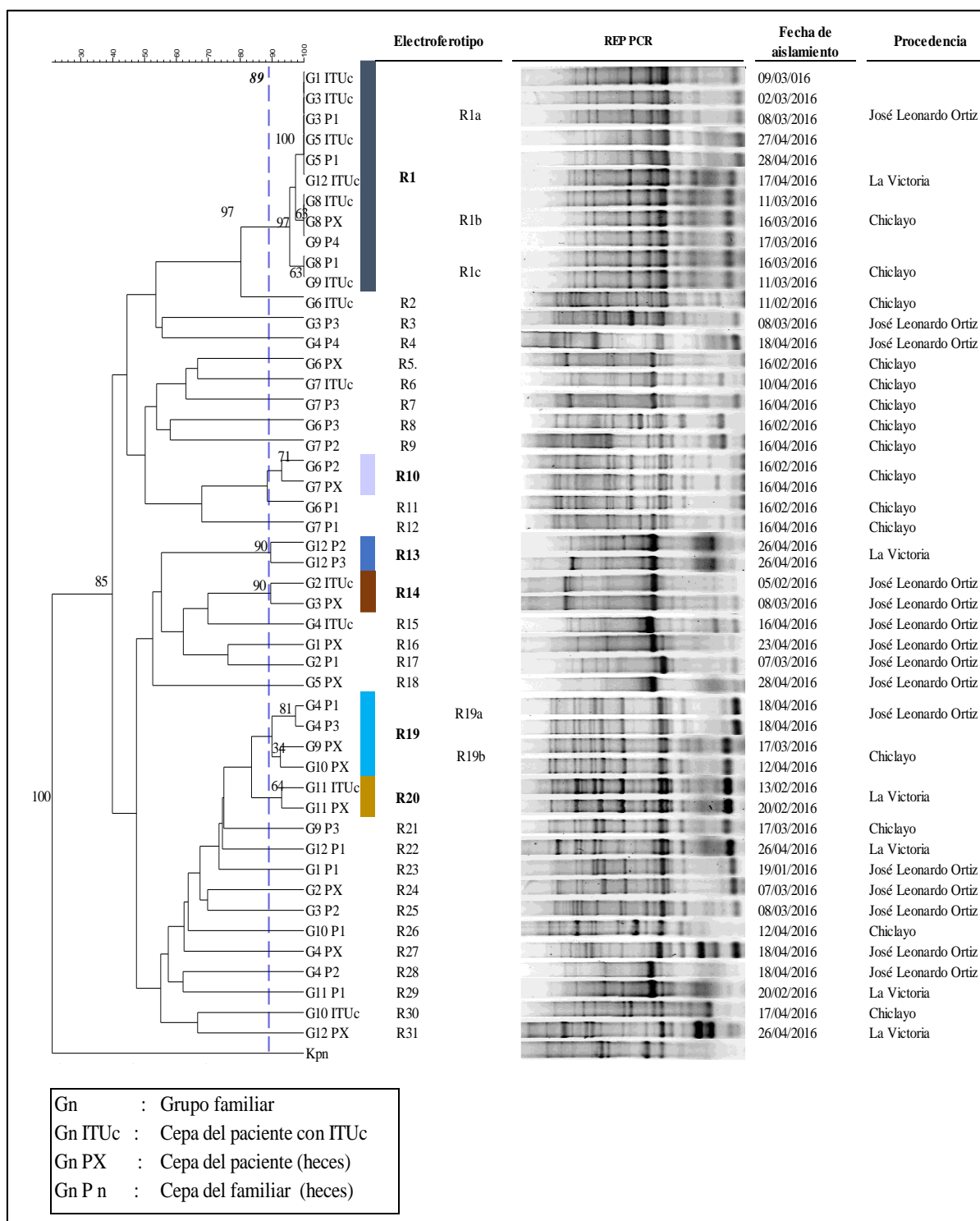


Figura 05. Dendrograma generado por UPGMA según REP-PCR de las 48 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITU de origen comunitario y de portadores. Los números en los nodos del dendrograma muestran los porcentajes de *bootstrap* obtenidos después de 1000 remuestreos.

4.2.3. Fusión de ERIC-PCR y REP PCR.

Finalmente se realizó un consolidado con las dos técnicas de genotipaje (ERIC-PCR y REP-PCR), en la cual se identificó 32 electroferotipos, con 23 a 39 bandas por perfil, que incluyeron siete patrones clónales y el resto eran perfiles únicos. Estos presentaron similitudes genéticas $\geq 87,7 \%$ y conglomeraron cepas tanto indistinguibles como estrechamente relacionadas, además la robustez de su topología estuvo soportada por altos valores de *bootstrap* del 83 a 100 %. En este consenso, se mantuvo la formación de seis patrones que también se obtuvieron para cada técnica de genotipaje, a excepción de E14 y R10, cuyos aislamientos no se agruparon (Tabla 04 y Figura 06). Por otro lado, se observó la presencia de un único patrón clonal **ER5** conformado por dos cepas de portadores de diferentes grupos familiares, con igual procedencia, que estuvieron al 91,2 % de similitud y por tanto estrechamente relacionadas.

Patrones clónales conservados.

De los patrones clónales identificados según las técnicas empleadas, se conservaron seis, también se consideró el patrón clonal ER5, ya que evidenció aislados con relación genética mediante la combinación de ambas técnicas. Esto indicó, que el 47,9 % (23/48, IC 95%: 34,6 a 63,2) de las cepas analizadas de la ciudad de Chiclayo, que incluyó 15/36 (41,7%) cepas de portadores fecales y de 8/12 (66,7%) de pacientes con ITUc (Figura 07 A), derivaron de siete clones diferentes, mientras que las demás, eran un genotipo y circulaban indistintamente entre los distritos de esta comunidad.

La descripción que se presenta de los patrones clónales está en base a los resultados obtenidos según el consolidado final (Figura 06):

- **Patrón clonal ER1:** Es el grupo mayoritario, con el 23% (11/48) del total de aislados, que incluyó el 50 % (6/12) y el 13,8% (5/36) de cepas de pacientes con ITUc y de portadores respectivamente (Figura 07 A). Las 11 cepas pertenecieron a seis grupos familiares, procedentes de tres distritos, siendo de la mayoría de estas que concordaron en marzo (8/11) (Tabla 04).

Por otro lado, este patrón presentó dos subtipos clónales con cepas estrechamente relacionadas e idénticas:

El sub patrón clonal ER1a, integró un total de seis cepas del grupo G1, G3, G5 y G12. Cinco y una procedentes de José Leonardo Ortiz y La Victoria respectivamente. Asimismo, la mitad fueron aisladas en marzo y la otra en abril. También, las cinco cepas del segundo sub patrón clonal ER1b, pertenecieron al grupo G8 y G9. Todas concordaron en procedencia y mes de aislamiento (ver Tabla 04).

Los cinco patrones restantes integraron el 2,4 % (2/48) del total de cepas (Figura 07 B) que se discriminaron como estrechamente relacionadas:

- **Patrón clonal ER12:** Presentó cepas de portadores del mismo grupo familiar de José Leonardo Ortiz, que concordaron en abril. Presentaron una similitud del 95,2 %.
- **Patrón clonal ER24:** Integró cepas que presentaron el 87,7% de similitud. Estas procedían de un paciente con ITUc y de un familiar portador, las cuales pertenecieron a distintos grupos familiares, no coincidentes al mes de aislamiento y procedentes del distrito de José Leonardo Ortiz.
- **Patrón clonal ER13:** Las dos cepas tenían una similaridad del 90,4% y pertenecieron al mismo paciente.
- **Patrón clonal ER23:** Reunió aislados de familiares portadores que coincidieron con el grupo familiar, distrito de procedencia y mes de aislamiento, además se encontraron al 88,3 % de similitud genética

- ***Patrón clonal ER14:*** Los aislados que presentó, pertenecieron a familiares portadores, que coincidieron con el lugar de procedencia y se encontraban al 88,2% de similitud genética.
- ***Patrón clonal ER5:*** Este grupo integró solo dos cepas de familiares portadores, que solo coincidieron con el origen distrital y contaban con una similitud genética del 91,2 %.

Tabla 04. Patrón clonales conservados por dos técnicas de rep-PCR y la combinación de ambas de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria de origen comunitario y de portadores fecales. Hospital Regional Lambayeque. Noviembre 2015– noviembre

Patrón clonal		Bootstrap (%)	Origen distrital	Mes de aislamiento	Aislamiento		Categorías y similitudes genéticas (%) ^a
rep-PCR	ERIC&REP PCR				ITUc	Portador	
E1/R1	ER1		Chiclayo	Marzo	G8 ITUc	G8 PX	
E1/R1	ER1		Chiclayo	Marzo	-	G8 P1	A (97 -100)
E1/R1	ER1		Chiclayo	Marzo	G9 ITUc	G9 P4	
E1/R1	ER1	100	José Leonardo Ortiz	Marzo	G1 ITUc	-	B(93,8)
E1/R1	ER1		José Leonardo Ortiz	Marzo	G3 ITUc	G3 P1	A (98,7 -100)
E1/R1	ER1		José Leonardo Ortiz	Abril	G5 ITUc	G5 P1	
E1/R1	ER1		La Victoria	Abril	G12 ITUc	-	B (95,2)
E27/R219a	ER12	100	José Leonardo Ortiz	Abril	-	G4 P1	B (95,2)
E27/R19a	ER12		José Leonardo Ortiz	Abril	-	G4 P3	
E5/R14	ER24	96	José Leonardo Ortiz	Febrero	G2ITUc	-	B (87,7)
E5/R14	ER24		José Leonardo Ortiz	Marzo	-	G3 PX	
E24/R20	ER13	96	La Victoria	Marzo	G11ITUc	G11 PX	B (90,4)
E6/R13	ER23	97	La Victoria	Abril	-	G12 P2	B (88,1)
E6/R14	ER23		La Victoria	Abril	-	G12 P3	
E3/R19b	ER14	83	Chiclayo	Marzo	-	G9 PX	B (88,2)
E3/R19b	ER14		Chiclayo	Abril	-	G10 PX	
	ER5*	98	Chiclayo	Febrero	-	G6 P1	B (91,2)
	ER5*		Chiclayo	Abril	-	G7 PX	

Gn: Grupo familiar; Gn ITUc: cepa de paciente con ITUc; Gn PX: Cepa del paciente (heces); Gn Pn: Cepa del familiar (heces)

A: Idénticas, B: Estrechamente relacionadas

E: ERIC-PCR, R: REP-PCR, *Grupo clonal solo obtenido por ERIC& REP PCR

a: Categorías y similitudes genéticas en base a lo obtenido de la combinación de ERIC y REP PCR.

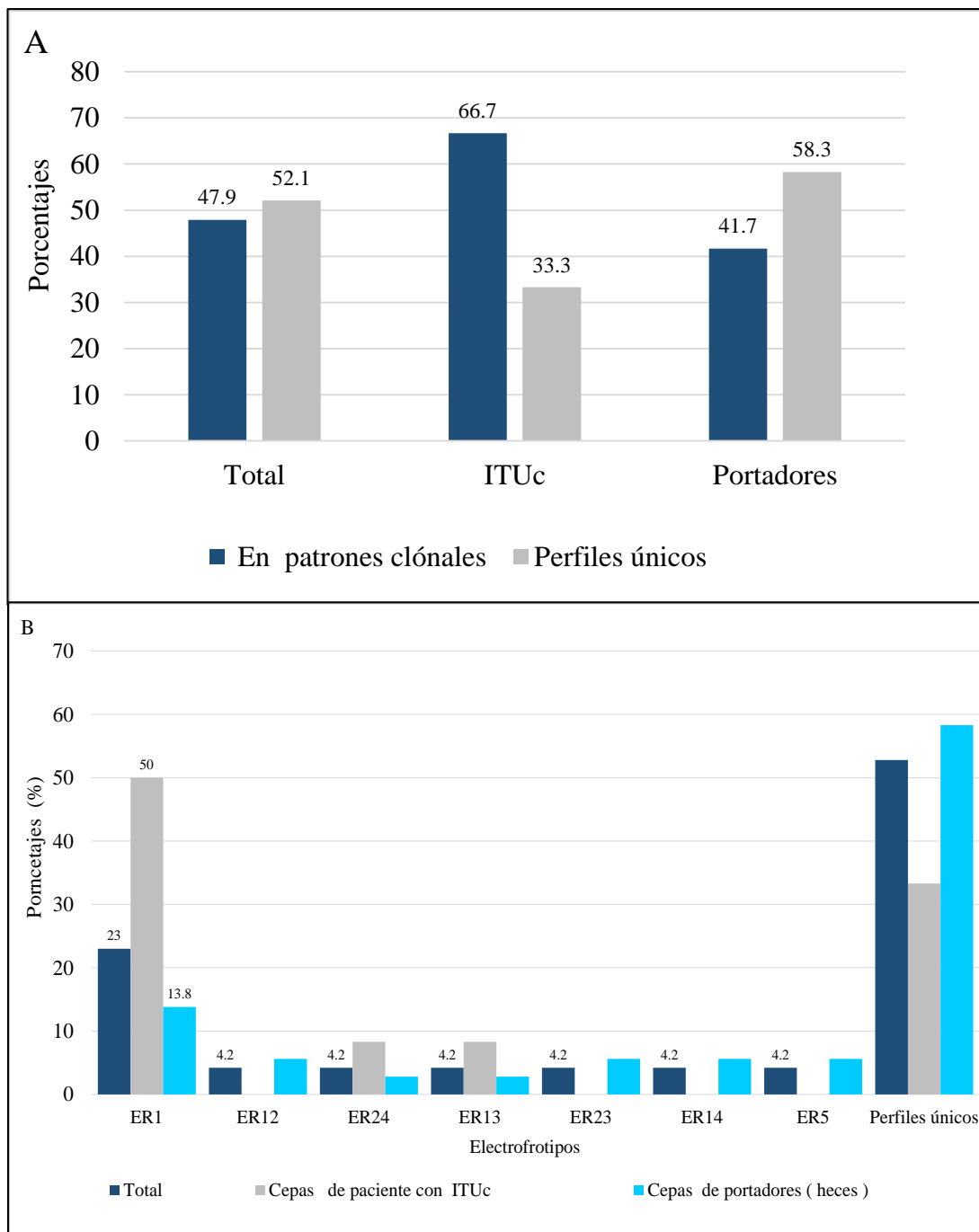


Figura 07. Distribución porcentual de las 48 cepas de *E. coli* productoras de BLEE de pacientes con infección urinaria de origen comunitario y portadores fecales en patrones clónales y no agrupadas (A) y según los electrofrotipos obtenidos por dos ERIC y REP-PCR (B).

