



**BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

INSTITUTO DE CIENCIAS (ICUAP)

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS (CICM)**

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**“Análisis bioinformático comparativo del
viruloma, resistoma y mobiloma en genomas
completos de *E. coli* uropatogénica y *E. coli*
comensal”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
CON OPCIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA

Q.F.B SUEMY ANAHÍ CEN NÁJERA

DIRECTOR DE TESIS

DC. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

Puebla, Puebla

Diciembre 2021



BUAP

Puebla, Pue. a 26 de noviembre 2021

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Suemy Anahí Cen Nájera**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Análisis bioinformático comparativo del viruloma, resistoma y mobiloma en genomas completos de *E.coli* uropatogénica y *E.coli* comensal”

A nuestro juicio, la alumna **Suemy Anahí Cen Nájera** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

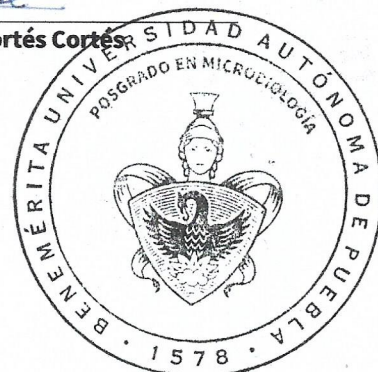
Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

D.C. Patricia Lozano Zarain

D.C. Margarita Ma. De la Paz Arenas Hernández

D.C. Verónica Quintero Hernández

D.C. Gerardo Cortés Cortés



AGRADECIMIENTOS

❖ INSTITUCIONALES

- A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por permitirme formar parte de esta casa de estudio.
- Al Instituto de Ciencias y a todo su personal, por el apoyo brindado en la gestión de todos los requerimientos solicitados.
- Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas y a la Coordinación del Posgrado en Microbiología, por brindarme la oportunidad de realizar la maestría, por el apoyo y disponibilidad para tratar cualquier asunto.
- Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, por aceptarme en el programa de Posgrado en Microbiología, por el conocimiento obtenido en este centro y por confiar en mi como alumno.
- Al Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, por abrirme las puertas para poder desarrollar mi proyecto.
- A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, por el apoyo para la realización de este proyecto.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada durante los estudios de maestría, con número de becario 810042. Esta tesis forma parte de los proyectos de CONACyT de Ciencia Básica: A1-S-22136 del fondo FOSEC SEP-Investigación básico

❖ ACADEMICOS

- A mi asesora de tesis la D.C Rosa del Carmen Rocha Gracia por ser mi principal guía por su paciencia, su tiempo, su consejo, por confiar en mi para la realización de este proyecto, gracias por tanto.
- A la D.C. Patricia Lozano Zaráin por su apoyo constante, por su disponibilidad, su tiempo y sus consejos que enriquecieron este trabajo.
- A la D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández, por su valioso apoyo durante este proyecto por los comentarios constructivos que fortalecieron este trabajo.
- A la D.C. Verónica Quintero Hernández, por sus consejos, disponibilidad y apoyo para el desarrollo de este proyecto.
- Al D.C. Gerardo Cortés Cortés por su disponibilidad durante este proyecto, su consejo y su asesoría.
- A la M.C. María Guadalupe Alonso Balbuena, por su valioso tiempo, por su asesoría, sus consejos y paciencia.

DEDICATORIAS

❖ A MI FAMILIA

A mis padres siempre apoyarme en mis proyectos, aunque impliquen distancia y ausencia, por darme la fortaleza y seguridad de que puedo lograr todo lo que me proponga. Gracias por enseñarme a ser constante.

A mi hermana, sobrino y Dani, por su por su comprensión ante mi volubilidad y mis ausentismos durante esta etapa.

❖ A MIS AMIGOS

Por darme alegría en los momentos que sentía no poder, por nuestra amistad de tantos años, por incitarme a seguir siempre.

❖ A MIS COMPAÑEROS

A mis compañeros de generación en esta bella etapa por su apoyo constante, sus consejos y su compañía que a pesar de la distancia nunca fue ausente

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, que me hicieron parte de él, en la corta pero significativa instancia.

A mis compañeros de equipo de trabajo D.C. Edwin, D.C. Gerardo, M.C María, por su apoyo constante y la paciencia hacia mi persona.

A mis compañeros Michelle, Naín y Alejandro porque siempre me alentaron a mantenerme preparada y compartieron conmigo su conocimiento.

Contenido

| | |
|---|------------|
| Índice de tablas..... | I |
| Índice de figuras | II |
| RESUMEN..... | III |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1. 1 Infección de vías urinarias..... | 1 |
| 1.2 Generalidades de <i>Escherichia coli</i> | 1 |
| 1.2.1 <i>E. coli</i> intestinal y extraintestinal | 2 |
| 1.3 <i>E. coli</i> uropatógena (UPEC) | 4 |
| 1.3.1 Factores de virulencia en UPEC | 5 |
| 1.3.1.1 Factores de virulencia asociados a la superficie celular bacteriana | 5 |
| 1.3.1.2 Factores de virulencia no asociados a la superficie celular bacteriana..... | 8 |
| 1.3.2 Importancia de UPEC ST131 | 10 |
| 1.4 Tratamiento y resistencia a los antibióticos en ITU..... | 11 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 15 |
| 2.1 Antecedentes generales..... | 15 |
| 2.2. Antecedentes directos | 17 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 19 |
| 4. OBJETIVO GENERAL | 19 |
| 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 19 |
| 6.CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN | 21 |
| 6.1 Genomas UPEC..... | 21 |
| 6.2 Genomas Comensales..... | 21 |
| 7. ESTRATEGIA METODOLÓGICA | 22 |
| 8. MATERIALES Y MÉTODOS | 23 |
| 8.1 Estudio experimental..... | 23 |
| 8.1.1 Recolección de muestras biológicas y aislamiento de <i>E. coli</i> | 23 |
| 8.1.2 Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos..... | 25 |
| 8.1.3 Producción fenotípica de BLEE..... | 25 |
| 8.2 Análisis <i>in silico</i> | 25 |
| 8.2.1 Búsqueda de genomas completos en base de datos del <i>GenBank</i> | 26 |
| 8.2.2 Análisis de tamaño y contenido de genes | 26 |
| 8.2.3 Búsqueda de Factores de virulencia | 26 |
| 8.2.4 Determinación de variantes alélicas de <i>papG</i> | 26 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 8.2.5 | Búsqueda de genes asociados a resistencia a antibióticos | 26 |
| 8.2.6 | Búsqueda de Islas de patogenicidad..... | 27 |
| 8.2.7 | Búsqueda de elementos genéticos móviles/movilizables | 28 |
| 8.2.8 | Mapeo genético de integrones clase 1 | 28 |
| 9. | PARAMETROS BIOINFORMÁTICOS..... | 29 |
| 9.1 | Serotype Finder 2.0..... | 29 |
| 9.2 | Clermont typing 1.4.0 | 29 |
| 9.3 | MLST 2.0..... | 29 |
| 9.4 | Virulence Finder 2.0 (VF) | 29 |
| 9.5 | Virulence Factor Data Base (VFDB) | 30 |
| 9.6 | xblast..... | 30 |
| 9.7 | ResFinder 4.1..... | 30 |
| 9.8 | Mobile Element Finder 1.0.3..... | 30 |
| 9.9 | PlasmidFinder 2.1: | 30 |
| 10. | RESULTADOS DE ESTUDIO EXPERIMENTAL..... | 31 |
| 10.1 | Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos | 31 |
| 10.3 | Producción fenotípica de BLEE | 34 |
| 11. | RESULTADOS <i>in silico</i>..... | 35 |
| 11.1 | Genotipificación de los genomas..... | 35 |
| 11.2 | Determinación de secuencia tipo..... | 37 |
| 11.3 | Comparación de tamaños de los genomas y contenido de genes de virulencia y genes asociados a resistencia a antimicrobianos (ARA) | 39 |
| 11.4 | Búsqueda de factores de virulencia..... | 40 |
| 11.5 | Búsqueda de Islas de Patogenicidad..... | 43 |
| 11.6 | Análisis de marcadores <i>chuA</i> , <i>fyuA</i> , <i>yfcV</i> y <i>vat</i> | 46 |
| 11.7 | Búsqueda de genes asociados a resistencia a antimicrobianos | 47 |
| 11.8 | Estructura poblacional de ST131..... | 49 |
| 11.9 | Elementos genéticos móviles/movilizables presentes dentro de los genomas UPEC y comensales de <i>E. coli</i> | 53 |
| 11.10 | Búsqueda de plásmidos | 53 |
| 11.11 | Análisis de integrones clase 1 | 55 |
| 12. | DISCUSIÓN..... | 58 |
| 12.1 | Estudios experimentales | 58 |
| 12.2 | Análisis <i>in silico</i> | 60 |
| 13. | CONCLUSIONES..... | 68 |

| | |
|---|-----------|
| 14. PERSPECTIVAS | 69 |
| 15. BIBLIOGRAFÍA | 70 |
| 16. ANEXOS | 84 |
| 16.1 Anexo A: Genomas incluidos en el estudio..... | 84 |
| 16.2 Anexo B: Integrones encontrados en genomas UPEC y comensales y su localización en el genoma | 86 |

Índice de tablas

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1. Patotipos de <i>Escherichia coli</i> y marcadores genéticos de virulencia usados para su clasificación | 3 |
| Tabla 2. Principales factores de virulencia en UPEC | 10 |
| Tabla 3. Genes de resistencia a antimicrobianos más frecuentes en UPEC | 13 |
| Tabla 4. Cepas de <i>E. coli</i> aisladas de orina y heces de cada una de 6 pacientes que se analizaron en el estudio | 24 |
| Tabla 5. Islas de Patogenicidad de cepas prototipo UPEC, su contenido génico y el gen usado para su búsqueda en paréntesis. | 27 |
| Tabla 6. Resultados del fenotipo de susceptibilidad de cepas pareadas de 6 pacientes embarazadas. | 33 |
| Tabla 7. Fenotipo BLEE cepas de orina y heces de 6 pacientes embarazadas | 34 |
| Tabla 8. Medias de tamaño del genoma en mega bases (Mb), contenido de genes asociados a factores de virulencia y contenido de genes asociados a resistencia a antimicrobianos (ARA), de ambos tipos de genoma | 39 |
| Tabla 9. Características poblacionales de genomas UPEC y comensales ST131 | 49 |
| Tabla 10. Características poblacionales de genomas UPEC y comensales ST131 de este estudio | 50 |
| Tabla 11. Localización de patrones observados en los integrones de clase 1 en los genomas UPEC y comensales | 57 |