4.2.4. El análisis de coordenadas principales (PCoA)

El análisis de coordenadas principales (PCoA) (Figura 08), mostró que todos aislamientos tuvieron una distribución independientemente al tipo de paciente, grupo familiar y lugar de procedencia. De esta manera se agruparon cepas de pacientes con ITUc con cepas de los familiares, del mismo o distinto grupo, que coincidieron o no con el distrito de procedencia. Además, los aislamientos del patrón **clonal ER1** (en círculo negro), estuvieron muy diferenciadas, siendo un patrón dominante. Esto apoyó lo obtenido en los dendrogramas de las técnicas de genotipaje construidos mediante UPGMA, que mostró concordancia según lo observado.

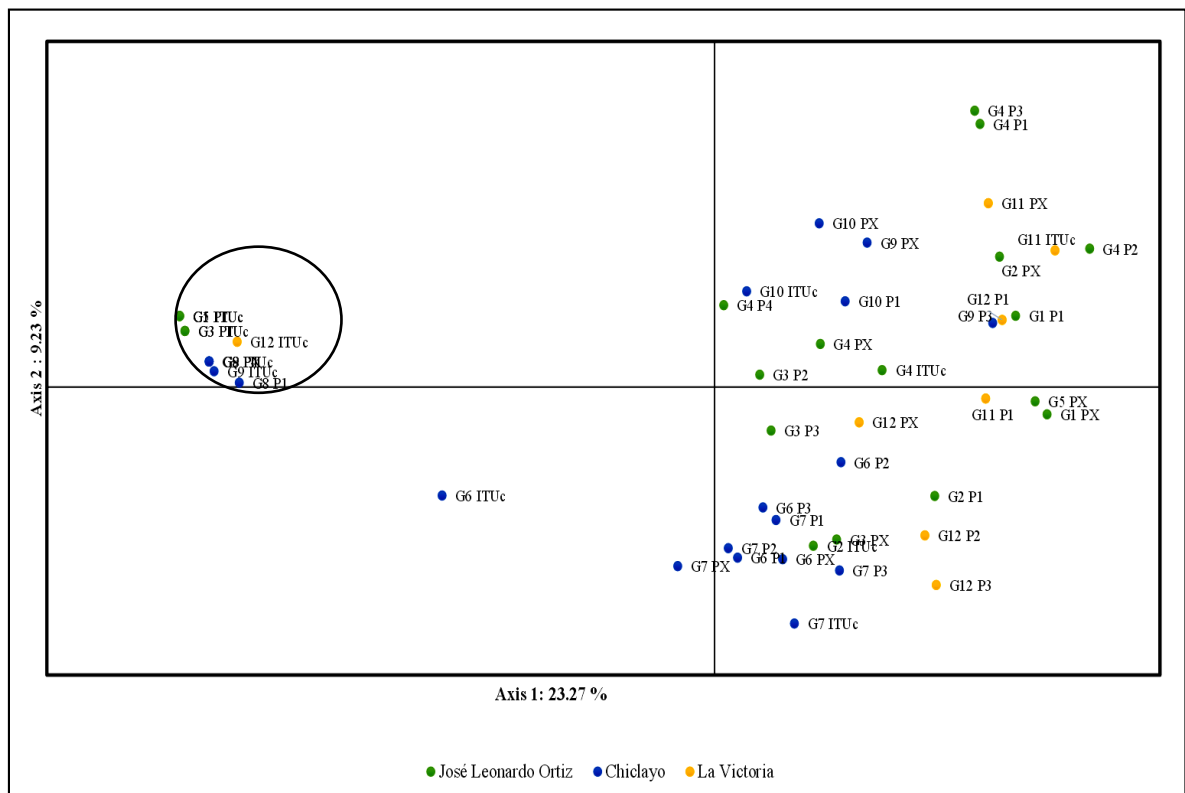


Figura 08. Distribución mediante PCoA en base a la matriz original de ERIC y REP -PCR de las 48 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria de origen comunitario y de portadores. HRL, noviembre 2015 –noviembre 2016

4.2.5. Análisis molecular de varianza (AMOVA)

Basado en los datos obtenidos mediante la fusión de las técnicas de ERIC-PCR y REP-PCR, se observó mayor variabilidad genética dentro de los grupos familiares (82,0 %), que entre los grupos y distritos, además que esto fue estadísticamente significativo (ver Tabla 05).

Tabla 05. Análisis molecular de varianza obtenida de las 48 cepas de *E. coli* productora de BLEE aisladas de pacientes con ITUc y de portadores fecales.

Fuente de variación	df	Suma de cuadrados	Variación estimada (%)		Estadístico	p-valor
Entre distritos	2	55,5	3%	Φ_{RT}	0,035	0,069
Entre grupos	9	176,8	14%	Φ_{PR}	0,149	0,001
Dentro de los grupos	36	419,6	82%	Φ_{PT}	0,179	0,001
Total	47	651,9	100%			

Φ_{RT} , Φ_{PR} y Φ_{PT} = Proporción de variación entre distritos, entre y dentro de grupos, respectivamente.

4.3. Relación genética de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE de pacientes emparentados.

A partir de los resultados anteriores, se determinó que de los doce grupos conformados, solo los grupos familiares G3, G4, G5, G8, G9, G11 y G12 (Figura 09) presentaron a los menos dos miembros con la misma cepa y con un alto porcentaje de similitud genética, cuyos aislamientos pertenecieron a los patrones clonales ER1, ER12, ER13 y ER23 (Tabla 04) . Así, el grupo G3, G5, G8 y G9 presentaron cepas de un paciente con ITUc y su familiar clonamente relacionadas, mientras que, el grupo G4 y G12 mostraron dos cepas de sus familiares con clonalidad. Además, se hallaron dos casos de cepas con relación genética del mismo paciente del grupo G8 y G11.

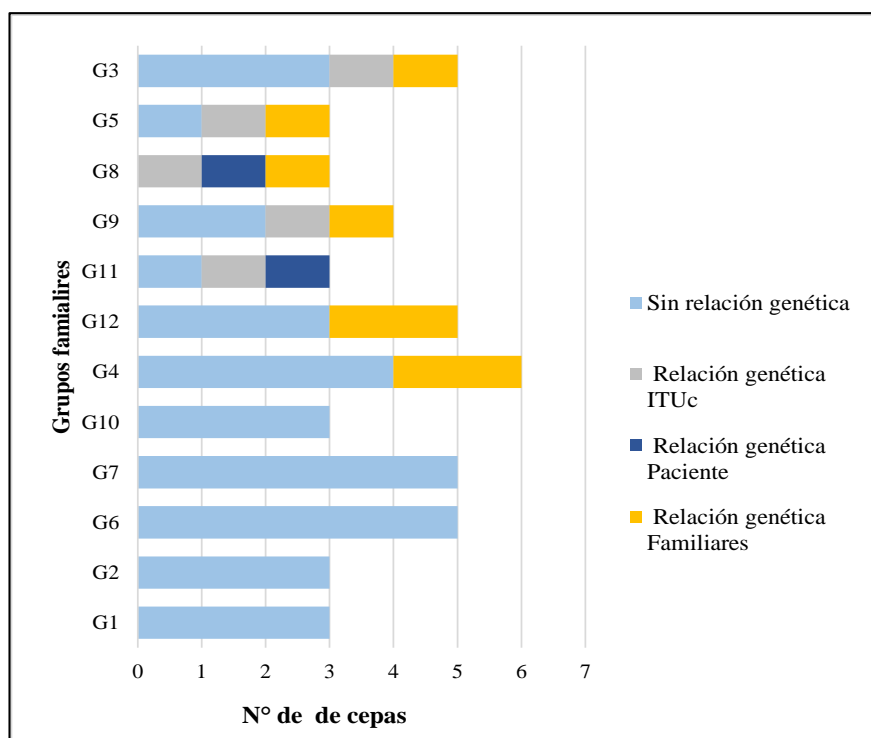


Figura 09. Distribución de las 48 cepas de *E. coli* productoras de BLEE de pacientes con ITUc y pacientes portadores por grupos familiares con y sin relación genética.

V. DISCUSION.

Los datos del presente estudio mostraron una emergente frecuencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en la comunidad, específicamente en la ciudad de Chiclayo. Esta alta frecuencia y diseminación exitosa, podría deberse a su asociación con siete clones presentes durante enero a mayo del 2016, según lo obtenido mediante el empleo de dos variantes de la técnica rep-PCR, los cuales integraron cerca de la mitad de las 48 cepas analizadas. Estos patrones clónales conglomeraron cepas de portadores fecales y otros sumados de pacientes con ITUc, que pertenecieron al mismo o diferente grupo familiar y distrito de origen. Por tanto, reveló su capacidad de diseminación a nivel intra-domiciliario y comunitario, según mencionaron Minarini *et al.*, (2007) y Rodríguez Baño *et al.*, (2008).

Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE afectan a las personas de todo el mundo, pero no en la misma proporción. Así se halló una frecuencia considerable en pacientes con ITUc (20,7 %), el cual fue similar a lo reportado por Galván *et al.*, (2016) en Lima (16,3 %). Esto sugiere que en países de Latinoamérica las cifras de BLEE son más altas en contraste con otras regiones del mundo como en Taiwán y en España del 6,6 y 6,9% , respectivamente (Medina-Polo *et al.*, 2015; Wu, Chen, & Hung, 2014). Dhillon y Clark (como se citó en Galván *et al.*, 2016) y Colquechagua *et al.*, (2015), mencionaron que estas diferencias son debido a la situación socioeconómica, a la venta no regulada de antibióticos incluso en la industria alimentaria, servicios no adecuados de agua y saneamiento, las condiciones de hacinamiento, la pobreza y una alta densidad de la población. A esto se suma, que actualmente no se cuenta con las políticas para su control como en Argentina, Estados Unidos y Chile y fondos para implementar estrategias de contención adecuadas (Alós, 2015; Simons, 2017). Según Woerther *et al.*, (2013), estos son factores extremadamente eficaces para impulsar la diseminación de BLEE en la comunidad.

También, todos los pacientes y la mayoría de sus familiares estuvieron colonizados por cepas de *E. coli* productoras de BLEE (82,8 %), que coincide según lo obtenido a nivel local por Aguilar y Cubas, (2015) con el 82,4 % , lo que sugiere una alta exposición del fenotipo BLEE a nivel de la comunidad en la ciudad de Chiclayo. No obstante, en países considerados desarrollados, el estado portador se encuentra notablemente disminuido por los mismos factores explicados en el párrafo anterior. De esta manera, Husickova *et al.*, (2012) en República Checa y Luvsansharav *et al.*, (2011) en Japón hallaron el 2,9 % (26/901) y 5% (11/218) de portadores fecales, respectivamente en personas sanas de la comunidad que compartían las mismas características con respecto al consumo de antibiótico y hospitalización de la muestra considerada en el estudio.

El hecho de haber encontrado altos casos de portadores fecales de cepas de *E. coli* productoras de BLEE, orienta a que es necesario modificar la terapia empírica, la cual deberá adecuarse a la realidad del medio. Vale acotar, que la colonización intestinal es mucho más frecuente que las infecciones, entonces los individuos comensales pueden actuar como uno de los principales reservorios de genes de resistencia (Niki *et al.*, 2011; Pallecchi *et al.*, 2007). Además, la comunidad constituye la principal "población de captación" para los hospitales circundantes que sirven a esta, lo que podría constituir una fuente sustentable de infecciones nosocomiales.

Al mismo tiempo, los casos positivos por colonización fecal de cepas de *E. coli* productoras de BLEE, se encontraron ampliamente distribuidos en los pacientes y sus familiares según las diferentes características consideradas. Esto fue independientemente de cada una de estas, incluso al consumo de antibióticos ($p > 0,05$). Referente a esto, Herindrainy *et al.*, (2011) y Woether *et al.*, (2013) mencionaron haber tenido los mismos resultados, lo que sugiere una exposición generalizada en la población (Chanoine *et al.*, 2013). No obstante, el tamaño de muestra probablemente haya influido en estos resultados, por otro lado, no se descarta la posibilidad que otros factores no considerados en los cuestionarios estén relacionados con los casos de estado portador fecal de *E. coli* productora de BLEE.

Según la alta frecuencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE procedentes de tres distritos de la ciudad de Chiclayo, siendo considerado a los portadores fecales de estas cepas, como una fuente potencial de transmisión de humanos a humanos, permitió realizar un estudio de biología molecular en la búsqueda de sus relaciones genéticas. Así, en la actualidad se emplean diversos métodos moleculares para genotipificación de bacterias multirresistentes. La elección de cada una depende del objetivo de estudio, de su eficiencia, eficacia y el tipo de microorganismo a tipificar. Técnicas basadas en el análisis de regiones repetitivas del cromosoma bacteriano como ERIC-PCR y REP-PCR tienen una amplia versatilidad para la caracterización molecular de varios géneros de bacterias y en comparación con otros métodos, lo que les otorga una alta ventaja frente a otras.