Índice de figuras

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. Desarrollo de selección de muestras biológicas. | 23 |
| Figura 2. Fenotipo de susceptibilidad de la cepa de orina (n=1) vs. cepas de heces (n=5) de la paciente 5. | 32 |
| Figura 1. Diagrama de Venn de serogrupos (en negritas) y serotipos encontrados (Círculo azul: UPEC= 87, círculo naranja: comensales= 85) | 36 |
| Figura 4. Prevalencia de serogrupos y serotipos en genomas UPEC= 87 y comensales= 85. | 36 |
| Figura 5. Prevalencia de filogrupos detectados en cepas UPEC=87 y <i>E. coli</i> comensales= 85. | 37 |
| Figura 6. Diagrama de Venn de secuencias tipo encontrados con el esquema de Atchman (Círculo azul: UPEC=87, círculo naranja: comensales= 85). | 38 |
| Figura 7. Factores de virulencia determinados por Virulence Finder y Virulence Finder Data Base en genomas UPEC= 87 (gráfica superior, cromosoma azul) y comensales= 85 (gráfica inferior, cromosoma naranja). | 41 |
| Figura 8. Árbol filogenético, obtenido con el método de máxima verosimilitud, de secuencias de aminoácidos de la adhesina <i>papG</i> en genomas UPEC (32 genomas con un total de 40 alelos de <i>papG</i>) y comensales (12 genomas con un total de 13 alelos de <i>papG</i>) | 42 |
| Figura 9. Comparación mediante <i>Artemis Comparison Tool</i> (ACT) de la isla de patogenicidad (PAI) 536-III (arriba) y PAI 536-III putativa en ABU83972 (a bajo) | 44 |
| Figura 10. Presencia de PAI's de las cepas prototipo en genomas UPEC=79/87 y comensales= 64/85, determinada a través de <i>Artemis Comparison Tool</i> (ACT) | 45 |
| Figura 11. Caracterización del potencial uropatogénico de cepas UPEC y comensales de acuerdo con la presencia de los marcadores <i>chuA</i> (receptor de hierro tipo hemo), <i>fyuA</i> (receptor de yersiniabactina), <i>yfcV</i> (subunidad principal de fimbria Yfc) y <i>vat</i> (toxina autotransportadora vacuolizante). | 46 |
| Figura 12. Prevalencia de genes de resistencia por familia de antibióticos en genomas UPEC=69 y comensales= 62. | 47 |
| Figura 13. Estructura poblacional de genomas UPEC= 16 y comensales= 3 ST131 encontrados en este estudio, realizado manualmente | 52 |
| Figura 14. Tipos de elementos genéticos móviles/Movilizables encontrados en genomas UPEC= 87 y comensales= 85 | 53 |
| Figura 15. Replicones detectados a través de PlasmidFinder en los plásmidos de UPEC y de genomas comensales. | 55 |
| Figura 16. Estructura prototípica de integrón clase 1, encontrado en genoma UPEC uk_P46212 codificado en un plásmido IncFII | 56 |
| Figura 17. Genes ARA identificados en integrones de genomas UPEC= 36 y comensales= 18 y porcentaje de integrones con el extremo 3'SC. | 56 |

RESUMEN

Escherichia coli es generalmente conocida como una bacteria comensal habitante del tracto gastrointestinal; sin embargo, puede actuar como un patógeno causando enfermedades intestinales y extraintestinales, como infección del tracto urinario (ITU). Alrededor del mundo se registran de 130-175 millones de ITU cada año, donde el principal agente causal es *E. coli* uropatógena (UPEC) representado un 70-90% de los casos. Es aceptado que el origen de estas cepas es comensal y que a través de la vía fecal-perineal-uretral estas cepas pueden desencadenar una ITU. Además, UPEC porta diversos factores de virulencia y resistencia antimicrobiana para desarrollarse y permanecer en las diferentes etapas de la patogénesis.

Con la finalidad de conocer el potencial patogénico que poseen las cepas comensales para adaptarse al nicho urinario y producir una ITU, se planteó un estudio enfocado a analizar las características genómicas que poseen cepas de *E. coli* comensales para compararlas con cepas UPEC provenientes del mismo hospedero (mujeres embarazadas). Debido a la contingencia sanitaria por COVID-19, no fue posible realizar todos los objetivos experimentales por lo que se planteó realizar un análisis *in silico* (mediante el uso de herramientas bioinformáticas de libre acceso), para estudiar el viruloma, resistoma y mobiloma de genomas completos de cepas comensales y UPEC, depositados en la base de datos *GenBank*, reportados hasta el 31 de diciembre de 2020, para así describir las similitudes y/o diferencias entre ellos.

A partir de 6 muestras pareadas (comensales y UPEC), el estudio fenotípico mostró el mismo perfil de susceptibilidad a antibióticos y fenotipo BLEE entre las cepas comensales (aisladas de heces) y la cepa UPEC de una sola paciente.

Por otro lado, se analizaron 85 genomas comensales y 87 de UPEC depositados en la base de datos del GenBank hasta el 31 de diciembre del 2020. Un total de 169 genes asociados a 79 factores de virulencia fueron detectados a través de VirulenceFinder y Virulence Finder Data Base, encontrando similitud en el contenido de genes de virulencia entre las cepas de ambas poblaciones, siendo los genes más frecuentemente detectados *terC* y *gad*, que confieren resistencia al telurio y al ácido estomacal, respectivamente y la hemolisina *hlyE* (>90% en ambos genomas). Los genes de resistencia a antimicrobianos se encontraron con mayor prevalencia en UPEC (708 genes), y aunque en los genomas comensales este número fue menor (382 genes), estos se asociaron a la resistencia de las mismas familias de antibióticos que UPEC, siendo más pronunciada la presencia de genes asociados a resistencia frente a los aminoglucósidos y betalactámicos en ambos tipos de genomas, remarcando la diferencia numérica debido a la presencia de un mayor número de variantes alélicas de este tipo de genes dentro los genomas UPEC. Los elementos genéticos móviles y movilizables (EGM) fueron los mismos en ambos tipos de genomas, destacando la presencia de plásmidos (comensales= 227 y UPEC= 233), integrones (comensales= 18 y UPEC= 36), secuencias de inserción, transposones compuestos y repeticiones invertidas miniatura, con ligeras diferencias numéricas atribuidas a la cantidad de copias codificadas en los diferentes genomas; además, en algunos casos los genes asociados a resistencia en comensales (32.2%) y UPEC (31.8%) se encontraron asociados a algún EGM.

Con los resultados obtenidos, se evidenció que las cepas comensales poseen el potencial patogénico para poder desencadenar una ITU. El análisis también mostró la presencia de determinantes de resistencia y elementos genéticos de movilización comunes entre las cepas de ambas poblaciones, lo que en conjunto con la convergencia de la triada ecológica, apoya el origen comensal de UPEC.

Palabras claves: *E. coli* uropatogénica, *E. coli* comensal, viruloma, resistoma, mobiloma.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1 Infección de vías urinarias

La infección de vías urinarias (ITU) es una de las infecciones bacterianas más comunes en el mundo, se estima que cada año afecta a más de 150 millones de personas (Garretto *et al.*, 2020) y es definida como la presencia de numerosas bacterias en la orina ($\geq 10^5$ CFU/mL); generalmente se presenta acompañada de síntomas clínicos con base a los cuales se pueden clasificar como cistitis, o ITU baja, pielonefritis o ITU alta y en su forma más severa conocida como urosepsis; definida como la diseminación de la bacteria, a torrente sanguíneo (Nichols *et al.*, 2016).

Sin embargo, también puede presentarse sin síntomas clínicos, lo que se denomina bacteriuria asintomática (ABU) (Kot, 2019). La ITU puede presentarse en grupos de todas las edades, pero existen grupos que son más vulnerables a padecerlas como los neonatos, mujeres y personas de la tercera edad (Haghighatpanah & Mojtahedi, 2019).

El principal agente causal de ITU es la bacteria *Escherichia coli* uropatógena (UPEC, por sus siglas en inglés) ocasionando más del 80% de estas infecciones (Hagos *et al.*, 2019); entre el 5 y 20% es causado por otro tipo de microorganismos como *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Enterococci spp.*

1.2 Generalidades de *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, descrito por primera vez en 1885, por Theodor Escherich como un microorganismo comensal habitante del tracto gastrointestinal de niños sanos (Torres, 2016); es el microorganismo más abundante presente en el intestino humano, coloniza el intestino a unas horas del nacimiento adhiriéndose a la mucosa del intestino grueso del humano y otros mamíferos; se recupera de muchas ubicaciones extraintestinales rebasando la barrera intestinal, actuando como acarreador de factores de virulencia pudiendo adoptar un carácter invasivo (Koli *et al.*, 2011). Las diferentes cepas de *E. coli* pueden participar en distintas interacciones con el hospedero que van desde un simbiosis como en el caso de las cepas comensales hasta provocar enfermedad en el mismo (Kittana *et al.*, 2018). La plasticidad del genoma de *E. coli* ha permitido su evolución hacia cepas patógenas, las cuales se pueden dividir en *E. coli* diarreogénica o *E. coli* intestinal y *E. coli* patogénica extraintestinal (Rojas-Lopez *et al.*, 2018).

Estas cepas a su vez han sido clasificadas filogenéticamente en 8 filogrupos de *E. coli sensu stricto*: A, B1, B2, C, D, E, F, y G. Las cepas comensales se encuentran distribuidas principalmente dentro de los filogrupos A y B1, mientras que a las cepas virulentas extraintestinales las encontramos de manera más prevalente en los filogrupos B2 y en menor medida en los filogrupos D y F (Clermont *et al.*, 2019).

1.2.1 *E. coli* intestinal y extraintestinal

Las *E. coli* causantes de enfermedad a nivel intestinal, se han denominado *E. coli* diarreagénicas (DEC), estos se han agrupado de acuerdo a sus determinantes de virulencia, el tropismo tisular por el tracto gastrointestinal (TGI), los síntomas y las consecuencias clínicas resultantes estas se han agrupado de acuerdo a los sitios de colonización, los síntomas, las consecuencias clínicas resultantes y sus determinantes de virulencia, lo que se ha denominado como patotipo y así se determinan las siguientes categorías: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (productora de toxina Shiga) (EHEC/STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* difuso adherente (DAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (Gomes *et al.*, 2016) y *E. coli* adherente invasiva (AIEC) que se ha descrito recientemente (Tabla 1). Generalmente las infecciones por los patotipos DEC están asociadas con la transmisión por ingesta de alimentos contaminados con estos, lo que representa un problema de seguridad alimentaria y de salud pública mundial.

La prevalencia de la enfermedad diarreica por *E. coli* diarrogénica se relaciona a las condiciones geográficas, temporales y climáticas que complican las iniciativas de prevención y control de la seguridad alimentaria y la salud pública, especialmente en países con recursos limitados (Aijuka *et al.*, 2018).

Existe un grupo de cepas de *E. coli* que tienen la capacidad de producir enfermedad fuera del tracto gastrointestinal, estas cepas son denominadas *E. coli* Extraintestinal Patogénica (ExPEC) e incluye la variante aviar patogénica (APEC), *E. coli* uropatógena (UPEC, mencionada anteriormente), los aislados responsables de septicemias (SEPEC) y *E. coli* causante de meningitis neonatal (NMEC) (Nielsen *et al.*, 2018).

Las cepas ExPEC generalmente codifican tres tipos de factores de virulencia: 1) factores que les permiten unirse a las células humanas (por ejemplo, fimbria P, fimbria S), 2) factores importantes para la supervivencia en el cuerpo humano (por ejemplo, sideróforos), y 3) factores capaces de dañar las células y tejidos humanos (por ejemplo, hemolisina, factor necrotizante citotóxico) (Micenková *et al.*, 2016; Etefia & Ben, 2020).

A diferencia de las cepas DEC cuya transmisión es asociada con alimentos contaminados, la ruta de transmisión de *E. coli* extraintestinal al hospedero es imprecisa; sin embargo, en mujeres se ha planteado que la ruta de transmisión de estas cepas hacia vías urinarias es la vía fecal-perineal-uretral (Yamamoto *et al.*, 1997); tomando a *E. coli* comensal como reservorio de factores de virulencia o resistencia de donde potencialmente emergerá la UPEC.