Las 48 cepas fueron 100% tipificables por ERIC-PCR y REP-PCR y una vez realizadas las repeticiones por marcador molecular, se obtuvo una alta reproducibilidad de los electroferotipos. Por otro lado, se registró un ID de 0,95 para ambos casos, indicando que tienen similar capacidad de discriminar un aislado de otro. Según lo anterior, se recomienda el empleo de las dos técnicas para genotipificación de cepas de *E. coli* productoras de BLEE procedentes de la comunidad, tal y como lo admite Bae *et al.*, (2014) y Carbajal, (2016), quienes mencionaron que sus resultados fueron coherentes con la ECP. Sin embargo, los primeros autores agregan que rep-PCR debe ser utilizado en estudios comunitarios, por ser más eficiente en la coincidencia de la agrupación de cepas pertenecientes a los mismos ST según MLST, el cual identifica clones; mientras que la ECP es más adecuada para investigar brotes en un espacio limitado como un hospital, debido a su alta capacidad discriminatoria.

Los dendrogramas de ERIC-PCR y REP-PCR, evidenciaron alta fiabilidad, ya que se obtuvieron valores significativos de r por el test de mantel (0,88) y de *bootstrap* (100 %), estos indicaron una buena representación de la relación genética de los aislamientos y una correcta topología del dendrograma, respectivamente. Además, para la determinación del punto de corte, se exigió una identidad de los electroferotipos (Coll *et al.*, 2005) y una coincidencia con respecto a las agrupaciones obtenidos por ambas técnicas, siendo considerados para ERIC-PCR y REP-PCR el 86,6 % y 89 % respectivamente. Wickramasinghe *et al.*, (2012) y Kuenzli *et al.*, (2014), definieron un punto de corte similar (85 %). Asimismo, se destaca el empleo de dos métodos de tipado, ya que permitió seleccionar un punto de corte adecuado y en consecuencia establecer con mayor eficacia las relaciones genéticas y epidemiológicas entre cada aislamiento (Carbajal, 2016).

Los resultados de ambas técnicas fueron concordantes al número de electroferotipos (de 31 a 32), a la cantidad de clones (seis a siete) y al porcentaje de cepas con relación clonal (47,9%: 23/48). Solo se observaron dos contrastes en dos agrupaciones (E14 con R10 y E27 y E23 con respecto a R19). Probablemente sea a causa de las diferencias de distribución de las secuencias repetitivas a lo largo de sus genomas. Por lo expuesto anteriormente, se precisó hacer la unión de las matrices binarias de ERIC y REP-PCR. El dendrograma obtenido de este último también mostró datos significativos de *bootstrap* y r del test de Mantel. Se mostró entonces, seis patrones clonales conservados, que integraron las mismas cepas para cada técnica; y a ER5 como un patrón clonal único, el cual finalmente fue considerado. Por tanto, los aislamientos se clasificaron mejor y los conglomerados fueron más precisos (Bailón y Sacsquispe, 2013).

A pesar que las cepas procedieron de la comunidad y no de un ambiente limitado (hospital), la cantidad de cepas con relación genética fue alto (47,9 %), haciendo referencia a que se originaron mediante un sistema de propagación clonal. También, se registró que más de la mitad de cepas de pacientes con ITUc (66,7%) y el 41,7 %, de portadores fecales se encontraron agrupadas. Diversos investigadores mencionaron haber tenido diferentes resultados, así Blanco *et al.*, (2016) en Colombia precisaron el 65,5 % (19/29). No obstante, valores menores obtuvieron Herindrainy *et al.*, (2011) en Madagascar (25,8 %), Gonçalves *et al.*, (2016) en la región central oeste de Brasil (8,7 %), mientras que Carbajal, (2016) en Lima demostró que todas las 21 cepas analizadas fueron distintas genéticamente. Según lo mencionado, la cantidad de cepas de *E. coli* productoras de BLEE con relación genética varía de acuerdo a las áreas geográficas y otros factores específicos propios de cada zona que condicionaron su diseminación.

Los patrones clonales identificados, se encontraron muy bien validados por el *bootstrap* (83 al 100 %). Lo que indicó que cada uno corresponden a pequeñas poblaciones de *E. coli* productoras de BLEE permanentes, persistentes, estables en el tiempo, y que siempre se conglomerarán, haciendo referencia a grupos menos inalterables con respecto a sus características genéticas en el tiempo. Asimismo, los siete patrones, incluyeron aislamientos solo de portadores fecales y otros sumados a pacientes con ITUc, lo que indicaría intercambio de estas cepas entre ambos tipos de pacientes.

Se obtuvo ER1 como patrón clonal mayoritario, con el 23% (11/48) del total de cepas analizadas. Esto se asemejó a lo obtenido por Mohajeri *et al.*, (2014) en el oeste de Irán, con un 32 % (16/49) de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en su patrón clonal máximo según ECP. Sin embargo, Wickramasinghe *et al.*, (2012), observaron que sus agrupaciones eran de dos a tres aislamientos, sin contar con algún patrón clonal principal. Generalmente, las 11 cepas contenidas en este patrón, fueron de pacientes de grupos familiares, distritos y fechas de aislamientos diferentes; es decir no tenían relación epidemiológica. Lo que sugirió la circulación y diseminación de este clon en los tres distritos de la ciudad de Chiclayo. Resultados similares han obtenido Leal *et*

al., (2013) utilizando REP-PCR y MLST, confirmando su diseminación en dos ciudades de Colombia.

Las cepas del patrones clónales ER24, ER14 y ER5, coincidieron con distrito de procedencia, quizá haya alguna fuente en común, que no fue considerada en la investigación y que haya permitido su diseminación entre ambos tipos de pacientes de distintos grupos familiares. Se observó en estos casos que las fechas de sus aislamientos fueron de uno a dos meses. Esto indicó que se trataron de clones permanentes, tal y como lo valida el test de *bootstrap* (83 al 98 %).

En los grupos clónales ER1, ER24, ER14 y ER5, han coexistido cepas de distintos grupos familiares, lo que refleja su diseminación a través del ambiente o una contaminación de los pacientes por una misma fuente externa a través de alimentos u otros (Herindrainy *et al.*, 2011; Kuenzli *et al.*, 2014). De manera similar, Woether *et al.*, (2013) en la Guyana Francesa y Herindrainy *et al.*, (2011) en Madagascar obtuvieron por las mismas técnicas dos y tres clones respectivamente, cuyos aislamientos provenían de pacientes no relacionados con la familia, pero, procedentes de una misma área geográfica. Además, la existencia de clones obtenidos de pacientes de diferentes localizaciones pueden reflejar la falta de higiene (Pathak, Chandran, Mahadik, Macaden y Lundborg, 2013), lo cual coincide con las condiciones de salubridad en la localidad, las cuales no son las más adecuadas.

Por otro lado, para cada patrón clonal ER12, ER13 y ER23, sus aislados coincidieron con el grupo familiar, lugar de procedencia y fecha de aislamiento. Probablemente se traten de clones recién emergidos (Woodford, Turton y Livermore, 2011), sin embargo, estos posiblemente hayan estado colonizando a los pacientes y así, fueron validados por el *bootstrap* (83-100%). Esto demostró la transmisión intra-hogar de cepas de *E. coli* productoras de BLEE y apoyó la hipótesis de que tanto la adquisición de fuentes externas como la transmisión de persona a persona podrían contribuir a la diseminación de BLEE en la comunidad (Lo *et al.*, 2010).

Generalmente, resulta normal encontrar cepas de *E. coli* productoras de BLEE no relacionadas genéticamente pero con fenotipos de resistencia similares, debido a la transmisión plasmídica muy frecuente en géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. Sin embargo, contar con un sistema de propagación clonal que asegure a su vez la transmisión de su resistencia de generación en generación, es de suma importancia a nivel clínico, ya que contribuye a la perduración de la resistencia BLEE y además pone en peligro a la comunidad ante las apariciones de brotes. En esta investigación se evidenció la diseminación clonal en cepas de *E. coli* productoras de BLEE al encontrarse siete patrones clónales, los cuales mantenían relación entre los aislados de portadores y/o paciente con ITUc, que pertenecieron a una misma o distinta familia, pero que pudieron coincidir o no con el distrito de procedencia y la fecha de aislamiento.

Woerther *et al.*, (2013) señala que la pandemia BLEE se deba a clones de alto riesgo y posiblemente las siete agrupaciones genéticas estén relacionadas al clon ST 131; que dada a sus diferencias intrínsecas de combinación inherente de acumular factores de virulencia, una mayor capacidad de producción de *biofilm* y alto potencial metabólico (Mathers *et al.*, 2015), les proporciona la capacidad de superar a otros clones bacteriano; considerándolo como un clon mundialmente diseminado. Siendo específicamente, el sublinaje H30-Rx fuertemente asociado con plásmidos epidémicos *IncF*, responsable de la aparición global de BLEE tipo CTX-M y según lo hallado por Johnson *et al.*, (2012) en EE.UU, estaría relacionado a la producción de BLEE tipo de CTX-M-15, encontrado frecuentemente en la comunidad.

Este clon, se ha reportado durante los últimos años en países de Latinoamérica como Colombia (Blanco *et al.*, 2016) y Argentina (Facone *et al.*, 2012), y según Blanco *et al.*, (2016) y Fam *et al.*, (2011) sus aislamientos presentaban un patrón de bandas muy similar según rep-PCR. Asimismo, este tiene mayor capacidad para colonizar el intestino y de alguna manera se ha adaptado a los huéspedes humanos (Mathers *et al.*, 2015; Nicolas-Chanoine, Bertrand y Madec, 2014), creando una alta prevalencia en estas poblaciones (Johnson *et al.*, 2012). Esto fundamentaría un poco el hecho de haber encontrado altas tasas de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en

pacientes con ITU y en portadores fecales procedentes de tres distritos de la ciudad de Chiclayo.

De tal manera, es importante mencionar que la presencia de este tipo de clon "eminente o exitoso" en la comunidad, se destaca no solo por mostrar el fenotipo BLEE, sino también por su rápida habilidad de propagación y una alta capacidad de adquirir repetidamente e independientemente diferentes genes de resistencia (Mathers *et al.*, 2015). Esto aumenta su patogenicidad y supervivencia, originando su competitividad y cepas MDR (Woodford *et al.*, 2011). Además, debido a estas características, son una poderosa fuente y plataforma estable para el mantenimiento y la propagación de componentes genéticos de resistencia a los antimicrobianos entre los organismos Gram-negativos, especialmente *Enterobacteriaceae* (Mathers *et al.*, 2015; Woodford *et al.*, 2011), lo que crearía un problema de salud pública significativo.

Estas características, probablemente condicionarían su permanencia y diseminación en la ciudad por largo períodos de tiempo; y sumado a la presión selectiva ejercida por los antibióticos (Mathers *et al.*, 2015), seleccionen a estos grupos y las poblaciones de *E. coli* productoras de BLEE sean más homogéneas y por ende disminuya su diversidad genética (Hertz *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2012). Este es un excelente ejemplo de microevolución en acción debido a la presión de selección artificial creada por el uso de antibióticos.

Aunque se ha tratado de relacionar los grupos clónales encontrados con el ST131, y dado al impacto que tendría en salud pública, es necesario pruebas de diagnóstico rentables que tengan la capacidad de identificarlos, así como otros clones (Minarini *et al.*, 2007). Se han desarrollado enfoques basados en la PCR, *diversilab repetitive PCR typing*, espectrofotometría de masas MALDI-TOF y en un futuro NGS (secuenciamiento de última generación). Pero, debido a los altos costos y las cuestiones de personal, estos métodos son difíciles de implementar rutinariamente en un laboratorio de diagnóstico. Tales enfoques podrían proporcionar terapia antimicrobiana oportuna y apropiada que puede ayudar a mejorar los resultados clínicos.

Por otro parte, el análisis de los perfiles generados mostró que la mitad de cepas de *E. coli* productoras de BLEE de la comunidad (52,1%), fueron distintas genéticamente (perfiles únicos). Esta falta de clonalidad, señala que las cepas proceden de distintas fuentes como agua residuales, alimentos o la diseminación de estos mecanismos de resistencia esté vinculada con la transmisión vehiculizada por plásmidos o genes que portan alelos *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} o la combinación de estos, destacándose *bla*_{CTX} (Carbajal, 2016; Oteo *et al.*, 2006).

Por otro lado, el PCoA mostró una distribución de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE independientemente al tipo de paciente, grupo familiar y lugar de procedencia, indicando que a nivel general no hay un electroferotipo característico para cada caso. Asimismo, mediante el AMOVA se ha obtenido una moderada diferenciación genética ($\Phi_{PT}=0,18$), a causa de la presencia de siete clones, los cuales reducen la variación molecular entre los grupos (14 %, $p=0,001$) y entre distritos (3%), pues integraron cepas que coincidieron o no con el grupo familiar y lugar de origen. Sin embargo, para este último caso, no fue lo suficientemente robusto ($p=0,069$) por la cantidad de muestra, que no permite extrapolarlo a toda la ciudad de Chiclayo y que además estos no sean los únicos clones presentes. Del mismo modo, dentro de los grupos hubo mayor variación (82 %, $p=0,001$), porque no todas las cepas de cada uno se integraron en un mismo clon y otras que se presentaron como perfiles únicos.

En el estudio, se ha documentado grupos que mostraron al menos dos familiares con cepas relacionadas genéticamente que integraron los patrones ER1, ER12, ER13 y ER23. Esto sugiere que el hecho de compartir los mismos ambientes, haya facilitado la diseminación de cepas productoras de BLEE entre los familiares. Datos parecidos obtuvieron Rodríguez Baño *et al.*, (2008) y Valverde *et al.*, (2008) en España de 8/19 y 6/9 grupos respectivamente, mediante el análisis molecular por REP-PCR y ECP, quienes también incluyeron en su estudio a individuos con las mismas consideraciones. Estos resultados demostraron la transmisión intra-domiciliaria de cepas de *E. coli* productoras de BLEE y sugieren que la transmisión de persona a persona puede contribuir a su diseminación en la comunidad (Lo *et al.*, 2010). Se menciona que el clon ST131 se encuentra implicado en la diseminación entre

diferentes miembros de una familia (Banerjee y Johnson, 2014), lo que justificaría tal clonalidad, y por tanto, como ya se mencionó, requería de su identificación.