Se han planteado dos hipótesis que tratan de esclarecer el mecanismo de infección de las cepas de origen fecal hacia el tracto urinario: la primera es la hipótesis de la “prevalencia”, que sostiene que la bacteria se encuentra en el lugar correcto, en el momento adecuado y en concentración suficiente para que desencadene una infección del tracto urinario (Schlager *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2006) y la segunda es la hipótesis de la “patogenicidad especial”, que sostiene que existe un

subconjunto particular de microbiota intestinal que expresa marcadores de virulencia específicos (Schlager *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2006) que le permiten infectar el tracto urinario. Sin embargo, algunos estudios sugieren la necesidad de identificar otras fuentes, fuera del intestino humano, incluidos los alimentos y el medio ambiente, ya que en algunos casos los mecanismos de infección antes mencionados no corresponden (Matsui *et al.*, 2020).

Tabla 1. Patotipos de *E. coli* y marcadores genéticos de virulencia usados para su clasificación.

| Patotipo | Subgrupo | Marcadores genéticos de virulencia (función o factor de virulencia) | Observaciones |
|----------|-----------------|--|--|
| EAEC | Típico (tEAEC) | <i>aggR</i> (activador transcripcional) | La aparición del patrón de adhesión agregante en células HeLa/Hep-2 es el método estándar para caracterizar la EAEC |
| | Atípico (aEAEC) | <i>aatA</i> y <i>aaiG</i> (plásmido y sistema de secreción cromosómica, respectivamente) | Cepas que no portan el regulón AggR |
| EPEC | Típico (tEPEC) | <i>bfp</i> (pilus formador de mechones), <i>eae</i> (intimina) y ausencia de <i>stx</i> (toxina Shiga) | Caracterizado por la presencia de LEE |
| | Atípico (aEPEC) | <i>eae</i> (intimina) y la ausencia de <i>bfp</i> y <i>stx</i> | Carece del plásmido del factor <i>bfp</i> , efectores no LEE como <i>nleC</i> y <i>nleF</i> |
| STEC | - | <i>stx</i> (toxina Shiga) | La ausencia de LEE no excluye el potencial de causa de enfermedad severa en el humano, porta otros genes de virulencia como <i>lpf</i> que favorecen la adhesión de esta |
| | EHEC | <i>stx</i> (toxina Shiga) y <i>eae</i> (intimina) | La presencia de la isla de patogenicidad LEE confiere a EHEC la capacidad de causar lesión <i>attaching and effacing</i> (A/E) en el epitelio intestinal, como a EPEC |
| ETEC | - | <i>elt</i> (toxina temolábil, LT) y/o <i>est</i> (toxina termoestable, ST) | Es el organismo más importante que causa la diarrea del viajero. ETEC también contribuye significativamente a la deshidratación de las enfermedades diarreicas en bebés y niños en entornos con recursos limitados |
| EIEC | - | <i>ipaH</i> (familia de efectores multicopia presentes en el plásmido y cromosoma de invasión) | La presentación clínica y los mecanismos de virulencia de EIEC son indistinguibles de los iniciados por <i>Shigella spp.</i> y tanto EIEC como <i>Shigella</i> llevan el plásmido pINV tipo F que codifica los genes necesarios para la patogénesis enteroinvasiva |

| | | | |
|--------------|------|---|---|
| DAEC | - | <i>dra</i> o <i>afa</i> (adhesinas AFA-Dr) | No se describió ningún factor de virulencia confirmado como determinante de la diarrea |
| AIEC | - | Desconocido | Ningún factor de virulencia descrito como marcador molecular, involucrado como determinante de enfermedad inflamatoria intestinal |
| ExPEC | - | Se ha propuesto la presencia de al menos dos de los cinco genes: <i>pap</i> (fimbrias P), <i>sfa</i> (fimbrias S), <i>afa/dra</i> (adhesinas AFA-Dr), <i>iuc/iut</i> (aerobactina) y <i>kpsMT II</i> (grupo capsular II) | Las cepas virulentas intrínsecas son letales en un modelo animal de sepsis; no todos los aislamientos extraintestinales albergan este conjunto de genes de virulencia |
| | APEC | Se ha asociado a <i>hlyF</i> (hemolisina F), <i>ompT</i> (Proteína de membrana externa), <i>iroN</i> (receptor de salmoquelina), <i>iss</i> (Proteína de resistencia al suero) e <i>iutA</i> (receptor de aerobactina) ubicados en el plásmido de virulencia ColV | Aislado del tracto respiratorio de aves |
| | UPEC | Algunos autores sugieren la presencia simultánea de los siguientes genes: <i>yfcV</i> (subunidad principal de fimbria Yfc), <i>vat</i> (toxina autotransportadora vacuolante), <i>chuA</i> (receptor de hierro hemo) y <i>fyuA</i> (receptor yersiniabactina) | No todos los aislados de ITU codifican estos cuatro genes. |

Tabla modificada de: (Newell & La Ragione, 2018; Jesser & Levy, 2020; Santos *et al.*, 2020).

1.3 *E. coli* uropatógena (UPEC)

UPEC, codifica varios factores de virulencia para poder permanecer en las diferentes etapas de patogénesis de la enfermedad: en la adhesión y colonización, invasión, persistencia, desarrollo de biopelícula, formación de comunidades intracelulares y formas quiescentes intracelulares, así como en la colonización del riñón y daño epitelial (Zalewska-Piatek & Piatek, 2019).

La virulencia de la bacteria, el tamaño del inóculo y los mecanismos de defensa del hospedero determinarán el éxito de la invasión del tracto urinario; sin embargo, hospederos como las mujeres tienen una mayor predisposición, debido a la proximidad del ano y la uretra, el efecto de las hormonas y cambios en la microbiota genital (López *et al.*, 2014).

1.3.1 Factores de virulencia en UPEC

Estas cepas se caracterizan por tener una gran variedad de factores de virulencia tanto en su estructura externa como los secretados por la misma célula bacteriana; de esta manera pueden ser divididos en dos categorías principales: 1) factores de virulencia asociados a la superficie celular bacteriana y 2) factores de virulencia secretados por la bacteria (Etefia & Ben, 2020).

1.3.1.1 Factores de virulencia asociados a la superficie celular bacteriana

Dentro de los factores asociados a la adherencia, que son expresados en la superficie bacteriana, se encuentran las fimbrias o pilis. La adherencia a las células del hospedero es el principal determinante para el establecimiento del microorganismo; a través de la participación de adhesinas fimbriales (FimH, PapG, SfaS, FocH, CsgA y DrA) localizadas en la parte distal de las fimbrias (tipo 1, P, S, F1C, curli y Dr, respectivamente) (Luna *et al.*, 2018). Estas estructuras de superficie celular bacteriana consisten en proteínas pilinas oligoméricas que se arreglan en una estructura cilíndrica helicoidal y son más delgadas y cortas que el flagelo; reconocen componentes específicos como receptores, usualmente carbohidratos, sobre las células del hospedero (Alam Parvez & Rahman, 2019).

La fimbria tipo 1, es una de las principales determinantes de la patogénesis de estas cepas, esta interactúa con proteínas uroplaquina manosiladas en las células de la vejiga, resultando en un proceso de invasión que permite a UPEC resistir el flujo de la orina, anticuerpos, moléculas bactericidas y la actividad de antibióticos en el tracto urinario. Esta fimbria está codificada por genes del operón *fim*, que pertenecen al *core* del genoma del microorganismo, dentro del operón destaca el gen *fimH*, el cual codifica la adhesina del pili, esta adhesina es manosa sensible y puede causar hemaglutinación, además estimula la señalización de las vías involucradas en la invasión bacteriana, la muerte celular programada y también puede mediar el aumento de concentración de calcio intracelular de las células uroteliales (Luna *et al.*, 2016; Alam Parvez & Rahman, 2019; Etefia & Ben, 2020).

La fimbria P contribuye a la patogenicidad facilitando la colonización, previniendo la remoción por filtración de la orina e incrementando la invasión y proliferación en riñones, por lo que se asocia a pielonefritis. Además, ayuda a *E. coli* a cruzar la barrera epitelial urinaria y así poder ingresar al torrente sanguíneo pudiendo ocasionar urosepsis y también hemaglutinación. La fimbria P está compuesta por seis subunidades PapG, PapF, PapE, PapK, PapA, y PapH, que son codificadas por genes *pap* que se localizan dentro de una isla de patogenicidad (PAI). Este tipo de pili reconoce los glucoesfingolípidos que portan el determinante Gal- α (1-4) β -Gal en el epitelio e interactúan con este a través de la adhesina PapG la cual es manosa resistente (Alam Parvaez & Rahman, 2019; Etefia & Ben, 2020). Existen 3 variantes de la adhesina PapG diferenciadas por la globotriacil ceramida a la que se unen: PapGI y PapGII se unen principalmente a globotriaosilceramida (Gb3) y globósido (Gb4, abundante en células uroepiteliales) respectivamente, y que a su vez se relacionan con aislados clínicos de pielonefritis y bacteriemia; mientras que

PapGIII se une al antígeno de Forssman o Gb5 y se ha relacionado con aislados clínicos de cistitis (Flores *et al.*, 2019).

La fimbria S está asociada con la capacidad de *E. coli* para diseminarse y provocar una sepsis; es codificada por genes *sfa* localizados en una PAI; media la interacción de la bacteria con los receptores que contienen ácido siálico en el epitelio de la vejiga y ductos uretrales; además, se une a otras moléculas en las superficies de las células como fibronectina y laminina a través de la adhesina SfaS. Esta fimbria es activadora del plasminógeno y puede incrementar la activación de este dentro del cuerpo del hospedero lo cual puede resultar en actividades extracelulares plasminolíticas bacterianas (City *et al.*, 2019; Behzadi & Behzadi, 2017; Etefia & Ben, 2020).

La fimbria F1C ha sido descrita como un factor de adherencia no hemaglutinante, los receptores específicos para FC1 son las moléculas de Gal-Nac- β -1,4-Gal- β localizadas en células uroteliales, los uréteres, los glomérulos, las membranas de la mucosa urinaria, el endotelio de la vejiga y el riñón, los túbulos distales de las nefronas y los conductos colectores de orina, y su presencia se correlaciona con pielonefritis. Para su biogénesis es necesario un *cluster* (grupo) de siete genes *loc* dentro del cromosoma bacteriano donde FocH funciona como adhesina reconociendo determinantes galactosil-ceramida (Zamani & Salehzadeh, 2018; Alam Parvez & Rahman, 2019; Behzadi & Behzadi, 2017).

La fimbria 9 (F9) no contribuye a la hemaglutinación, pero tiene un papel importante en la formación de biopelícula, por lo que contribuye al establecimiento de infección de vías urinarias asociadas al uso de catéter (CAUTI). F9 es codificada en un operón de seis genes c1931-c1936, de donde C1931 es la adhesina; sin embargo, para que la unión de esta fimbria se lleve a cabo requiere otra adhesina FmlH, la cual asemeja a FimH. Las moléculas de glicano Gal- β -1,3- Glc-NAc son los receptores superficiales de F9 (Behzadi, 2020).

La presencia de la fimbria Afa/Dr en las cepas de *E. coli*, tiene una correlación con una mayor colonización y capacidad invasiva, esta confiere hemaglutinación resistente a manosas y se unen al Factor Acelerante de Decaimiento (DAF). Estas fimbrias son capaces de unirse a la membrana basal del epitelio tubular y a la cápsula de Bowman; también se unen a moléculas de adhesión celular relacionadas con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM). La unión del patógeno al receptor DAF es seguida por una cascada de señalización asociada a CEACAM, que desencadena una remodelación de la superficie de la célula hospedera que ayuda a la colonización bacteriana del tracto urinario (Subashchandrabose & Mobley, 2015; Werneburg & Thanassi, 2018).

La fimbria curli es una proteína fibrosa de superficie tipo amiloide la cual es importante para el desarrollo de biopelícula, su presencia está asociada con infecciones humanas graves. Esta fimbria interactúa específicamente con una matriz de proteínas del hospedero como son fibronectina, laminina y plasminógeno para iniciar la adherencia y colonización del hospedero, está codificada por genes *csg*, donde *cgsA* es la subunidad principal, la curlina (Cordeiro *et al.*, 2016; Zalewska-Piatek & Piatek, 2019).

Otras fimbrias relacionadas con la adhesión en las cepas UPEC son la Auf, Pix, Yad, Yeh, Yfc e Ygi (Subashchandrabose y Mobley, 2015). De igual manera se han descrito adhesinas denominadas afimbriales por no poseer las características estructurales mencionadas como es Iha y FdeC (Terlizzi *et al.*, 2017). Además, existen otras proteínas asociadas a la adhesión como las proteínas autotransportadoras (AT), que permiten el paso a través de la membrana biológica además de la adhesión, invasión y formación de biopelícula durante la patogénesis; entre estas encontramos a la toxina vacuolizante autotransportadora, Vat, codificada por el gen *vat*, que al igual es encontrada en APEC (Shakhatreh *et al.*, 2019) y AIEC (Chervy & Barnich, 2020; Palmela *et al.*, 2017).

Otra estructura de superficie de importancia es la cápsula, esta cubre a la bacteria y confiere protección frente a condiciones desfavorables como la respuesta inmune del hospedero, protege de la fagocitosis y muerte del microorganismo por acción del complemento, incluyendo resistencia al suero del hospedero y a los antibióticos. Está constituida principalmente de polisacáridos (antígeno K) (Alam Parvez & Rahman, 2019), existen más de 80 tipos diferentes de antígenos capsulares, estos pueden ser clasificados en cuatro grupos principales según la organización genética del grupo de genes de la cápsula, así como por su mecanismo de biosíntesis y ensamblaje. Las cápsulas del grupo 2 compuestas por diferentes antígenos K (por ejemplo, K1, K2, K5 y K100) se expresan comúnmente entre las cepas UPEC. Los genes implicados en la biosíntesis de cápsulas del grupo 2 se organizan en tres regiones distintas:

- Regiones I (*kpsFEDUCS*) y III (*kpsMT*) se conservan en todo el grupo 2, codifican un complejo transmembrana involucrado en la exportación y ensamblaje de los polisacáridos capsulares.
- Región II es específica de serotipo y codifica las enzimas responsables de sintetizar el polisacárido capsular (Goh *et al.*, 2017).

Un elemento importante que permite la sobrevivencia de *E.coli* frente al suero humano, induce la síntesis de anticuerpos específicos y es un activador inmune que induce la producción de óxido nítrico y citocinas es el lipopolisacárido (LPS); (Alam Parvez & Rahman, 2019). Este consiste en una región central de lípido A conservada; una región central formada por ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico (Kdo) y uno o más residuos de L-glicerol-D-mano-heptosa y como parte más externa e hidrofílica una región de antígeno O variable. El antígeno O es altamente variable entre cepas de *E. coli*, esta variación es causada por cambios en los residuos de azúcar y patrones de enlace dentro de las subunidades de repetición del componente, con base a estos cambios surge la clasificación del microorganismo según el tipo de antígeno O, hay más de 180 diferentes serotipos, entre los tipos más comunes en los aislados UPEC en humanos se incluyen O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25 y O75 (Morales *et al.*, 2016; Goh *et al.*, 2017).

Otro apéndice de superficie en *E. coli* es el flagelo (s), esta puede tener de seis a 8 flagelos distribuidos en su superficie, estos se encuentran implicados en la motilidad ya sea por nado o por *swarming* (Movimiento colectivo de células), además esta

motilidad puede favorecer la colonización hacia otros sitios del tracto urinario. La motilidad de UPEC está regulada por proteínas codificadas por operones fimbriales a través de procesos como la unión del regulador PapX asociado a las fimbrias P, al promotor flhDC, la inhibición de la transcripción y la sobreexpresión génica que resulta en una producción reducida de flagelina, una motilidad disminuida y una respuesta quimiotáctica alterada. El flagelo constituye el antígeno H y junto con el antígeno O son usados para tipificar los aislados de *E. coli* (Khan *et al.*, 2020).

Otros factores que pueden contribuir a la patogénesis de las cepas UPEC son las proteínas de membrana como TraT e Iss que le facilitaran el escape de la muerte por complemento y la resistencia al suero humano; la proteína de membrana externa T (OmpT), es una serin proteasa de superficie que cataliza la activación del plasminógeno a plasmina, escinde la protamina y otros péptidos catiónicos con actividad antibiótica lo que promueve la permanencia de *E. coli* en el tracto urinario (Etefia & Ben, 2020).

1.3.1.2 Factores de virulencia no asociados a la superficie celular bacteriana

Las cepas UPEC también pueden producir otros factores de virulencia no asociados a su superficie, estos son llamados factores de virulencia secretados, entre ellos se puede mencionar a las toxinas. UPEC secreta toxinas como son la α -hemolisina y el factor necrotizante citotóxico-1 (CNF-1). La α -hemolisina es codificada por el gen *hlyA* y necesita ser activada por el gen *hlyC* que codifica una acil-transferasa, finalmente es secretada por el sistema de secreción tipo I (Subashchandrabose & Mobley, 2015). Esta es una toxina formadora de poros la cual induce a la lisis celular produciendo la salida de nutrientes y otros factores, como el hierro, que favorecerán la permanencia del microorganismo en el nicho urinario, a altas concentraciones puede lisar eritrocitos y las células del hospedero (Flores *et al.*, 2019); también, se ha demostrado que induce la muerte celular dependiente de caspasas en células epiteliales de la vejiga, lo que resulta en la exfoliación celular (Terlizzi *et al.*, 2017). El CNF-1 contribuye a la invasión de células uroteliales, en ensayos *in vitro* los cambios celulares que ocasiona son la multi nucleación, rearrreglo del citoesqueleto de actina, apoptosis de las células uroteliales, formación de lamelipodios y filopodios, decremento de la capacidad de fagocitosis por polimorfonucleares y activación de factor nuclear κ B (Flores, *et al.*, 2019).

Otras toxinas asociadas a UPEC son la toxina citoletal distendida (Cdt) la cual bloquea el ciclo celular eucarionte, suprime la proliferación celular y puede causar muerte celular, tiene actividad DNasa-I (Guner *et al.*, 2020), la proteína uropatógena específica (Usp), que es una genotoxina activa contra las células de mamíferos con actividad endonucleasa; se ha asociado a las cepas que provocan pielonefritis, prostatitis y bacteriemia, está codificada dentro de una PAI (Alam Parvez & Rahman, 2019) y la toxina autotransportadora secretada (Sat), la cual, tiene acción contra las células de vejiga y riñón, y siendo una serin proteasa autotransportadora de *Enterobacteriaceae* (SPATE) puede incrementar la propagación de UPEC al torrente sanguíneo, resultando en un daño específico al glomérulo y túbulo

proximales (Alam Parvaez & Rahman, 2019). Dentro de las SPATEs existen otras toxinas como la Tsh (temperature sensitive hemagglutinin), Hbp (*hemoglobin binding protein or hemoglobin protease*), Vat (*vacuolating autotransporter toxin*) y la proteína Pic (involucrada en la colonización), las cuales se encuentran codificadas en PAI's. La Tsh promueve la adhesión a los glóbulos rojos, la hemoglobina y a la fibronectina y colágeno IV (proteínas de la matriz extracelular). Hbp solo se diferencia de Tsh por dos residuos de aminoácidos y probablemente comparte similitudes funcionales con respecto a la descomposición del factor V de hemoglobina y la mucina. Vat y Pic tienen actividad mucinolítica y mejoran la colonización del epitelio. Pic y Tsh/Hbp también se dirigen a las principales moléculas de adhesión de leucocitos humanos CD43, CD44, CD45 y CD93, desregulando así la migración de leucocitos y la inflamación (Desvaux *et al.*, 2020).

Uno de los elementos esenciales para el crecimiento de *E. coli* es el hierro, principalmente usado para transporte y almacenamiento de oxígeno, síntesis de DNA, transporte de electrones y metabolismo de peróxidos. UPEC posee redundantes sistemas que median la captura de este nutriente, que son regulados negativamente por el hierro ferroso y la captura del hierro férrico por el regulador Fur.

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular que tienen alta afinidad por el hierro férrico (Fe^{3+}) el cual se encuentra libre como catión, las bacterias recuperan el nutriente como complejo sideróforo- Fe^{3+} , a través de los receptores de membrana que facilitan el transporte de este complejo hacia el citosol donde se libera el hierro. La capacidad de formar sideróforos dota a la bacteria para poder sobrevivir durante el desarrollo de la ITU; UPEC puede sintetizar cuatro tipos de sideróforos: enterobactina, salmoquelina, yersiniabactina y aerobactina; codificados en los genes 1) *ent-fes-fep*, 2) *iroA*, 3) *irp2*, *irp1*, *ybtSETUXPQA*, contenidos en la isla de alta patogenicidad (HPI) y 4) *iucDBAC*, respectivamente (Khasheii *et al.*, 2016). Otras proteínas asociadas a la captación de hierro son ChuA y Hma, proteínas de membrana que median la absorción y el transporte del grupo hemo, captando el hierro libre a diferencia de los sideróforos (Alam Parvez & Rahman, 2019; Shakhathreh *et al.*, 2019).

Otro de los determinantes de la patogenicidad de UPEC es la capacidad para formar biopelículas, las cuales son comunidades bacterianas envueltas en exopolisacáridos segregados por ellas mismas y que le permiten persistir en las vías urinarias, además de ser uno de los mecanismos que usa para la resistencia a antimicrobianos y evasión de la respuesta inmune (Hagos *et al.*, 2019). En la tabla 2 se muestran los principales factores de virulencia de UPEC.

Tabla 2. Principales factores de virulencia en UPEC.

| Categoría funcional | Factor de virulencia |
|-----------------------|---|
| Adhesinas | Fimbria tipo 1 (<i>fim</i>) |
| | Fimbria P (<i>pap</i>) |
| | Adhesina afimbrial (<i>afa</i>) |
| | Ag43 (<i>flu</i>) |
| | Otros genes de fimbrias: <i>auf</i> , <i>dr</i> , <i>f1C</i> , <i>f9</i> , <i>pix</i> , <i>d</i> , <i>yad</i> , <i>yeh</i> , y <i>ygi</i> . |
| Adquisición de hierro | Enterobactina (<i>fepA</i>) |
| | Aerobactina (<i>iuc</i>) |
| | Yersiniabactina (<i>ybt</i>) – receptor de yersiniabactina (<i>fyuA</i>) |
| | Salmochelina (<i>iro</i>) |
| | Receptores del grupo Hemo de membrana externa Chua (<i>chuA</i>) y Hma |
| | Sistema de transporte <i>sit</i> , <i>iha</i> |
| Toxinas | alfa-Hemolysina (<i>hlyA</i>) |
| | Factor necrotizante citotóxico-1 (<i>cnf-1</i>) |
| | Toxina autotransportadora vacuolizante (<i>vat</i>) |
| | Serin proteasa autotransportadora (<i>sat</i>) |
| Otros | Proteasa implicada en la colonización (<i>pic</i>) |
| | Proteínas autotransportadoras (AT): Urocinasa plasminógeno activador, UpaB y UpaC |

Tabla tomada de Subashchandrabose y Mobley, 2015.