Las cepas de las mismas familias que no estaban relacionadas sugirieron que la adquisición de fuentes externas podría desempeñar papeles más importantes que la transmisión doméstica. De tal manera se ha comprobado que los alimentos pueden estar contaminados por bacterias productoras de BLEE y que estas bacterias pueden transmitirse eficientemente a comensales en brotes de origen alimentario (Kuenzli *et al.*, 2014). Al mismo tiempo, dado que los genes *bla*_{CTX-M} tienen enlace con el plásmido y otros elementos genéticos móviles, se requieren estudios adicionales para evaluar su soporte genético y averiguar si las cepas no relacionadas comparten los mismos plásmidos u otros elementos genéticos (Lo *et al.*, 2010).

A pesar de haber encontrado que todos los pacientes con ITUc estaban colonizados por cepas de *E. coli* productoras de BLEE, solo dos presentaron cepas con relación clonal que pertenecieron al patrón ER1 y ER13. Esto, sugirió que las cepas de *E. coli* productora de BLEE causantes de la infección provenían de su misma microbiota intestinal. Sin embargo, las dos cepas del mismo paciente del G8, evidenciaron un mismo electroferotipo con la cepa de su familiar, lo que no descarta la posibilidad de su diseminación entre ambos individuos. Con referencia a esto, Niki *et al.*, (2011) en Osaka, Japón por RAPD registraron cuatro de estos casos. Esta concordancia, se debe a que en ambos estudios tuvieron una muestra con la misma composición y cantidad. Por el contrario, Rodríguez Baño *et al.*, (2008) y Valverde *et al.*, (2008) identificaron 27 y 21 pacientes con la misma cepa, dado que trabajaron con una mayor cantidad de pacientes.

Finalmente, el empleo de técnicas moleculares como ERIC-PCR y REP-PCR, constituyen una importante y necesaria herramienta para monitorizar el nivel de diseminación y detección de clones de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE en la comunidad, los cuales deberán considerarse en programas de vigilancia. Así mediante este conocimiento de la epidemiología local, se puede establecer medidas que conduzcan al control y prevención de la diseminación de estas como el correcto lavado de manos, uso racional de antimicrobianos, por ejemplo mediante el uso terapias rotativas, entre otras medidas, que deben ser aplicadas estrictamente en la localidad a fin de disminuir la morbimortalidad por estos patógenos.

VI.CONCLUSIONES.

1. La identificación de cepas *E. coli* productora de BLEE en pacientes con ITUc fue de 20,7 % y en portadores fecales humanos de 87,8 %, que asistieron al Hospital Regional Lambayeque. Noviembre 2015 – noviembre 2016.
2. La caracterización molecular por ERIC-PCR y REP-PCR, demostró que cerca de la mitad de las 48 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITUc y de portadores fecales humanos que llegaron al Hospital Regional Lambayeque, se originaron por siete clones que reunieron aislamientos de portadores fecales y otros sumados de pacientes con ITUc, los cuales coincidieron o no con el grupo familiar, distrito y mes de aislamiento; lo que indicó su disseminación en la comunidad.
3. La relación clonal fue determinada en 15 cepas de *E. coli* productoras de BLEE de pacientes emparentados, los cuales pertenecieron a siete grupos familiares, Además, se hallaron dos casos de cepas con relación genética del mismo paciente; esto señaló su propagación intradomiciliara.

VII.RECOMENDACIONES

1. Implantar medidas para el control de la diseminación de bacterias productoras de BLEE en la comunidad.
2. Detectar los tipos de genes BLEE como *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, así como otros genes implicados en resistencia frente a otros antimicrobianos diferentes a β -lactámicos.
3. A partir de lo anterior, generar un perfil de resistencia a nivel local, el cual permitirá tomar decisiones en cuanto a la clásica terapia empírica.
4. Se sugiere confirmar los resultados de caracterización molecular con procedimientos más discriminatorios y/o resolutivos, tal es el caso de MLST, que permitan la identificación de clones predominantes de *E. coli* productoras de BLEE en la comunidad, ya reportados a nivel mundial y sus variantes, su estructura, evolución poblacional y permanencia a lo largo de tiempo.
5. Emplear las herramientas moleculares y bioinformáticas para analizar grandes cantidades de ADN plasmídico combinadas con técnicas refinadas para el análisis cromosómico a gran escala, que proporcionarán una mejor comprensión del movimiento incesante de genes resistentes en cepas de *E. coli* productoras de BLEE.

VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, S. L., & Cubas, D. M. (2015). *Portadores de bacterias multirresistentes de importancia Áreas, en el personal asistencial y pacientes que ingresan a Críticas (UCI-UCIN) del Hospital Regional Lambayeque, Octubre 2015, 2014 - Junio. Tesis de Licenciatura*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Alós, J. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos : una crisis global Antibiotic resistance : A global crisis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Armando, G., Machado, S., & Esther, M. (2011). Infecciones urinarias adquiridas en la comunidad: Epidemiología, resistencia a los antimicrobianos y opciones terapéuticas. *Kasmera*, 39 (2), 87–97. Retrieved from www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4311324/
- Bae, I. K., Kim, J., Sun, J. Y. H., Jeong, S. H., Kim, Y.-R., Wang, K.-K., & Lee, K. (2014). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis & repetitive sequence-based PCR methods for molecular epidemiological studies of *Escherichia coli* clinical isolates. *The Indian Journal of Medical Research*, 140(5), 679–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25579152>
- Bailón, H., & Sacaquispe, R. (2013). Caracterización molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE causantes de infección intrahospitalaria en el servicio de neonatología de un hospital de Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*, 24(2), 101. <http://doi.org/10.20453/rmh.v24i2.591>
- Banerjee, R., & Johnson, J. R. (2014). A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(9), 4997–5004. <http://doi.org/10.1128/AAC.02824-14>
- Blanco, V. M., Maya, J. J., Correa, A., Perenguez, M., Motoa, G., Pallares, C. J., ... Tunal, E. (2016). Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 34(9), 559–565. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.11.017>
- Carbajal, P. (2016). *Prevalencia y epidemiología molecular de cepas de Escherichia coli productoras de BLEEs aisladas de casos de infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. Tesis de maestría*. Universidad Mayor de San Marcos.
- Castañón, G., Ramírez, M., Ruiz, R., & Mayek, N. (2011). AFLP marker application to explore heterosis in *Capsicum spp* ., 80, 53–58. Retrieved from http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol80/Castanon-Najera_2011.pdf

- Castro, N., Salgado, J. F., Ocampo, R., Silva, J., & Ruíz, M. (2014). Caracterización de β - lactamasas de espectro extendido producidas por *Escherichia coli* de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo , Guerrero , México. *Tlamati*, 5.1, 14–23. Retrieved from <http://tlamati.uagro.mx/t51/t512.pdf>
- Celis, Y. (2012). *Escherichia coli* uropatogénica resistente a múltiples antibióticos: un problema de salud pública. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 30(1), 74–77. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v30s1/v30s1a20.pdf>
- Chanoine, M., Gruson, C., Bialek-davenet, S., Bertrand, X., Moyat, M., Meiller, E., ... Moreau, R. (2013). 10-Fold increase (2006– 11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre, 68, 562–568. <http://doi.org/10.1093/jac/dks429>
- CLSI. (2014). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute* (Vol. 34). Retrieved from <http://microbiolab-bg.com/wp-content/uploads/2015/05/CLSI-2014.pdf>
- Coll, P., Teresa, M., Angeles, M., Vázquez, J., & Vila, J. (2005). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. (E. Cercenado & R. Cantón, Eds.) (SEIMC). España. Retrieved from <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>
- Colquechagua Aliaga, F., Sevilla Andrade, C., & Gonzales Escalante, E. (2015). Enterobacterias productoras de Betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*, 32(1), 26. <http://doi.org/10.17843/rpmesp.2015.321.1571>
- Faccone, D., Pasteran, F., Navarro, O., Rapoport, M., Chinen, I., & Corso, A. (2012). *E. coli* productores de CTX-M-15 causante de infección adquirida en la comunidad asociados a ST131 y ST44. Póster presentado al VII Congreso SADEBAC, CABA, Argentina.
- Fam, N., Leflon-Guibout, V., Fouad, S., Aboul-Fadl, L., Marcon, E., Desouky, D., ... Nicolas-Chanoine, M.-H. (2011). CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* Clinical Isolates in Cairo (Egypt), Including Isolates of Clonal Complex ST10 and Clones ST131, ST73, and ST405 in Both Community and Hospital Settings. *Microbial Drug Resistance*, 17(1), 67–73. <http://doi.org/10.1089/mdr.2010.0063>
- Fernández, F., López, L., & Pascual, Á. (2013). Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección, 31(Supl 1), 20–25. [http://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70110-1](http://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70110-1)

- Galván, F., Agapito, J., Bravo, N., Lagos, J., & Tamariz, J. (2016). Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*, 27, 22–29. <http://doi.org/10.20453/rmh.v27i1.2780>
- Gonçalves, L., de Oliveira Martins-Júnior, P., de Melo, A., da Silva, R., de Paulo Martins, V., Pitondo-Silva, A., & de Campos, T. (2016). Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum β lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in the Central-Western Region, Brazil, 6, 1–4. <http://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.02.003>
- Herindrainy, P., Randrianirina, F., Ratovoson, R., Hariniana Ratsima, E., Buisson, Y., Genel, N., ... Richard, V. (2011). Rectal Carriage of Extended-Spectrum Beta-Lactamase- Producing Gram-Negative Bacilli in Community Settings in Madagascar. *PLoS One*, 6 (7). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0022738>
- Hernández, E., Araque, M., Millán, Y., Millán, B., & Vielma, S. (2014). Prevalencia de β -lactamasa CTX-M-15 en grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena aisladas en pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Investigación Clínica*, 55(1), 32–43. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332014000100005
- Hertz, F. B., Nielsen, J. B., Schønning, K., Littauer, P., Knudsen, J. D., Løbner-olesen, A., & Frimodt-møller, N. (2016). “Population structure of Drug-Susceptible, -Resistant and ESBL-producing *Escherichia coli* from Community-Acquired Urinary Tract Infections. *BMC Microbiology*, 16(63), 1–6. <http://doi.org/10.1186/s12866-016-0681-z>
- Hunter, P. A., Dawson, S., French, G. L., Goossens, H., Hawkey, P. M., Kuijper, E. J., ... Piddock, L. J. V. (2010). Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65 (Sup 1), 3–17. <http://doi.org/10.1093/jac/dkp433>
- Husickova, V., Cekanova, L., Chroma, M., Htoutou-Sedlakova, M., Hricova, K., & Kolar, M. (2012). Carriage of ESBL- And AmpC-positive Enterobacteriaceae in the gastrointestinal tract of community subjects and hospitalized patients in the Czech Republic. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 156(4), 348–353. <http://doi.org/10.5507/bp.2012.039>
- Johnson, J. R., Urban, C., Weissman, S. J., Jorgensen, J. H., Lewis II, J., Hansen, G., ... Investigators, A. (2012). Molecular Epidemiological Analysis of *Escherichia coli* Sequence Type Lactamase-Producing *E. coli* from the United States, 2000 to 2009. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* P, 131, 2364–2370. <http://doi.org/10.1128/AAC.05824-11>

- Kuenzli, E., Jaeger, V. K., Frei, R., Neumayr, A., Decrom, S., Haller, S., ... Hatz, C. (2014). High colonization rates of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) - producing *Escherichia coli* in Swiss Travellers to South Asia – a prospective observational multicentre cohort study looking at epidemiology, microbiology and risk factors. *BMC Infectious Disease*, 14, 528. <http://doi.org/http://doi.org/10.1186/1471-2334-14-528>
- Leal, A. L., Cortés, J. A., Arias, G., Ovalle, M. V., Saavedra, S. Y., Buitrago, G., ... Castro, B. E. (2013). Emergencia de fenotipos resistentes a cefalosporinas de tercera generación en Enterobacteriaceae causantes de infección del tracto urinario de inicio comunitario en hospitales de Colombia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(5), 298–303. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.04.007>
- Lezameta, L., Gonzáles, E., & Tamariz, J. (2010). Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 27 (3), 345–351. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v27n3/a06v27n3.pdf>
- Lo, W.-U., Ho, P.-L., Chow, K.-H., Lai, E. L., Yeung, F., & Chiu, S. S. (2010). Fecal carriage of CTXM type extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms by children and their household contacts. <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.02.002>
- Luvsansharav, U. O., Hirai, I., Niki, M., Nakata, A., Yoshinaga, A., Moriyama, T., & Yamamoto, Y. (2011). Prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase- producing Enterobacteriaceae among healthy adult people in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 17(5), 722–725. <http://doi.org/10.1007/s10156-011-0225-2>
- Mathers, A. J., Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 565–91. <http://doi.org/10.1128/CMR.00116-14>
- Medina-Polo, J., Guerrero-Ramos, F., Pérez-Cadavid, S., Arrébola-Pajares, A., Sopeña-Sutil, R., Benítez-Sala, R., ... Tejido-Sánchez, Á. (2015). Infecciones urinarias adquiridas en la comunidad que requieren hospitalización : factores de riesgo , características microbiológicas y resistencia a antibióticos. *Actas Urológicas Españolas*, 39(2), 104–111. <http://doi.org/10.1016/j.acuro.2014.08.001>
- Merino, C. (2006). *Diversidad de loci microsatelites entre papas silvestres y cultivadas (familia solanaceae Género Solanum sección Petota)*. Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Marcos.