1.3.2 Importancia de UPEC ST131

Una forma de tipificar a las *E. coli* extraintestinales es tomando en cuenta secuencias tipo (ST) de acuerdo a la similitud y cercanía evolutiva, utilizando la secuenciación de genes *housekeeping* (de mantenimiento constitutivos) y altamente conservados que son: *adk* (adenilato quinasa), *fumC* (fumarato hidratasa), *gyrB* (DNA girasa), *icd* (isocitrato/isopropilmalato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *purA* (adenilosuccinato deshidrogenasa) y *recA* (motivo de unión de ATP/GTP) bajo el esquema de Atchman (Pitout & Finn, 2020).

Las ST encontradas en las cepas aisladas de vías urinarias con mayor frecuencia son ST69, ST73, ST95, ST127 y ST131. ST69 suele mostrar un perfil de resistencia a múltiples fármacos; ST73, también es una cepa virulenta y se ha descrito con genes CTX-M codificados en plásmidos; ST95 se asocia con meningitis neonatal (de Souza da-Silva *et al.*, 2017); las cepas ST127 son de reciente emergencia responsables primariamente de ITU, pero también se les ha asociado con bacteriemia y enterocolitis necrotizante en infantes pretérmino y muestran un incremento de la letalidad en la ITU en comparación con los linajes ST comunes de UPEC (O'Hara *et al.*, 2019). Finalmente, UPEC ST131 resalta epidemiológicamente por estar diseminada mundialmente y representar el agente causal de hasta el 60% de todas las infecciones por *E. coli* reportadas a nivel mundial; adquiriendo aún más relevancia por representar hasta el 78% de cepas resistentes a fluoroquinolonas y/o productora de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Manges, 2016).

Existen ciertas características que se han observado dentro de las cepas ST131: el serogrupo (O25:H4 o O16:H5), variante alélica de *fimH*, susceptibilidad a fluoroquinolonas y presencia de BLEE; que ha permitido clasificar a las cepas con

esta secuencia tipo en diferentes clados; el clado A, está asociado principalmente con *fimH41*, el clado B con *fimH22* y el clado C con *fimH30* (Pitout & DeVinney, 2017). Dentro del clado C se encuentran tres subclados: en el C0 se encuentran a los aislados sensibles a fluoroquinolonas; dentro de los subclados C1 y C2, se encuentran los aislados resistentes a fluoroquinolonas debido a mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*; y además, portan alguna BLEE; en el subclado C1 o R1, se ubican cepas que portan CTX-M-14 o CTX-M-27 y en C2 o Rx se caracterizan por portar CTX-M-15 (Johnson *et al.*, 2016; Pitout & Finn, 2020). Sin embargo también se ha descrito que las cepas de *E. coli* ST131, pueden portar genes de carbapenemasas como *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}* y *bla_{OXA-48}* (Chang *et al.*, 2019).

Las cepas ST131 también pueden ser clasificadas de acuerdo a los factores de virulencia que poseen, lo que se denomina virotipo, inicialmente Blanco *et al.*, en 2013, clasificaron estas cepas en 4 virotipos (A a D), con base a la presencia o ausencia de cuatro genes: 1) *afa* FM955459, una adhesina *afa/dr*, 2) *iroN*, sideróforo catecolato de receptor, 3) *ibeA*, una invasina del endotelio cerebral y 4) *sat*, toxina secretada autotransportadora; en la actualidad se conocen 7 virotipos (A a G) basados en la presencia o ausencia de 11 genes asociados a virulencia encontrados en cepas ST131 (cuatro genes antes mencionados más, alelo *papGII*, adhesina de fimbria P; *cnf1*, factor citotóxico necrotizante; *hlyA*, alfa hemolisina; alelo *papGIII*, adhesina de fimbria P; *cdtB*, toxina citoletal distendida y *neuC-K1*, variante de cápsula K1 del grupo II) (Barrios *et al.*, 2018).

1.4 Tratamiento y resistencia a los antibióticos en ITU

El tratamiento de las ITU depende del fenotipo de susceptibilidad de cada cepa y de las características propias del paciente, de manera general se ha recomendado para el tratamiento de primera opción a la nitrofurantoína, fosfomicina (FOS) y trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMZ) individualmente (Kot, 2019). El uso inapropiado de antibióticos ha creado una presión selectiva en los microorganismos y ha permitido a estos desarrollar mecanismos de resistencia a los fármacos limitando las opciones terapéuticas para el tratamiento de las ITU; esto se ha visto fortalecido con la diseminación de genes de resistencia a través de elementos genéticos móviles como son los plásmidos. Se ha documentado la difusión de genes asociados a resistencia a antimicrobianos como BLEE, β -lactamasas AmpC y metalo- β -lactamasas mediadas por plásmido (Jahandeh *et al.*, 2015).

El uso inapropiado de antibióticos ha creado una presión selectiva en los microorganismos y ha permitido a estos desarrollar mecanismos de resistencia a los fármacos limitando las opciones terapéuticas para el tratamiento de las ITU; esto se ha visto fortalecido con la diseminación de genes de resistencia a través de elementos genéticos movilizables como son los plásmidos. Se ha documentado la difusión de cepas UPEC productoras de BLEE, β -lactamasas AmpC y metalo- β -lactamasas mediadas por plásmido (Jahandeh *et al.*, 2015).

Las BLEE se caracterizan por conferir a las bacterias resistencia contra penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación y a monobactámicos

(aztreonam); sin embargo, son sensibles a cefamicinas y carbapenémicos y son inhibidas por el ácido clavulánico. Los genes *bla* encontrados más frecuentemente son los *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}; este último ha adquirido especial significancia en su subtipo CTX-M-15, por ser la más distribuida en el mundo (Galindo, 2018). La cefotaximasa CTM-X-15 está asociada a infecciones extraintestinales causadas por *E. coli* ST131, y en la mayoría de los casos es transferida por plásmidos que portan genes que confieren resistencia a fluoroquinolonas en infecciones de inicio comunitario (Chang, *et al.*, 2019); otras secuencias tipo relacionadas con resistencia a antibióticos son la ST405 y ST648 (da Cruz Campos *et al.*, 2020).

Las β -lactamasas AmpC tienen un espectro más amplio de resistencia que aquellas que producen BLEE; estas enzimas como la CMY-2, son capaces de hidrolizar y neutralizar casi todas las β -lactámicos y no son inhibidas por el ácido clavulánico (Hoepers *et al.*, 2018). Su mecanismo de acción puede ser dividido en tres categorías: 1) resistencia inducible a través de genes *ampC* codificados cromosómicamente (p. Ej., *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras.), 2) resistencia cromosómica no inducible debido a mutaciones del promotor y/o atenuador (p. Ej., *E. coli*, especies de *Shigella*, *Acinetobacter baumannii*), 3) resistencia mediada por plásmidos (p. Ej., *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, especies de *Salmonella*, etc.) (Tamma *et al.*, 2019).

Otro determinante emergente de resistencia en Gram negativos es la presencia de metalo- β -lactamasas, descritas por primera vez en Suecia en 2008, y que ha llamado la atención por hidrolizar a todos los antibióticos β -lactámicos con excepción del aztreonam (Pruthvishree *et al.*, 2017). De la Nueva Deli Metalo- β -lactamasa (NDM-1), han surgido otras variantes NDM-2, NDM-3, NDM-4 y NDM-5 en *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* y otros microorganismos no fermentadores (Khan & Zarrilli, 2017).

La resistencia a los antimicrobianos no solo se ha limitado a los β -lactámicos, sino que también se han encontrado genes asociados a la resistencia contra sulfonamidas (*sul1*, *sul2* y *sul3*) generalmente codificados en plásmidos; de manera similar, la resistencia a los aminoglucósidos también está relacionada con genes transportados por plásmidos, los genes *aph(3')-Ia*, *aac(3)-II*, *aac(3)-IV* y *aadB* están relacionados con la resistencia a kanamicina, y los últimos tres a gentamicina. La resistencia a las fluoroquinolonas también puede verse facilitada por los plásmidos que portan genes que codifican la proteína Qnr (QnrA, QnrB, QnrS), que protege las dianas antibióticas del tratamiento con quinolonas (Adamus-Białek *et al.*, 2018). También se han descrito genes asociados a resistencia a nitrofurantoína *nsfA* y *nsfB* (reductasas) y bombas de eflujo *oqxAB* codificadas en plásmidos; la resistencia a fosfomicina se ha relacionado con la presencia de genes *fosA*, *fosB* y *fosX*; la resistencia a tetraciclinas mediada por plásmidos está dada por genes de la oxidorreductasa codificada por el gen *tetX* y bombas de eflujo, *tetA-E*, *G*, *J*, *L*, *Y* (Nolan *et al.*, 2015).

En la tabla 3 se muestran los principales genes de resistencia a antimicrobianos reportados en diferentes estudios de cepas UPEC.

Tabla 3. Genes de resistencia a antimicrobianos más frecuentes en UPEC

| Antibiótico | Genes de resistencia a antibiótico |
|-----------------------|---|
| β-lactámicos | <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-7} , <i>bla</i> _{PSE-4} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CMY} , |
| Cloranfenicol | <i>cat1</i> , <i>cmlA</i> |
| Fosfomicina | <i>fosA</i> , <i>fosB</i> y <i>fosX</i> |
| Gentamicina | <i>aac(3)-IIA</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>aadB</i> |
| Kanamicina | <i>aph(3')-Ia</i> |
| Quinolonas | <i>qnrA</i> , <i>B</i> , <i>S</i> |
| Estreptomicina | <i>aadA1</i> , <i>ant(3'')-IIa</i> |
| Sulfonamidas | <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> |
| Tetraciclinas | <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(C)</i> , <i>tet(D)</i> , <i>tet(X)</i> |
| Nitrofuranos | <i>nsfA</i> , <i>nsfB</i> , <i>oqxAB</i> |
| Trimetoprim | <i>dhfr1</i> , <i>dhfrVII</i> |

Tabla tomada de Jahandeh *et al.*, 2015; Nolan, 2015; Adamus-Bialek, 2018

La diseminación de estos determinantes de resistencia se ha visto favorecida debido a la presencia de elementos genéticos móviles/movilizables (EGM) los cuales pueden fungir como facilitadores del intercambio de estos genes. Esta movilidad puede ser a nivel intracelular como intercelular; esta última se lleva a cabo mediante mecanismo de conjugación, transducción o transformación (Partridge, *et al.*, 2018).