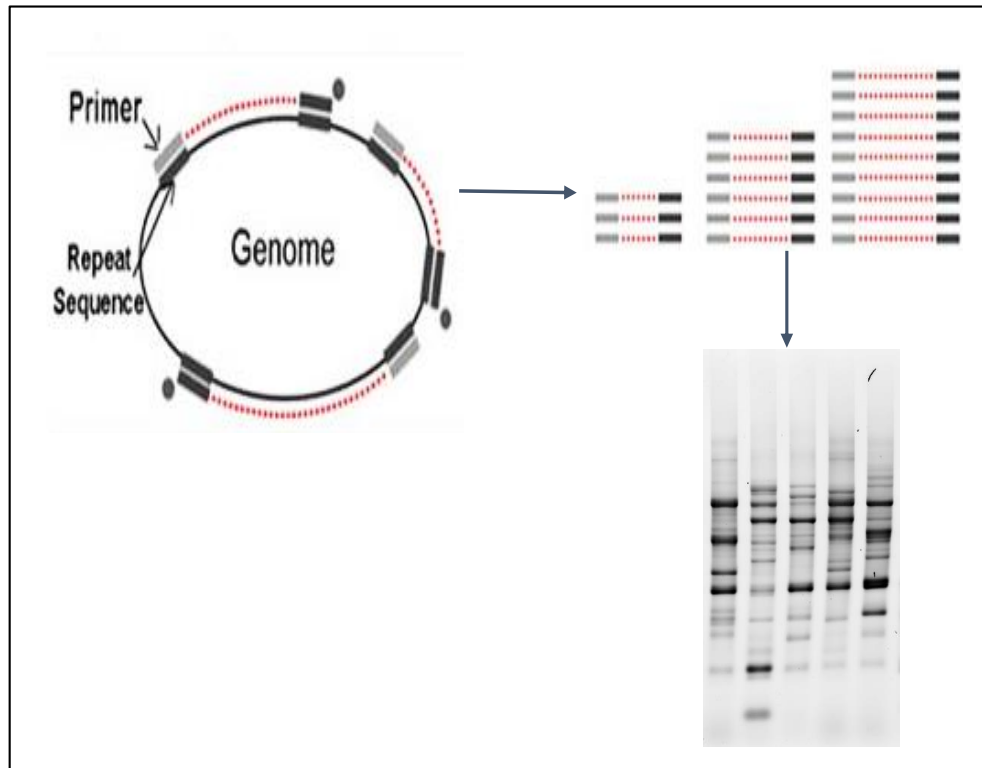
- Minarini, L. A. R., Camargo, I. L. B. C., Pitondo-Silva, A., & Darini, A. (2007). Multilocus Sequence Typing of Uropathogenic ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated in a Brazilian Community. *Current Microbiology*, 55, 524–529. <http://doi.org/10.1007/s00284-007-9026-3>
- Mohajeri, P., Darfarin, G., & Farahani, A. (2014). Genotyping of ESBL Producing Uropathogenic *Escherichia coli* in West of Iran. *International Journal of Microbiology*, 1–6. <http://doi.org/10.1155/2014/276941>
- Negat, L., Posit, L., Gluc, C., & Gluc, P. (2005). Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Retrieved from http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/Manual_Procedimientos_Bacteriológicos_IIH.pdf
- Nicolas-Chanoine, M.-H., Bertrand, X., & Madec, J.-Y. (2014). *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 543–74. <http://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>
- Niki, M., Hirai, I., Yoshinaga, A., Ulzii-Orshikh, L., Nakata, A., Yamamoto, A., ... Yamamoto, Y. (2011). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the feces of carriers contribute substantially to urinary tract infections in these patients. *Infection*, 39(5), 467–471. <http://doi.org/10.1007/s15010-011-0128-2>
- Oteo, J., Navarro, C., Cercenado, E., Delgado-Iribarren, A., Wilhelmi, I., Orden, B., ... Campos, J. (2006). Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7), 2359–66. <http://doi.org/10.1128/JCM.00447-06>
- Pallecchi, L., Bartoloni, A., Fiorelli, C., Mantella, A., Di Maggio, T., Gamboa, H., ... Rossolini, G. M. (2007). Rapid Dissemination and Diversity of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase Genes in Commensal *Escherichia coli* Isolates from Healthy Children from Low-Resource Settings in Latin America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8), 2720–2725. <http://doi.org/10.1128/AAC.00026-07>
- Pathak, A., Chandran, S. P., Mahadik, K., Macaden, R., & Lundborg, C. S. (2013). Frequency and factors associated with carriage of multi-drug resistant commensal *Escherichia coli* among women attending antenatal clinics in Central India. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 199. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-13-199>
- Rodríguez Baño, J., López Cerero, L., Navarro, M. D., Díaz de Alba, P., & Pascual, A. (2008). Faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*: Prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(5), 1142–1149. <http://doi.org/10.1093/jac/dkn293>

- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratories., Ed.) (3^a ed.). Nueva York, USA. Retrieved from <http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/jycz/jczs/ml-introduction/Content.pdf>
- Simons, G. (2017). La resistencia contraataca: la nueva crisis del siglo XXI – Placard Cultural. Retrieved June 27, 2017, from <http://placardcultural.com/index.php/2017/04/26/resistencia-antibiotica-evolucion-bacteriana/>
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V, Mickelsen, P. a, Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : criteria for bacterial strain typing. GUEST COMMENTARY Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis : Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233–2239. <http://doi.org/0095-1137/>
- Valentin, L., Sharp, H., Hille, K., Seibt, U., Fischer, J., Pfeifer, Y., ... Käsbohrer, A. (2014). Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: An approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(7), 805–816. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.015>
- Valverde, A., Grill, F., Coque, T. M., Pintado, V., Baquero, F., Cantón, R., & Cobo, J. (2008). High rate of intestinal colonization with extended-spectrum-beta-lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8), 2796–9. <http://doi.org/10.1128/JCM.01008-08>
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823–6831. <http://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
- Wickramasinghe, N. H., Xu, L., Eustace, A., Shabir, S., Saluja, T., & Hawkey, P. M. (2012). High community faecal carriage rates of CTX-M ESBL-producing *Escherichia coli* in a specific population group in Birmingham, UK. *Antimicrobial Chemiotherapy*, 67, 1108–1113. <http://doi.org/10.1093/jac/dks018>
- Woerther, P.-L., Burdet, C., Chachaty, E., & Andreumont, A. (2013). Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 744–758. <http://doi.org/10.1128/CMR.00023-13>
- Woerther, P., Angebault, C., Jacquier, H., Clermont, O., El Mniai, A., Moreau, B., ... Andreumont, A. (2013). Characterization of fecal extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli* in a remote community during a long time period. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(10), 5060–6. <http://doi.org/10.1128/AAC.00848-13>

- Woodford, N., Turton, J. F., & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance, *35*, 736–755. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>
- Wu, Y., Chen, P., & Hung, Y. (2014). Risk factors and clinical impact of levofloxacin or cefazolin nonsusceptibility or ESBL production among uropathogens in adults with community-onset urinary tract infections. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *47*(3), 197–203. <http://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.09.001>

IX. ANEXOS

ANEXO 01. Técnicas de ERIC-PCR y REP -PCR



El proceso conocido como rep-PCR basada en las secuencias ERIC y REP, permite la amplificación de muchos fragmentos de diferentes tamaños (amplicones) que representan el ADN entre las secuencias no codificantes repetitivas en el genoma. La disposición de estos fragmentos muestra diferencias distintas basadas en el genotipo del organismo

CÓDIGO:

**ANEXO 02. FICHA CLÍNICA -EPIDEMIOLOGICA
ITU COMUNITARIA**

Dirección de investigación HRL

Fecha de atención:...../...../.....

I.DATOS PERSONALES	
Apellidos y nombres:.....	N° DNI:
Ocupación :	Teléfono:.....
Género :	Edad :
Dirección :	Procedencia:
II.DATOS CLÍNICOS	
<ul style="list-style-type: none">¿Es la primera vez que presenta ITU? <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> NoConsumo de antibióticos: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <p>Hace cuantos días:.....</p> <p>Tipo de antibiótico:.....</p> <p>Lo consumió por: <input type="checkbox"/> Recomendación médica <input type="checkbox"/> Automedicación</p> <ul style="list-style-type: none">Hospitalizaciones previas <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <p>N° de hospitalizaciones <input type="text"/> Fecha de la última hosp.:.....Estancia hospitalaria:.....</p> <p>Comentarios:.....</p> <ul style="list-style-type: none">Presenta algún familiar hospitalizado actualmente: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <p>Comentarios:.....</p>	
III.DATOS AMBIENTALES	
<ul style="list-style-type: none">Viajes (lugar y frecuencia):.....Número de integrantes en casa:Material de la vivienda <input type="checkbox"/> Abobe <input type="checkbox"/> Material noble <input type="checkbox"/> Rústica:.....Condición de hacinamiento: Indicar el número de personas por cuarto:Abastecimiento de agua <input type="checkbox"/> Potable <input type="checkbox"/> Entubada <input type="checkbox"/> Pozo cisterna <input type="checkbox"/> Río-acequia-manantialSaneamiento <input type="checkbox"/> Desagüe <input type="checkbox"/> P. séptico <input type="checkbox"/> P. ciego o letrina <input type="checkbox"/> Río-aceq. <input type="checkbox"/> Interperie <p>Comentarios:.....</p>	
IV.REGISTRO DE RESULTADOS –PORTADOR FECAL	
Cultivo para enterobacterias productoras de BLEE:	
Microorganismo aislado:	
Confirmación de producción de BLEE por Jarlier:	

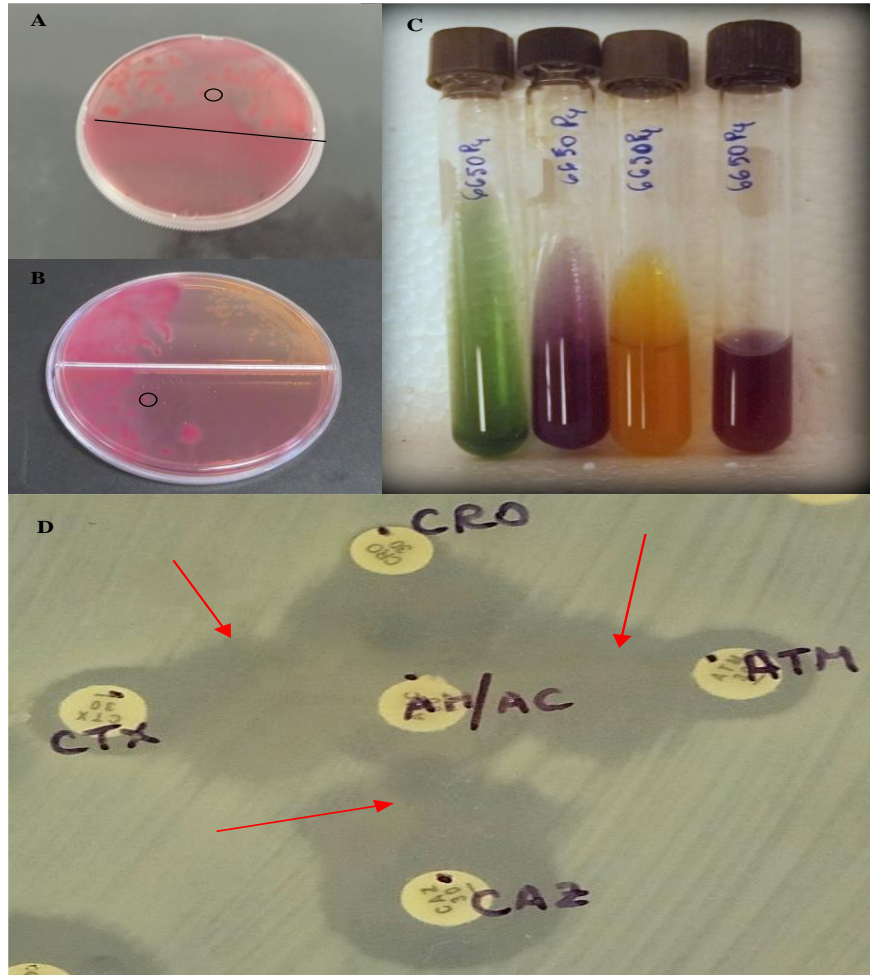
ANEXO 03. FICHA CLÍNICA-EPIDEMIOLOGICA (PORTADOR)

Dirección de investigación HRL

Fecha de atención:...../...../.....

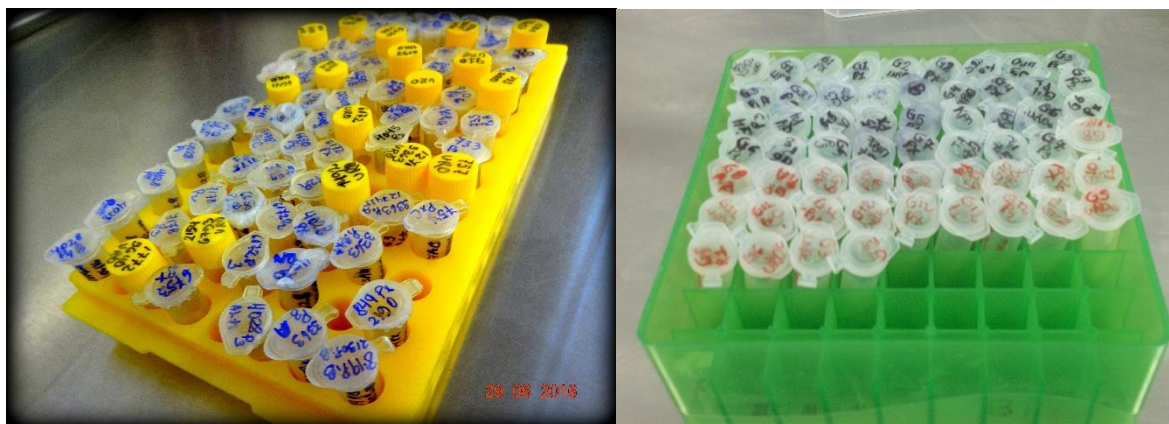
I.DATOS PERSONALES	
Apellidos y nombres:.....	N° DNI:
Ocupación :	Teléfono:.....
Género :	Edad :
Grado de parentesco del paciente:.....	Procedencia:
II.DATOS CLÍNICOS	
<ul style="list-style-type: none"> • ¿Ha presentado ITU? <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No • Infección previa por BLEE: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido • Consumo de antibióticos: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <p>Hace cuantos días:.....</p> <p>Antibiótico :</p> <p>Lo consumió por: <input type="checkbox"/> Recomendación médica <input type="checkbox"/> Automedicación</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hospitalizaciones previas <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <p><input type="text"/> N° de hosp. Fecha de la última hosp.:..... Estancia hospitalaria:.....</p> <p>Comentarios:.....</p> <ul style="list-style-type: none"> • Presenta algún familiar hospitalizado actualmente: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <p>Comentarios:.....</p>	
III.DATOS AMBIENTALES	
<ul style="list-style-type: none"> • Viajes (lugar / frecuencia):..... • Condición de hacinamiento (número de personas por cuarto): <p>Comentarios:.....</p>	
IV.REGISTRO DE RESULTADOS –PORTADOR FECAL	
Cultivo para enterobacterias productoras de BLEE:	
Microorganismo aislado:	
Confirmación de producción de BLEE por Jarlier:	

ANEXO 04. Identificación de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infecciones urinarias de origen comunitario y de portadores fecales



Aislamiento en medio de MacConkey suplementado con cefotaxima a 4 ug/mL (A y B). Identificación bioquímica según el manual del INS (C). Efecto sinérgico entre el inhibidor y los discos de antimicrobianos en la prueba confirmatoria de producción de BLEE (D)

ANEXO 05. Cepas de *E. coli* productoras de BLEE de pacientes con ITUc y de pacientes portadores.