Los EGM más predominantes detectados son las secuencias de inserción (IS, por sus siglas en inglés, *insertion sequence*) aunque por sí solas no acarrean genes de resistencia a antimicrobianos participan en el movimiento de estos como parte de los transposones compuestos (comTn, por sus siglas en inglés, *composite transposon*); una de las IS frecuentemente encontrada y asociada a genes de resistencia es IS26 en Gram negativos (Partridge, *et al.*, 2018). Los transposones por sí solos (transposón simple) pueden portar el gen asociado a resistencia, estos pueden desplazarse de un plásmido a otros y a menudo se asocian a integrones, aunque estos últimos pueden encontrarse de manera independiente dentro del plásmidos (El-Najjar *et al.*, 2010). Los integrones son otros elementos que participan en la multidrogo resistencia (MDR) en *E. coli*, la estructura versátil de este le permite adquirir nuevos genes e integrarlos a través de recombinación. Se han descrito tres clases de integrones, la clase 1 es la más diversa y frecuentemente encontrada en aislados clínicos, los de clase 2 tienen menor diversidad y prevalencia y están distribuidos en aislados ambientales, por último, los de clase 3 son encontrados con baja frecuencia y asociados a MDR en menor tasa (Khan, *et al.*, 2018).

Los principales EGM asociados a la diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos, son los plásmidos, estos han sido definidos como fragmentos extracromosomales de ácido desoxirribonucleico (ADN) que pueden replicarse usando las proteínas replicativas del hospedero y que pueden transferirse entre especies bacterianas (Douarre *et al.*, 2020). Dentro de estos destacan los plásmidos conjugativos, estos deben portar la maquinaria necesaria para la conjugación: 1) una secuencia que codifica para el origen de transferencia, *oriT*, 2) relaxasa, que corta el DNA y lo une al *oriT*, 3) sistema de secreción tipo 4, responsable del apareamiento y la transferencia de ADN y 4) proteína acopladora de la maquinaria intracelular con el sistema de secreción (Dionisio *et al.*, 2019) y pueden servir como plataformas de otros EGM como secuencias de inserción, transposones

compuestos e integrones (Int) que pueden portar algún gen de resistencia a antimicrobianos.

Los plásmidos pueden ser clasificados usando esquemas típicos basados en su aparato de replicación o movilización (replicón o MOB). El termino replicón se refiere a una secuencia de ADN que puede replicarse como una unidad o bien puede ser entendido como la región específica o genes que codifican funciones que hacen capaz la replicación. Entre plásmidos sí comparten uno o más elementos de la replicación (mismo origen de replicación o el mismo replicón) o sistemas de partición, no pueden coexistir de manera estable en una célula y se definen como incompatibles. Con base a esto se clasifican en grupos de incompatibilidad (Inc) (Douarre *et al.*, 2020). A la fecha se conocen 27 grupos de incompatibilidad asociados a genes asociados a resistencia a antimicrobianos en *Enterobacteriaceae*; dentro de los cuales el más prevalente grupo de incompatibilidad es el IncF el cual ha sido reportado en diferentes tipos fuentes de aislamiento alrededor del mundo (Kopotsa *et al.*, 2019). IncF e IncI1 han sido reportados como promotores de diseminación de β -lactamasas, específicamente de CTX-M-15 y CMY-2, y otros genes de resistencia a carbapenémicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas, en aislados tanto clínicos como fecales (Brown-jaque *et al.*, 2020; Kalová *et al.*, 2021), el plásmido F (IncF) además de ser el más común encontrado, en aislados comensales, también ha sido asociado con la evolución de las cepas ST131 (Stephens, *et al.*, 2020). IncI2, IncX4 e IncP han sido relacionados como acarreadores con *mcr-1*, que confiere resistencia a colistina (Kalova, *et al.*, 2021). Además los plásmidos pueden servir como plataformas de otros EGM como secuencias de inserción, transposones compuestos e integrones (Int) que pueden portar algún gen de resistencia a antimicrobianos.

2. ANTECEDENTES

Alrededor del mundo se han realizado estudios usando la detección de factores de virulencia para definir a UPEC, complementando esta caracterización con la búsqueda de las PAI's de las cepas prototipo UPEC y evaluando la sensibilidad de los aislados. Dentro de estos estudios podemos destacar los siguientes:

2.1 Antecedentes generales

En Iran, en 2018, Najafi et al., estudiaron los factores de virulencia *fimH* (adhesina de pili tipo 1), *papG I, II, III* (variantes alélicas de adhesina de fimbria P), *papC* (proteína Usher del pili P); *afa/draBC* (adhesina fimbrial Dr) , *sfa/focDE* (fimbrias S/F1C), *cnf-1* (factor necrotizante citotóxico 1), *hlyA* (hemolisina), *iucC* (sintasa del sideróforo aerobactina), *kpsMI* (Proteína transportadora de ácido polisialico de cápsula tipo 2), *I, neuC* (biosíntesis de ácido siálico), *traT* (proteínas de la membrana externa de resistencia a la respuesta del inmune del hospedero (complemento) e *ibeA* (toxina de invasión del endotelio cerebral) y presencia de PAI's de 140 cepas aisladas de pacientes con ITU además de la determinación de filogrupo; encontraron de manera predominante entre los aislados a *fimH* 85%, *iucC* 61.4%, *papC* 38.6%. Las PAI's de mayor prevalencia fueron la PAI-IV 536 (77.1 %) y la PAI-I CFT073 (40.7 %); el filogrupo con mayor prevalencia fue B2(39.3%). Al encontrar a *fimH* y *iucC* como principales factores de virulencia en los aislados, se destaca su participación en el proceso de adhesión y captación de nutrientes para el establecimiento de UPEC en el tracto urinario, se relaciona la presencia de PAI's, factores de virulencia y el filogrupo B2. El grupo filogenético B2 tuvo la mayor frecuencia con respecto tanto a los genes de virulencia como a los marcadores PAI en comparación con otros grupos filogenéticos

En Jordania, en 2019, Shakhathreh et al., investigaron genes no buscados de manera usual, definidos como no arquetípicos: *sivH* (proteína invasiva putativa), *shiA* (homólogo de supresor de respuesta inmune del hospedero de *Shigella flexneri*), *sisA* (proteína moduladora del sistema de defensa del hospedero durante una ITU en cepas extraintestinales), *sisB* (proteína moduladora del sistema de defensa del hospedero en cepas intestinales), *eco274* (asociado a ITU, pero su papel en estas es desconocido) en 227 cepas provenientes de pacientes con ITU, además de los perfiles de susceptibilidad de estas, los genes de mayor prevalencia fueron *shiA* 92.1%, *sisA* 72.2% y *eco274* 43.6%; el 49.8 % de los aislados fueron productores de BLEE (datos no mostrados). Además, los autores proponen clasificar a un aislado como UPEC si porta tres o más de los factores de virulencia buscados: *sivH*, *shiA*, *sisA*, *sisB*, *eco274*, *chuA* (receptor de hierro tipo hemo), *yfcV* (subunidad principal de fimbria Yfc), *vat* (toxina autotransportadora vacuolante) y *fyuA* (receptor de yersiniabactina), encontrando que el 67.4 % de los aislados cumplía con este requisito, con base a este resultado los autores atribuyen esta ausencia en algunas cepas debido a la variabilidad de la respuesta inflamatoria en los pacientes con ITU.

En India, en 2019, Ghosh & Mukherjee, realizaron una comparación del perfil de virulencia: *fimH* (adhesina de pili tipo 1), *papC* (proteína Usher del pili P); *papEF* (subunidades de pili P) *papG I, II, III* (variantes alélicas de adhesina de fimbria P), *sfa* (fimbria S), *afa* (adhesina fimbria Dr), *cnf-1* (factor necrotizante citotóxico 1), *hlyA* (alfa hemolisina), *cdtB* (toxina citoletal distendida), *iucD* (sideróforo aerobactina), presencia de PAI's y perfil de susceptibilidad entre 20 cepas de orina de pacientes asintomáticos y 20 cepas de orina de pacientes sintomáticos de ITU; se evidenció que en ambos tipos de cepas el gen *fimH* estuvo en todas las cepas, seguido de *iucD* (85 y 75%) como los factores de virulencia de mayor prevalencia; las PAI's más frecuentemente encontradas en ambos tipos de cepas fueron la PAI-I 536 y PAI-II 536. En el perfil de susceptibilidad a los antibióticos se evidenció que el 95% de las cepas provenientes de pacientes asintomáticos fue multidrogo-resistente (MDR) y en las del segundo grupo el 100% fue MDR. Con base a los resultados observaron que ambos tipos de aislados tuvieron un potencial de virulencia y perfil de susceptibilidad a antibióticos similar.

En Venezuela, en 2020, Millán et al., estudiaron en 17 cepas, los genes de los factores de virulencia: *fimH* (adhesina de tipo 1), *papAH* (subunidades de pili P), *usp* (proteína uropatógena específica), *fyuA* (receptor de yersiniabactina) y *kpsMIII* (Proteína transportadora de ácido polisialico de cápsula tipo 2), la presencia de la región terminal codificante asociada a la PAI CFT073: *malX* (marcador de islas de patogenicidad, codifica para un sistema de enzimas fosfotransferasas) y la susceptibilidad a los antibióticos con búsqueda de BLEE (β -lactamasas de espectro extendido) y KPC (Carbapenemasas tipo KPC), además de la distribución en los diferentes filogrupos; encuentran con mayor frecuencia los genes *fimH* y *fyuA* 82 %, seguido de *usp* 53%. El marcador de PAI-*malX* se encontró en 41% de los aislados, todos los aislados fueron productores de BLEE y el 41% fue productor de KPC. El 41% de los aislados se encontró dentro del filogrupo B2. Los autores concluyen que la diversidad de asociaciones entre genes de virulencia y perfiles de resistencia, en las cepas UPEC se mantienen en constante cambio y que además la distribución de estos en los grupos filogenéticos depende en gran medida de las características epidemiológicas de cada población.

En España, en 2020, Flament-Simon et al., estudiaron los factores de virulencia usados para definir a un aislado como *E. coli* extraintestinal (ExPEC): *papAH* y/o *papC* (subunidades de pili P), *sfa/focDE* (fimbrias S/F1C), *afa/draBC* (adhesina fimbrial Dr), *iutA* (receptor de aerobactina), *kpsMIII* (Proteína transportadora de ácido polisialico de cápsula tipo 2) en 151 cepas de *E. coli* aislada de heces de perros sanos y 46 aislados de *E. coli* de orina humana proveniente de pacientes con ITU, ambos tipos de cepas ST372, además caracterizan a las cepas con la presencia de *chuA* (receptor de hierro tipo hemo), *yfcV* (subunidad principal de fimbria Yfc), *vat* (toxina autotransportadora vacuolante) y *fyuA* (receptor de yersiniabactina) (3 o 4 de estos factores) como UPEC. Con base a la presencia de los genes antes mencionados clasifican al 75% de los aislados de perro y al 22% de cepas humanas como ExPEC; sin embargo, el 100% de ambas cepas se clasificaron como UPEC. Este estudio relaciona aislados de *E. coli* canina y *E. coli* humana dentro una misma

ST, se observó que el tracto gastrointestinal de los perros también puede fungir como reservorio de cepas ExPEC y/o UPEC y podrían ser un reservorio potencial de genes de resistencia a antimicrobianos.