Izquierda y derecha se muestra las 48 cepas en TSA y de estas mismas sus muestras de ADN respectivamente.

ANEXO 06. Reactivos empleados en extracción y purificación de ADN

Reactivo	Componentes	Concentración	Cantidad
Buffer TAE 10X (Tris -acetato EDTA)	Tris base	0.4 M	48,4 g
	Ácido acético glacial	—	11,42 mL
	EDTA 0,5M pH 8.0	0.02M	7,44 g
	Agua destilada		Enrasar a 1L
PCI (Fenol - Cloroformo - OH isoamílico)	Fenol		50
	Cloroformo	25:24:01	48
	Alcohol isoamílico		2
Acetato de sodio	Acetato de sodio	3M	246,09 g
	Agua destilada		Enrasar a 1L

ANEXO 07. Reactivos empleados en electroforesis

Medio	V _f	Componentes	Cantidad
Gel de agarosa 1%	30 mL	Agarosa	0,3 g
		Buffer TAE 1X	Completar al V _f
Gel de agarosa 2%	60 mL	Agarosa	1,2 g
		Buffer TAE 1X	Completar al V _f
TAE 1X	1 L	TAE 10X	100 mL
		Agua destilada	Completar al V _f

V_f: Volumen final

ANEXO 08. Extracción y purificación de ADN bacteriano

Lisis	<div data-bbox="352 337 1705 555"> </div> <div data-bbox="310 581 1705 639"> <p>Propagación de cultivo en BHI 8 – 24 horas a 37°C.</p> <p>Centrifugar a 7000 rpm durante/ 2 ' Descartar el sobrenadante.</p> <p>Agregar agua destilada y vortex</p> </div>
Extracción	<div data-bbox="352 659 1801 906"> </div> <div data-bbox="310 906 1705 961"> <p>Agregar 250 μL de P: C: I. Vortex</p> <p>Agregar 250 μL de cloroformo. *2 Vórtex</p> <p>Centrifugar a 14000 rpm/ 5 ' Recuperar la fase acuosa superior</p> </div>
Purificación	<div data-bbox="352 980 1801 1227"> </div> <div data-bbox="310 1227 1864 1302"> <p>Agregar 20 μL de Acetato de Sodio 3M vórtex</p> <p>Agregar 440 μL de etanol absoluto frío y centrifugar a 14000 rpm/ 30 '</p> <p>Decantar el sobrenadante y mantener el precipitado en hielo durante el resto del experimento</p> <p>ADN overnight Resuspender en 50 μL de Agua PCR y mantener a 4°C</p> </div>

ANEXO 09. Secuencia de los cebadores empelados para ERIC-PCR y REP-PCR

	Oligonucleótido	Secuencia de los cebados
ERIC-PCR	ERIC 1R	5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA-3'
	ERIC 2R	5'AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGA GCG3'
REP-PCR	REP 1R-Dt	5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3'
	REP2-D	5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3'

ANEXO 10. Componentes del mix PCR para ERIC-PCR y REP-PCR, con un volumen final de 12.5 µL.

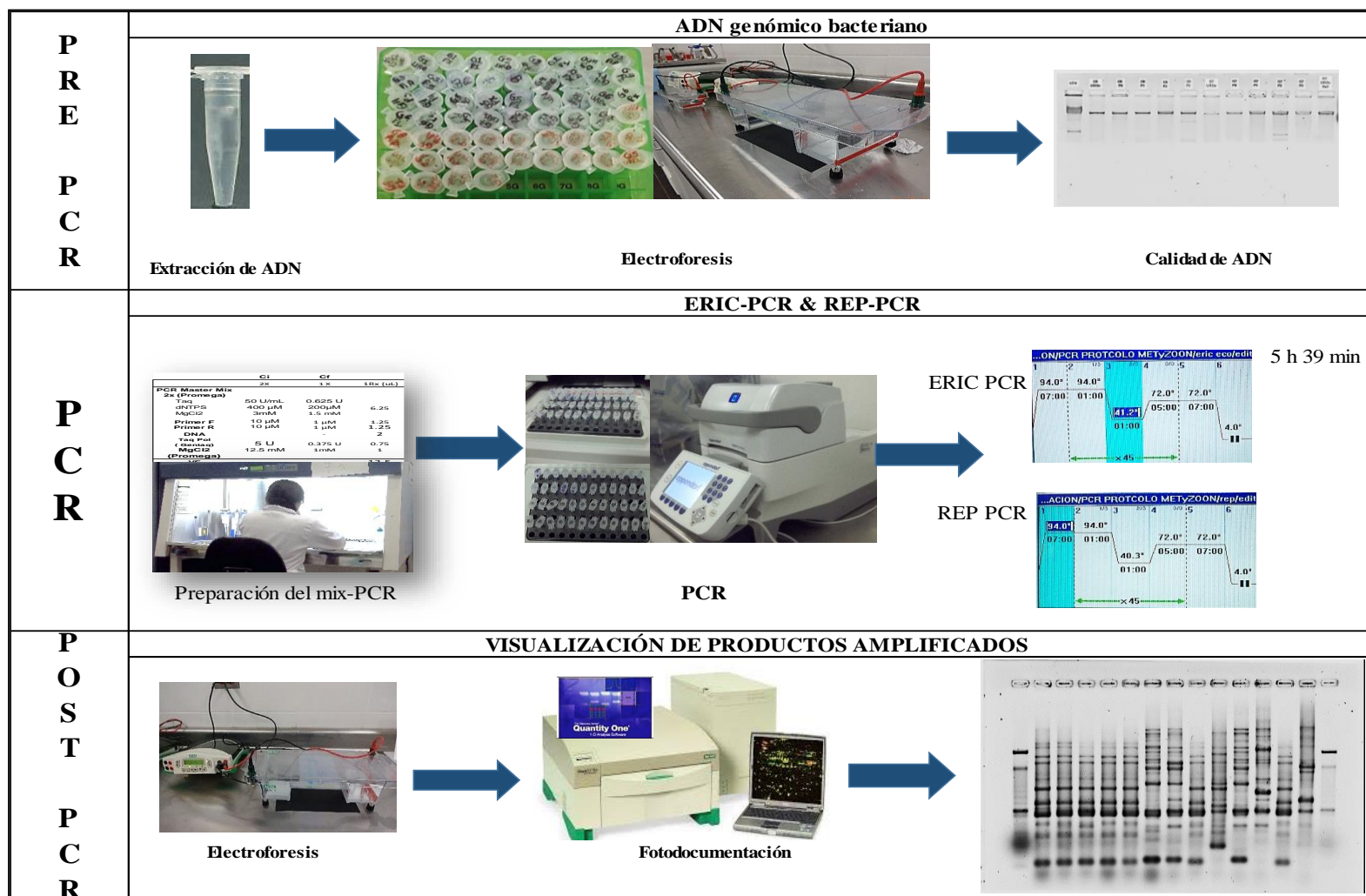
Reactivos PCR	Marca	Ci	C Rx	V Rxn (µL)
PCR Master Mix :		2X	1 X	
Taq	Promega	50 U/mL	0,625 U	
dNTPs		400 µM	200µM	6,25
MgCl ₂		3mM	1.5 mM	
Primer F	Promega	10 µM	1 µM	1,25
Primer R	Promega	10 µM	1 µM	1,25
MgCl ₂	Promega	12.5 mM	1 mM	0,75
Taq Polimerasa	Gen TaQ	5U/mL	0,375 U	1
DNA	-		-	2
Volumen final				12.5

Ci : Concentración inicial

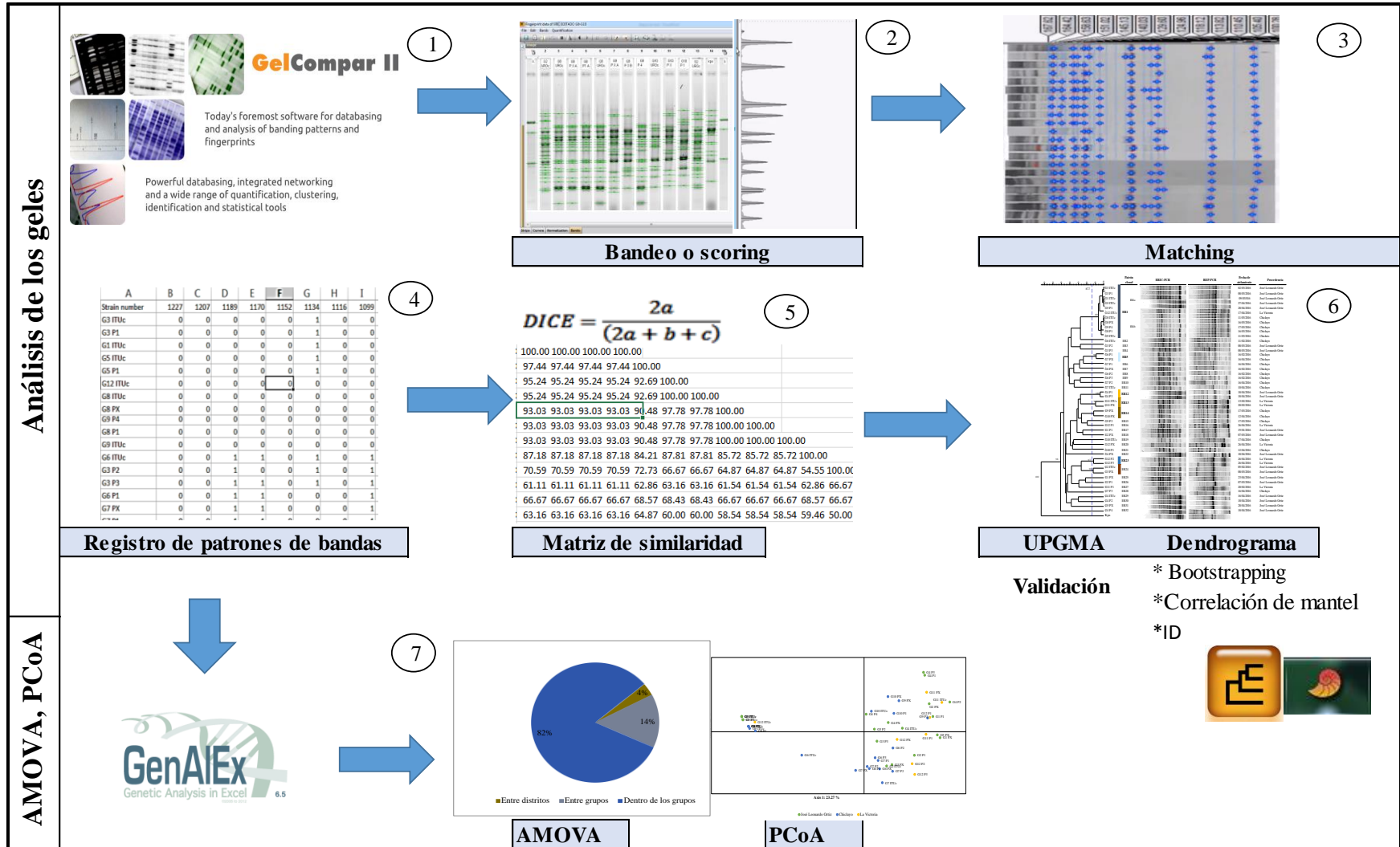
Cf: Concentración final

V Rx: Volumen por reacción

ANEXO 11. Proceso de la caracterización molecular de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE.



ANEXO 12. Análisis bioinformático



ANEXO 13. Características epidemiológicas, clínicas y ambientales de los 12 pacientes con cultivo positivo en heces para *E. coli* productora de BLEE. Hospital Regional Lambayeque, noviembre 2015-noviembre 2016

Características epidemiológicas		n
Edad (años)	18 -32	1
	33-64	8
	≥65	3
Sexo	F	10
	M	2
Procedencia	Chiclayo	5
	J.LO	5
	La victoria	2
Ocupación	Ama de casa	8
	Ninguna	2
	Otros	2
Características clínicas		n
Antecedente de ITU	Si	12
Consumo de atb en las dos últimas semanas	No	12
Hospitalización en el último trimestre	No	12
Familiar hospitalizado	No	11
Características ambientales		n
Viajes	No	12
N° de integrantes en casa	2	2
	≥ 3	10
Material de vivienda	Adobe	3
	Rústica	2
	Material noble	6
Hacinamiento	Solo	6
	Dos personas	5
Saneamiento	Pozo ciego o letrina	1
	Desague	11
Abastecimiento de agua	Potable	12

F: Femenino, M: Masculino, atb: antibiótico, J.L.O: José Leonardo Ortiz

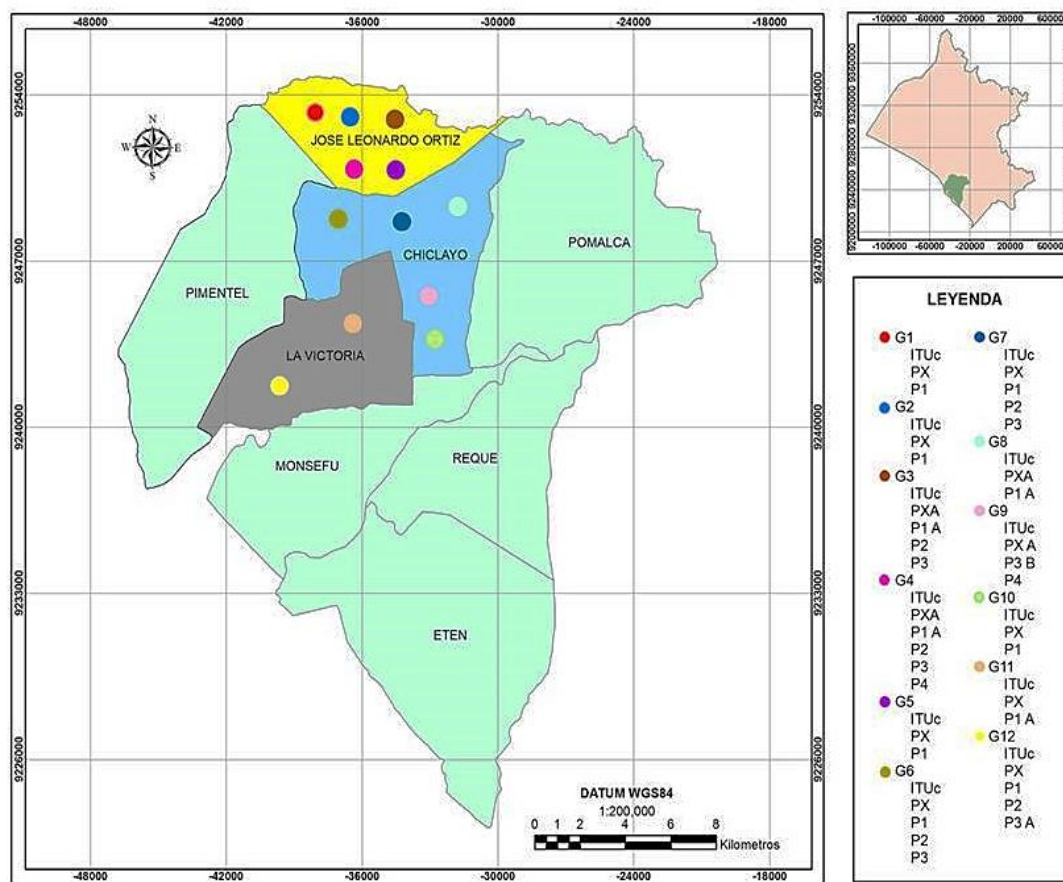
ANEXO 14. Características epidemiológicas, clínicas y ambientales de los 24 familiares con cultivo positivo en heces para *E .coli* productora de BLEE. Hospital Regional Lambayeque, noviembre 2015-noviembre.

Características epidemiológicas		n	%
Género	F	14	58,3
	M	10	41,7
Edad (años)	18 a 32	9	37,5
	33 a 64	14	58,3
	≥65	1	4,17
Procedencia	Chiclayo	10	41,7
	J.L.O	10	41,7
	La Victoria	4	16,7
Ocupación	Ama de casa	4	16,7
	Chofer	5	20,8
	Ninguna	1	4,2
	Personal de salud -	5	20,8
	Estudiante universitaria	5	20,8
	Otros	9	37,5
Características clínicas		n	%
Antecedente de ITU*	No	11	45,8
	Si	9	37,5
Consumo de atb en el último trimestre*	No	16	66,7
	Si	4	16,7
Hospitalización en el último trimestre*	No	22	91,7
Familiar hospitalizado	No	21	87,5
	Si	3	12,5
Características ambientales		n	%
Viajes *	Si	4	16,7
	No	16	66,7
N° de integrantes en casa	2	1	4,2
	≥ 3	23	95,8
Material de vivienda *	Adobe	5	20,8
	Rústica	2	8,3
	Material noble	13	54,2
Hacinamiento*	Una persona	7	29,2
	2 a 5 personas	15	62,5
Saneamiento	Desagüe	23	95,8
	Pozo ciego o letrina	1	4,2
Abastecimiento de agua	Potable	24	100

ANEXO 15. Características de los pacientes y sus familiares con cultivo positivos en heces de *E. coli* productora de BLEE. Hospital Regional Lambayeque, noviembre 2015-noviembre de 2016.

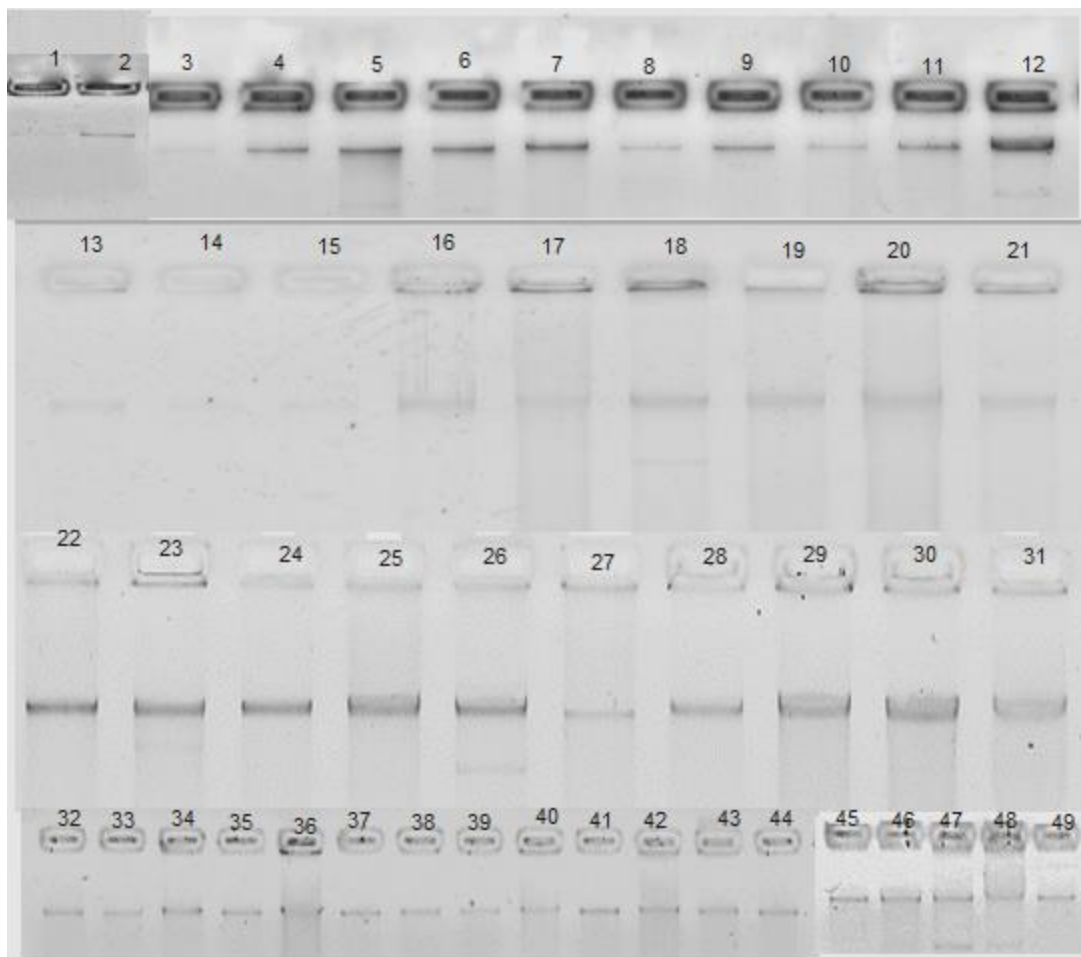
Variables	N	<i>E. coli</i> productora de BLEE	Valor P
Sexo			
F	25	24	0,07
M	16	12	
Edad (años)			
18 a 32	10	8	0,77
33 a 64	27	24	
>65	4	4	
Procedencia			
Chiclayo	19	15	0,34
José Leonardo Ortiz	16	15	
La Victoria	6	6	
Ocupación			
Ama de casa	13	12	0,22
Chofer -comerciante	9	6	
Ninguna	3	3	
Personal de salud -Estudiante	10	10	
Otros	6	5	
Antecedente de ITU			
Si	22	21	0,14
No	15	11	
Antibióticos en el último trimestre			
Si	13	13	0,14
No	23	18	
Familiar hospitalizado			
Si	0	3	1
No	37	32	
Hospitalización en el último trimestre			
Si	0	0	1
No	38	34	
Viajes			
Si	4	4	1
No	33	28	
N° de integrantes en casa			
2	2	2	1
≥3	39	34	
Material de vivienda			
Adobe	8	8	0,45
Material noble	24	19	
Rústica	4	4	
Hacinamiento			
1	15	14	0,63
2 a 5	23	19	
Saneamiento			
Desagüe	39	34	1
Pozo ciego o letrina	2	2	
Abastecimiento de agua			
Potable	41	36	

ANEXO 16. Grupos conformados por las 48 cepas de *E. coli* productora de BLEE aisladas de pacientes con ITUc y portadores fecales según procedencia. Gn (Grupo familiar), ITUc (cepas de ITUc), PX (cepa del paciente con ITUc), Pn (cepa de familiar)



Gn (Grupo familiar), ITUc (cepas de ITUc), PX (cepa del paciente con ITUc), Pn (cepa de familiar)

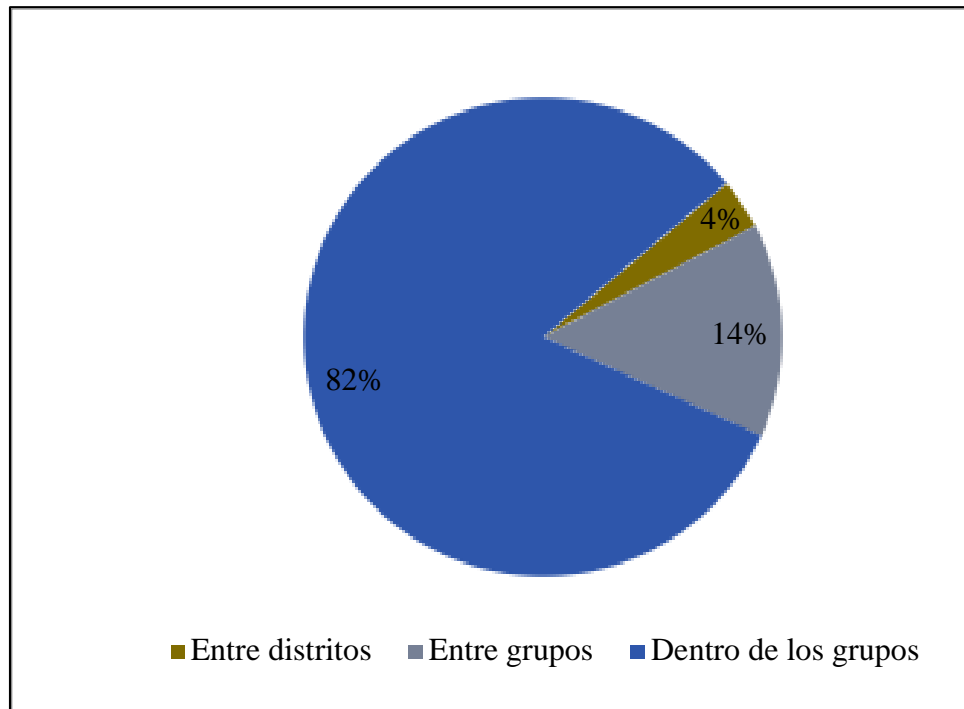
ANEXO 17. Extracciones de ADN bacteriano de 48 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITUc y portadores fecales de la ciudad de Chiclayo (carril 1 al 11, carril 13 al 49). El carril 12 corresponde al ADN de una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE (*outgroup*).



ANEXO 18. Características epidemiológicas, clínicas y ambientales de los pacientes por grupos clónales.

Variables		ER1	ER12	ER13	ER14	ER23	ER24	ER5
Edad	18-32	2				1		
	33-64	7	1	2	1	1	2	2
	>65	2	1		1			
Sexo	F	10			2	1	2	2
	M	1	2	2		1		
Enero	Febrero			2			1	1
	Marzo	8			1		1	
	Abril	3	2		1	2		1
Distritos	Chiclayo	5			2			2
	J.L.O	5	2				2	
	La Victoria	1		2		2		
Ocupación	Ama de casa	5			2		2	1
	Chofer	1	2					
	Ninguna	2				1		
	Otros	1		2		1		1
	Personal de salud -							
	Estudiante universitaria	2						
Ha presentado ITU	No	2						1
	Si	9		2	2	2	2	1
	No refiere		2					
Antibióticos en el último trimestre	No	5				1	1	2
	Si	6		2	2	1	1	
	No refiere		2					
Hospitalizaciones en el último trimestre								
Viajes	No	11	2	2	2	2	2	2
	No refiere		2					
Número de integrantes en casa	2	1		2	2			
	≥ 3	10	2			2	2	2
Material de la vivienda	Adobe	2			1	2		
	Material noble	7		2	1		1	2
	Rustica	2					1	
	No refiere		2					
Abastecimiento de agua	Potable	11	2	2	2	2	2	2
Saneamiento	Desagüe	10	2	2	2	2	2	2
	Pozo ciego o letrina	1						

ANEXO 19. Variabilidad genética según ERIC y REP-PCR de las 48 cepas de *E. coli* productoras de BLEE de los paciente con ITUc y de pacientes portadores



ANEXO 20. Matriz Binaria obtenida de los perfiles electroforéticos mediante la combinación de los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR, en las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITUc y de portadores fecales. Regional Lambayeque, noviembre 2015-noviembre 2016

G1 ITUc	G1 PX	G1 P1	G2 ITUc	G2 PX	G2 P1	G3 ITUc	G3 PX	G3 P1	G3 P2	G3 P3	G4 ITUc	G4 PX	G4 P1	G4 P2	G4 P3	G4 P4	G5 ITUc	G5 PX	G5 P1	G6 ITUc	G6 PX	G6 P1	G6 P2
0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0
1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1
0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1
1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1