En Brasil, en 2021, Nascimento et al., evaluaron el potencial “uropatogénico” de 9 cepas híbridas [7 UPEC-EAEC (*aagR*) y 2 UPEC-aEPEC (*eae*)] aisladas de pacientes con ITU mediante los marcadores *chuA* (receptor de hierro tipo hemo), *yfcV* (subunidad principal de fimbria Yfc), *vat* (toxina autotransportadora vacuolante) y *fyuA* (receptor de yersiniabactina), encontrando que el 66% portaba *fyuA*, el 11.1% portó *chuA-fyuA* y el 22.2% no portó ningún marcador, por lo que concluyen que estos marcadores no deben considerarse universales.

En California, en 2019, Tarltona et al., estudiaron genótipicamente 273 cepas de *E. coli* uropatogena, determinando su fenotipo de susceptibilidad, secuencia tipo, genes de resistencia a antimicrobianos y tipos de plásmidos, encuentran el 31% (85 cepas) resistentes a ampicilina, estas se encontraron distribuidas en las ST69 y ST404, los plásmidos con mayor frecuencia fueron IncFIB, IncFIA e IncB/O que se encontraron asociados a resistencia a β -lactámicos. El 66% de los genes de resistencia adquiridos se localizaron en los plásmidos con replicones F y el 10% en plásmidos con replicones del complejo I, 19% de estos genes estaba codificada en el cromosoma. Se denota el papel de los plásmidos F en la diseminación de la resistencia a antimicrobianos.

En California, en 2020, Stephens et al., describieron la prevalencia de plásmidos F en 101 genomas de *E. coli* de heces de humanos sanos, así como los genes asociados a resistencia a los antimicrobianos que estos portan así como su contexto genético para evaluar el potencial de movilidad dentro del genoma, se detectaron 154 plásmidos, de 123 genes asociados a resistencia a antimicrobianos detectados, 103 (83.7%) estaban localizados en este tipo de plásmido (FIB y FII), determinaron el contexto genético de estos genes, *bla*_{TEM-1} se encontró siempre en Tn2, *tetA* (bomba de eflujo de tetraciclina) en Tn1721, *tetB* (bomba de eflujo de tetraciclina, doxiciclina y minociclina), en Tn10, entre otros. Con base a los resultados asociaron este tipo de plásmido como acarreador de genes asociados a resistencia a antimicrobianos entre los genomas comensales

2.2. Antecedentes directos

En México, en 2019, Paniagua et al., realizaron una búsqueda *in silico* de factores de virulencia y genes asociados a resistencia a antimicrobianos en 24 genomas secuenciados, encontrando que los genes comunes entre los genomas son los asociados a curlis (*csg*), fimbria tipo 1 (*fim*), genes de motilidad y quimiotaxis (*che*, *fig*, *fli*, *mot*), sideróforo enterobactina (*ent*) (100%), pili común de *E. coli* (*ecp*) y *ompA* (proteína de membrana externa) (96%). Los genes asociados a resistencia a antimicrobianos más frecuentes fueron *strA* (fosfoesterasa de aminoglucósidos, APH(3'')-Ib), *strB* (fosfoesterasa de aminoglucósidos, APH(6)-Id), *bla*_{TEM1B} (betalactamasa tipo TEM) y *sul2* (dihidropteroato sintasa). Este fue el primer análisis genómico de un conjunto de cepas UPEC provenientes de México, fue le primer

estudio que permitió vislumbrar la distribución epidemiológica de los genes asociados a virulencia y resistencia a antimicrobianos en las cepas UPEC.

En México, en 2020, Ballesteros *et al.*, estudiaron la prevalencia de factores de virulencia: *fimH* (adhesina de tipo 1), *papA* (subunidad de pili P) y/o *papGII* y *GIII* (variantes alélicas de adhesina de pili P), *iha* (adhesina regulada por hierro), *vatA*, *vatP*,), *cnf-1* (factor necrotizante citotóxico 1), *hlyA* (alfa hemolisina), *iucD* y *fliC*) y el perfil de susceptibilidad de cepas provenientes de ITU's en dos estados de la república mexicana (Puebla: 50 cepas y Sonora: 100 cepas), de pacientes embarazadas y no embarazadas. Se evidenció que en ambas regiones el gen *fimH* (100%) y *iucD* (>70%) son los de mayor prevalencia en ambas poblaciones; en el perfil de susceptibilidad se encontró que 92.7% era MDR, 6.7% extensivamente drogo-resistentes (XDR) y el 0.6% pandrogo-resistente (PDR) en el total de cepas estudiadas. Se observó que una parte importante de las cepas provenientes de mujeres embarazadas tenían las características de virulencia para trascender a una ITU más severa.

3. JUSTIFICACIÓN

E. coli es considerado el patógeno primario de infección de vías urinarias, y se ha propuesto que la cepa causante proveniente de la microflora fecal llega al tracto urinario a través de la vía fecal-perineal-uretral. Aunque se sugieren otros orígenes diferentes al nicho intestinal, el origen fecal de la cepa causante de ITU continúa siendo uno de los más aceptados.

Caracterizar y comparar los marcadores moleculares de virulencia y resistencia que portan las cepas tanto de origen urinario como de origen fecal, así como indagar sobre la existencia de los elementos genéticos móviles que pudieran contener, proporcionará información sobre el potencial genómico que poseen este tipo de cepas para poder adaptarse a diferentes nichos.

4. OBJETIVO GENERAL

Objetivo estudio experimental

Caracterizar y comparar los marcadores moleculares de virulencia y resistencia, así como la presencia de plásmidos en cepas de *E. coli* aisladas de orina y heces de la misma paciente embarazada.

Objetivo *in silico*

Comparar el viruloma, resistoma y mobiloma en genomas completos de *E. coli* uropatogénica y *E. coli* comensal, depositados en la base de datos del *GenBank*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivos estudio experimental

1. Determinar el fenotipo de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *E. coli* aisladas a partir de orina y heces de la misma paciente embarazada.
2. Determinar el fenotipo de producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) de las cepas de *E. coli*.

Debido a la contingencia sanitaria ocasionada por la pandemia de SARS-CoV2, no se pudo alcanzar el cumplimiento de los objetivos experimentales planteados en el protocolo original, por lo que el proyecto se redirigió hacia un estudio *in silico* mediante el uso de herramientas bioinformáticas, replanteando otros objetivos, que son los siguientes:

Objetivos *in silico*

1. Determinar el serotipo, filogrupo y secuencia tipo (ST) de los genomas completos de cepas uropatogénicas y comensales de *E. coli* depositados en la base de datos del *GenBank*.
2. Comparar el tamaño de los genomas y el contenido de genes de virulencia y resistencia de ambas poblaciones.
3. Determinar los factores de virulencia e islas de patogenicidad, dentro de los genomas de las cepas de *E. coli* uropatogénica y *E. coli* comensal.
4. Investigar genes asociados a resistencia a antibióticos presentes en los genomas de las cepas de estudio.
5. Investigar los elementos genéticos móviles/movilizables presentes dentro de las cepas uropatogénicas y comensales de *E. coli*.

6.CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

6.1 Genomas UPEC

Criterios de inclusión:

- Fuente de aislamiento, orina humana
- Con síntomas clínicos asociados a ITU o sin sintomatología de ITU pero asociada a bacteriuria asintomática, según el bioproyecto.
- Genomas completos de *E. coli*
- Acceso disponible en *GenBank*
- Genomas en la base de datos hasta el 31/Diciembre/2020

Criterios de exclusión:

- Cepas de fuentes no humanas (animales) y otros orígenes
- Cepas provenientes de Síndrome Urémico Hemolítico
- Genomas incompletos y no cerrados
- Genomas agregados después del 31/Diciembre/2020

6.2 Genomas Comensales

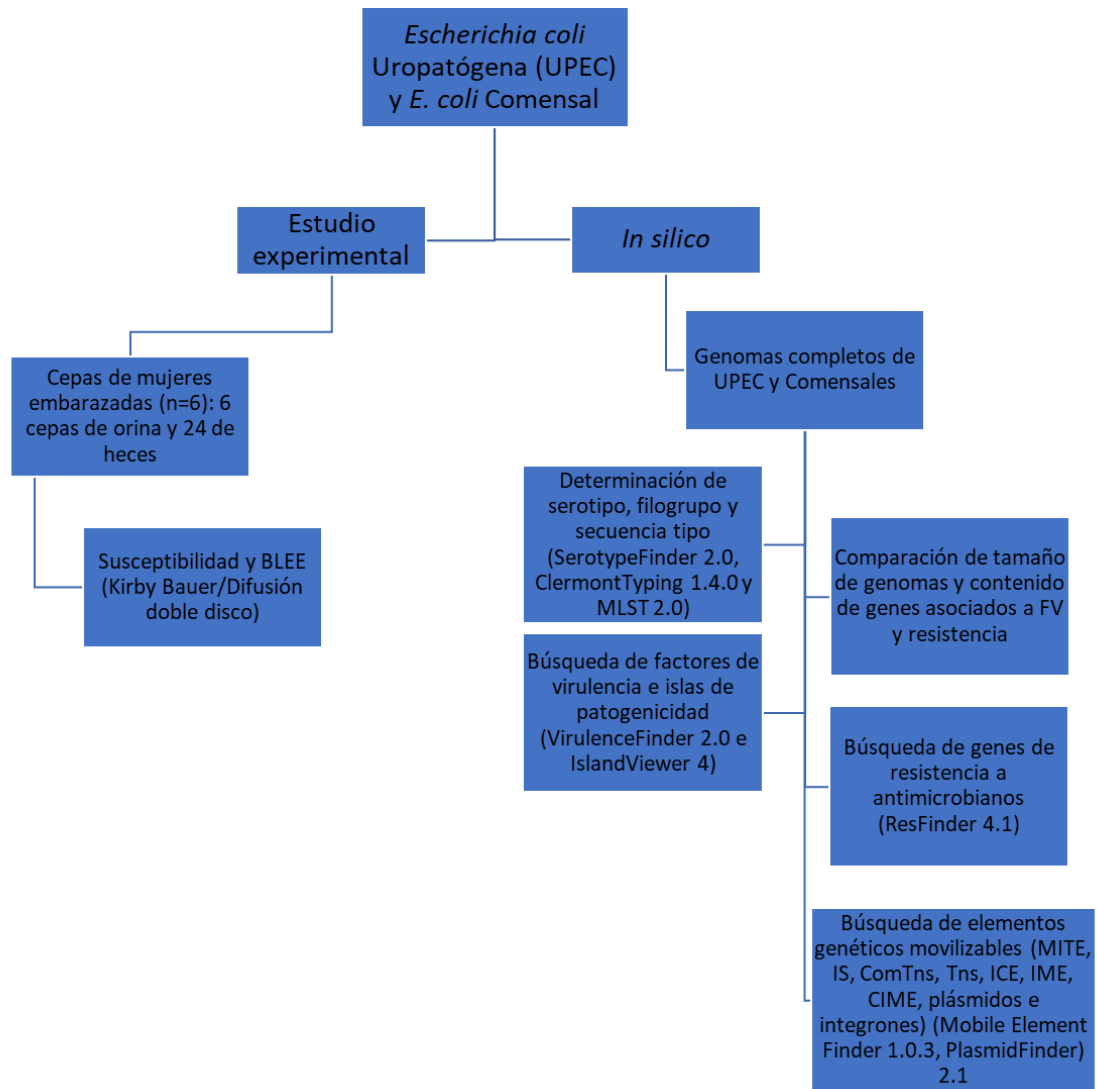
Criterios de inclusión:

- Fuente de aislamiento, heces humanas e hisopados rectales
- Individuos sanos, según el bioproyecto
- Genomas completos de *E. coli*
- Acceso disponible en *GenBank*
- Genomas en la base de datos hasta el 31/Diciembre/2020

Criterios de exclusión:

- Cepas de fuentes no humanas (animales) y otros orígenes
- Cepas de pacientes hospitalizados
- Genomas incompletos y no cerrados
- Genomas agregados después del 31/Diciembre/2020

7. ESTRATEGIA METODOLÓGICA



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Estudio experimental

8.1.1 Recolección de muestras biológicas y aislamiento de *E. coli*

A través de las unidades medico familiares 7, 20 y 28 del Instituto Mexicano del Seguro Social, del Estado de México, se captó un total de 95 pacientes embarazadas de entre 16 a 40 años de edad diagnosticadas con infección de vías urinarias, a las que se les solicitó una muestra de orina y un hisopado rectal, recolectadas durante el periodo de mayo de 2015 a diciembre de 2017.