1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	
1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	
0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	
0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	
1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	
1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	
0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	
0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	
1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	
1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

G6 P3	G7 ITUc	G7 PX	G7 P1	G7 P2	G7 P3	G8 ITUc	G8 PX	G8 P1	G9 ITUc	G9 PX	G9 P3	G9 P4	G10 ITUc	G10 PX	G10 P1	G11 ITUc	G11 PX	G11 P1	G12 ITUc	G12 PX	G12 P1	G12 P2	G12 P3
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1
0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0
0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1

1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	
1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	
0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	
1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	
0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	

ANEXO 21. Matriz de similitud mediante el coeficiente de Dice para *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITUc y de portadores fecales. Regional Lambayeque, noviembre 2015-noviembre 2016

	G1 ITU	G1 PX	G1 P1	G2 ITUc	G2 PX	G2 P1	G3 ITUc	G3 PX	G3 P1	G3 P2	G3 P3	G4 ITUc	G4 PX	G4 P1	G4 P2	G4 P3	G4 P4	G5 ITUc	G5 PX	G5 P1	G6 ITUc	G6 PX	G6 P1	G6 P2	G6 P3	G7 ITUc	G7 PX
G1 ITUc	1	0.424	0.493	0.623	0.486	0.529	0.987	0.613	0.987	0.632	0.592	0.543	0.575	0.56	0.382	0.579	0.597	1	0.375	1	0.73	0.554	0.592	0.514	0.587	0.551	0.64
G1 PX		1	0.623	0.677	0.548	0.786	0.431	0.603	0.431	0.5	0.508	0.517	0.459	0.635	0.607	0.625	0.436	0.424	0.577	0.424	0.419	0.566	0.508	0.452	0.476	0.456	0.476
G1 P1			1	0.639	0.754	0.698	0.5	0.629	0.5	0.62	0.545	0.523	0.529	0.686	0.508	0.676	0.452	0.493	0.61	0.493	0.406	0.5	0.515	0.522	0.571	0.562	0.571
G2 ITUc				1	0.521	0.746	0.632	0.892	0.632	0.667	0.571	0.667	0.583	0.568	0.537	0.56	0.485	0.623	0.635	0.623	0.548	0.562	0.543	0.493	0.595	0.618	0.568
G2 PX					1	0.594	0.493	0.535	0.493	0.667	0.657	0.455	0.435	0.62	0.562	0.667	0.413	0.486	0.433	0.486	0.457	0.459	0.597	0.629	0.592	0.431	0.592
G2 P1						1	0.537	0.708	0.537	0.576	0.623	0.533	0.444	0.585	0.517	0.576	0.526	0.529	0.593	0.529	0.5	0.582	0.59	0.562	0.523	0.576	0.615
G3 ITUc							1	0.622	1	0.64	0.6	0.522	0.556	0.541	0.388	0.56	0.576	0.987	0.381	0.987	0.74	0.562	0.6	0.521	0.595	0.559	0.649
G3 PX								1	0.622	0.603	0.647	0.687	0.543	0.528	0.523	0.548	0.438	0.613	0.557	0.613	0.479	0.516	0.529	0.479	0.611	0.667	0.556
G3 P1									1	0.64	0.6	0.522	0.556	0.541	0.388	0.56	0.576	0.987	0.381	0.987	0.74	0.562	0.6	0.521	0.595	0.559	0.649
G3 P2										1	0.725	0.5	0.535	0.603	0.485	0.622	0.554	0.632	0.484	0.632	0.722	0.54	0.609	0.583	0.63	0.537	0.603
G3 P3											1	0.508	0.394	0.529	0.459	0.58	0.5	0.592	0.421	0.592	0.627	0.483	0.594	0.597	0.618	0.516	0.588
G4 ITUc												1	0.585	0.567	0.7	0.618	0.508	0.543	0.643	0.543	0.394	0.456	0.413	0.364	0.388	0.492	0.448
G4 PX													1	0.629	0.54	0.62	0.484	0.575	0.508	0.575	0.377	0.5	0.515	0.377	0.457	0.5	0.543
G4 P1														1	0.677	0.959	0.594	0.56	0.623	0.56	0.366	0.516	0.5	0.535	0.5	0.455	0.5
G4 P2															1	0.697	0.491	0.382	0.593	0.382	0.281	0.4	0.393	0.375	0.338	0.339	0.4
G4 P3																1	0.554	0.579	0.613	0.579	0.417	0.54	0.522	0.556	0.548	0.418	0.521
G4 P4																	1	0.597	0.453	0.597	0.54	0.444	0.5	0.508	0.344	0.448	0.469
G5 ITUc																		1	0.375	1	0.73	0.554	0.592	0.514	0.587	0.551	0.64
G5 PX																			1	0.375	0.367	0.51	0.456	0.4	0.426	0.473	0.459
G5 P1																				1	0.73	0.554	0.592	0.514	0.587	0.551	0.64
G6 ITUc																					1	0.59	0.627	0.571	0.676	0.554	0.62
G6 PX																						1	0.724	0.492	0.613	0.679	0.71
G6 P1																							1	0.746	0.618	0.581	0.912
G6 P2																								1	0.535	0.523	0.761
G6 P3																									1	0.636	0.639
G7 ITUc																										1	0.606
G7 PX																											1

	G7 P1	G7 P2	G7 P3	G8 ITUc	G8 PX	G8 P1	G9 ITUc	G9 PX	G9 P3	G9 P4	G10 ITUc	G10 PX	G10 P1	G11 ITUc	G11 PX	G11 P1	G12 ITUc	G12 PX	G12 P1	G12 P2	G12 P3
G1 ITUc	0.583	0.611	0.5	0.946	0.946	0.917	0.917	0.649	0.507	0.946	0.638	0.639	0.529	0.507	0.553	0.452	0.947	0.559	0.522	0.5	0.493
G1 PX	0.433	0.5	0.536	0.419	0.419	0.433	0.4	0.548	0.61	0.419	0.526	0.5	0.571	0.571	0.531	0.76	0.438	0.536	0.632	0.571	0.561
G1 P1	0.567	0.478	0.476	0.522	0.522	0.507	0.507	0.696	0.697	0.522	0.531	0.657	0.54	0.714	0.704	0.526	0.535	0.603	0.719	0.603	0.625
G2 ITUc	0.563	0.62	0.567	0.603	0.603	0.592	0.592	0.575	0.543	0.603	0.5	0.563	0.448	0.568	0.533	0.59	0.613	0.567	0.559	0.716	0.735
G2 PX	0.529	0.441	0.438	0.486	0.486	0.471	0.441	0.686	0.687	0.486	0.615	0.647	0.531	0.704	0.722	0.517	0.5	0.625	0.677	0.469	0.462
G2 P1	0.548	0.581	0.621	0.531	0.531	0.548	0.516	0.594	0.656	0.531	0.576	0.516	0.517	0.585	0.545	0.654	0.545	0.621	0.678	0.586	0.678
G3 ITUc	0.592	0.62	0.507	0.959	0.959	0.93	0.93	0.658	0.514	0.959	0.647	0.648	0.537	0.514	0.56	0.459	0.96	0.567	0.529	0.507	0.5
G3 PX	0.522	0.696	0.585	0.592	0.592	0.551	0.551	0.592	0.529	0.592	0.515	0.58	0.492	0.639	0.603	0.542	0.603	0.646	0.576	0.708	0.758
G3 P1	0.592	0.62	0.507	0.959	0.959	0.93	0.93	0.658	0.514	0.959	0.647	0.648	0.537	0.514	0.56	0.459	0.96	0.567	0.529	0.507	0.5
G3 P2	0.6	0.571	0.515	0.639	0.639	0.629	0.6	0.694	0.667	0.639	0.657	0.657	0.576	0.63	0.622	0.533	0.595	0.545	0.597	0.606	0.597
G3 P3	0.554	0.677	0.59	0.597	0.597	0.585	0.554	0.597	0.594	0.597	0.581	0.554	0.525	0.618	0.58	0.509	0.609	0.656	0.548	0.426	0.516
G4 ITUc	0.438	0.469	0.467	0.515	0.515	0.5	0.469	0.545	0.508	0.515	0.426	0.5	0.4	0.537	0.559	0.519	0.559	0.533	0.525	0.633	0.623
G4 PX	0.537	0.478	0.54	0.551	0.551	0.507	0.507	0.609	0.515	0.551	0.5	0.627	0.54	0.486	0.507	0.491	0.535	0.603	0.594	0.603	0.562
G4 P1	0.522	0.464	0.431	0.535	0.535	0.493	0.493	0.676	0.618	0.535	0.606	0.667	0.554	0.694	0.712	0.61	0.548	0.554	0.667	0.523	0.485
G4 P2	0.452	0.419	0.483	0.375	0.375	0.387	0.355	0.562	0.557	0.375	0.475	0.548	0.517	0.585	0.606	0.615	0.394	0.552	0.576	0.517	0.475
G4 P3	0.543	0.514	0.485	0.556	0.556	0.514	0.514	0.722	0.667	0.556	0.627	0.714	0.576	0.74	0.757	0.6	0.568	0.606	0.687	0.515	0.478
G4 P4	0.426	0.361	0.351	0.54	0.54	0.557	0.525	0.54	0.5	0.54	0.483	0.459	0.386	0.5	0.523	0.471	0.554	0.386	0.483	0.421	0.448
G5 ITUc	0.583	0.611	0.5	0.946	0.946	0.917	0.917	0.649	0.507	0.946	0.638	0.639	0.529	0.507	0.553	0.452	0.947	0.559	0.522	0.5	0.493
G5 PX	0.552	0.379	0.444	0.4	0.4	0.379	0.414	0.533	0.596	0.4	0.436	0.448	0.37	0.557	0.516	0.542	0.419	0.444	0.582	0.519	0.545
G5 P1	0.583	0.611	0.5	0.946	0.946	0.917	0.917	0.649	0.507	0.946	0.638	0.639	0.529	0.507	0.553	0.452	0.947	0.559	0.522	0.5	0.493
G6 ITUc	0.588	0.588	0.469	0.714	0.714	0.735	0.735	0.571	0.567	0.714	0.585	0.529	0.5	0.479	0.472	0.448	0.694	0.5	0.462	0.438	0.431
G6 PX	0.712	0.61	0.618	0.59	0.59	0.61	0.576	0.623	0.586	0.59	0.5	0.542	0.436	0.484	0.54	0.612	0.571	0.509	0.571	0.618	0.607
G6 P1	0.738	0.554	0.59	0.627	0.627	0.615	0.585	0.567	0.625	0.627	0.613	0.492	0.459	0.559	0.551	0.436	0.609	0.59	0.645	0.557	0.548
G6 P2	0.588	0.5	0.469	0.514	0.514	0.5	0.471	0.514	0.597	0.514	0.554	0.412	0.375	0.676	0.639	0.414	0.528	0.531	0.585	0.469	0.492
G6 P3	0.667	0.725	0.523	0.563	0.563	0.522	0.551	0.648	0.588	0.563	0.545	0.638	0.585	0.583	0.575	0.475	0.575	0.554	0.545	0.492	0.485
G7 ITUc	0.603	0.667	0.576	0.554	0.554	0.54	0.508	0.554	0.548	0.554	0.5	0.444	0.475	0.545	0.537	0.566	0.567	0.61	0.5	0.644	0.667
G7 PX	0.783	0.58	0.585	0.676	0.676	0.667	0.638	0.62	0.618	0.676	0.576	0.551	0.462	0.528	0.548	0.441	0.658	0.615	0.667	0.585	0.576
G7 P1	1	0.606	0.677	0.588	0.588	0.606	0.576	0.676	0.615	0.588	0.54	0.606	0.484	0.609	0.6	0.429	0.6	0.548	0.603	0.548	0.54
G7 P2		1	0.613	0.588	0.588	0.576	0.545	0.618	0.523	0.588	0.603	0.576	0.516	0.58	0.571	0.5	0.6	0.677	0.476	0.484	0.571
G7 P3			1	0.531	0.531	0.548	0.516	0.562	0.557	0.531	0.441	0.581	0.483	0.492	0.455	0.538	0.515	0.517	0.542	0.552	0.61
G8 ITUc				1	1	0.971	0.971	0.6	0.537	1	0.646	0.588	0.531	0.479	0.528	0.448	0.944	0.562	0.523	0.531	0.523
G8 PX					1	0.971	0.971	0.6	0.537	1	0.646	0.588	0.531	0.479	0.528	0.448	0.944	0.562	0.523	0.531	0.523
G8 P1						1	0.97	0.588	0.523	0.971	0.635	0.576	0.516	0.464	0.514	0.464	0.914	0.548	0.508	0.516	0.508
G9 ITUc							1	0.559	0.492	0.971	0.603	0.576	0.516	0.435	0.486	0.429	0.914	0.516	0.476	0.484	0.476
G9 PX								1	0.806	0.6	0.708	0.882	0.594	0.761	0.806	0.586	0.639	0.594	0.769	0.594	0.585
G9 P3									1	0.537	0.71	0.677	0.623	0.735	0.725	0.618	0.551	0.59	0.806	0.59	0.581
G9 P4										1	0.646	0.588	0.531	0.479	0.528	0.448	0.944	0.562	0.523	0.531	0.523

G10											
ITUc	1	0.667	0.644	0.667	0.627	0.528	0.597	0.644	0.667	0.542	0.5
G10 PX		1	0.613	0.667	0.686	0.536	0.6	0.581	0.698	0.548	0.54
G10 P1			1	0.554	0.576	0.615	0.515	0.621	0.644	0.483	0.407
G11											
ITUc				1	0.904	0.542	0.521	0.585	0.697	0.554	0.576
G11 PX					1	0.567	0.568	0.606	0.687	0.545	0.567
G11 P1						1	0.467	0.577	0.642	0.615	0.566
G12											
ITUc							1	0.576	0.537	0.515	0.507
G12 PX								1	0.61	0.552	0.576
G12 P1									1	0.644	0.633
G12 P2										1	0.881
G12 P3											1