Se recolectaron 19 muestras de orina y 82 muestras de hisopado rectal; de estas muestras (101) se aislaron un total de 126 cepas de *E. coli*: 20 cepas provenientes de orina y 106 provenientes de heces (Figura 1). Se aislaron de 4 a 7 subclonas de *E. coli* por muestra de heces proporcionada y de orina solamente se aisló una cepa por paciente, con excepción de una muestra de orina de la cual se aislaron dos cepas de *E. coli*.

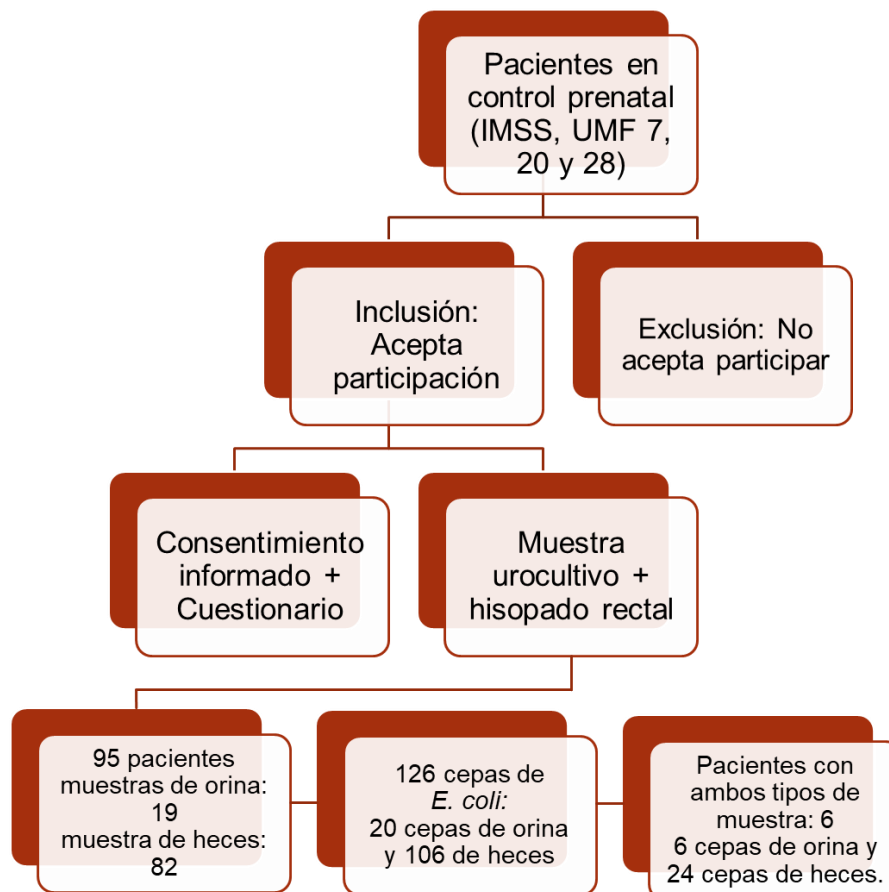


Figura 1. Desarrollo de selección de muestras biológicas. Se describe desde la captación de las pacientes embarazadas a través de las unidades de medicina familiar (UMF) hasta la obtención de las cepas de estudio.

La identificación original de *E. coli* se realizó en las Unidades Familiares del IMSS mediante el sistema automatizado VITEK. Posteriormente, las clonas fueron enviadas al Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad donde fueron re-identificadas mediante las pruebas bioquímicas convencionales tomando en consideración los criterios de Cohen y Steel (Mc faddin, 2003) para género y especie. Para las cepas que tuvieron algunas variaciones en las bioquímicas convencionales, se confirmó el género y especie mediante PCR por amplificación del gen *uidA* que codifica para la enzima glucoronidasa (Ben Sallem et al., 2014) y el gen *ybbw* que codifica para un transportador de la enzima alantoína (Walker et al., 2017).

De acuerdo con los objetivos se seleccionaron las cepas de orina y las clonas de heces que cumplieron con el criterio de provenir de la misma persona ambos tipos de muestra, quedando un total de 6 cepas provenientes de orina y 24 cepas de origen fecal, pertenecientes a 6 pacientes. Cabe mencionar que fueron más cepas de heces debido a que por muestra, se seleccionaron de 4 a 7 colonias de *E. coli* que presentaron diferente morfología colonial en su desarrollo. La tabla 4 muestra las cepas pareadas entre las cepas aisladas de orina y de heces por paciente.

Tabla 4. Cepas de *E. coli* aisladas de orina y heces de cada una de 6 pacientes que se analizaron en el estudio

| PACIENTE | CEPA ORINA | CEPA(S) HECES |
|----------|------------|--|
| 1 | 1-O | 1-H |
| 2 | 2-O | 2-H |
| 3 | 3-O | 3-H1 3-H2 3-H3 3-H4 3-H5 3-H6 |
| 4 | 4-O | 4-H1 4-H2 4-H3 4-H4 4-H5 4-H6 |
| 5 | 5-O | 5-H1 5-H2 5-H3 5-H4 5-H5 5-H6 5-H7 5-H8 |
| 6 | 6-O | 6-H1 6-H2 |

8.1.2 Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos

A partir de un cultivo puro de 24 horas en agar tripticaseína de soya (TSA, por sus siglas en inglés) se tomaron unas colonias aisladas y se re-suspendieron en 3 mL de solución salina isotónica (SSI) estéril al 0.85% (masa/volumen) de NaCl, ajustando a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). Con un hisopo de algodón estéril impregnado de la suspensión bacteriana, se inocularon las placas de agar Müller-Hinton empezando en la parte superior de la placa, deslizando el hisopo sobre la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 45° cada vez y pasándolo por último sobre la periferia de la placa para conseguir un crecimiento uniforme. Se colocaron en el agar inoculado los discos con antibióticos. Se probaron 17 antibióticos AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, FEP: cefepime, IMP: imipenem, MEM: meropenem, AN: amikacina, GM: gentamicina, CIP: ciprofloxacino, NA: ácido nalidixico, FOS: fosfomicina, F/M: nitrofurantoína, STX: trimetoprim-sulfametoxazol, C: cloranfenicol, TE: tetraciclina. Se incubaron las placas de 18 h a 24 h a 37°C . Finalmente, se midieron los halos de inhibición y se interpretaron los resultados de acuerdo con los lineamientos establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019). *E. coli* ATCC 25922 se usó como cepa control.

8.1.3 Producción fenotípica de BLEE

Para las cepas resistentes a cefalosporinas de amplio espectro se les determinó la producción fenotípica de BLEE mediante la técnica de difusión con doble disco, usando discos de cefotaxima (30 μg), ceftazidima (30 μg), aztreonam (30 μg) y cefepime (30 μg); que se colocaron en las proximidades de un disco central de amoxicilina con ácido clavulánico (20/10 μg) a una distancia de 25 mm (extremo-extremo). La aparición de un efecto sinérgico (prolongación del halo de inhibición) entre los antibióticos β -lactámicos y el disco central que contiene al inhibidor de β -lactamasas (ácido clavulánico) fue considerado como resultado positivo de producción de BLEE.

8.2 Análisis *in silico*

Debido a la contingencia sanitaria por la pandemia provocada por el SARS-CoV-2, las instalaciones de la Universidad han permanecido cerradas desde marzo del 2019, por lo que el protocolo de investigación se redirigió hacia un estudio *in silico*, mediante ensayos bioinformáticos dirigidos a determinar el viruloma, resistoma y mobiloma en genomas completos de *E. coli* uropatógena y *E. coli* comensal, depositados en la base de datos del GenBank.

8.2.1 Búsqueda de genomas completos en base de datos del *GenBank*

A través de la base de datos GenBank del National Institutes of Health (NIH) y disponible en el sitio del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se realizó la búsqueda de genomas completos de *E. coli* uropatogénica y *E. coli* comensal, aplicando los filtros de Assembly level: Complete, Partial: Exclude Partial y Host: Human y con fecha de corte al 31/diciembre/2020.

8.2.2 Análisis de tamaño y contenido de genes

Para el análisis estadístico del tamaño y contenido de los genomas se usó Microsoft Excel 365, desde la opción análisis de datos, a través de la prueba *t* para dos muestras suponiendo varianzas desiguales, por la cual se obtuvo la diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

8.2.3 Búsqueda de Factores de virulencia

Se empleó la base de datos Virulence Finder 2.0 (VF) del centro genómico epidemiológico (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>), eligiendo como microorganismo de estudio dentro del menú a *E. coli*; se empleó un porcentaje de identidad de $\geq 90\%$ con una cobertura de $\geq 60\%$.

De manera complementaria se realizó la identificación de genes de virulencia con la base de datos Virulence Factor Data Base (VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi?func=VFAnalyzer>), ingresando el genoma anotado en formato FASTA para la sumisión del archivo a analizar, llenando los campos de: Género y Nombre de la cepa.

8.2.4 Determinación de variantes alélicas de *papG*

Las secuencias empleadas se obtuvieron mediante la detección del gen *papG* por la herramienta VFDB. Para conocer las variantes alélicas del gen *papG*, se realizó el análisis filogenético a través de la herramienta Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr/advanced.cgi>), la cual realiza un árbol filogenético (100 bootstraps) con el alineamiento múltiple (MUSCLE). Se usó como control para la variante *papGI* la secuencia del genoma J96 (ELL40467.1), *papGII* la secuencia del genoma CFT073 (AE014075.1: orf03326) y para *papGIII* la secuencia del genoma UTI89 (CP000243.1: orf04563).

8.2.5 Búsqueda de genes asociados a resistencia a antibióticos

Se usó la herramienta bioinformática ResFinder 4.1 del centro genómico epidemiológico (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). Se eligió la opción de

búsqueda de mutaciones cromosómicas y genes asociados a resistencia a antimicrobianos adquiridos; se empleó un porcentaje de identidad de $\geq 90\%$ con una cobertura de $\geq 60\%$ en ambos casos.

8.2.6 Búsqueda de Islas de patogenicidad

Se realizó la búsqueda de cada uno de los marcadores contenidos en las PAI's a través de VF y VFDB; los marcadores que no estaban contenidos en estas herramientas se buscaron de manera manual a través de xblast [*prsG* (adhesina de fimbria Prs): CAA44089.1, *f17* (adhesina tipo fimbria F17): WP_000695740, *pfrX* (Regulador transcripcional de fimbria relacionada a pili P): CAD42022.1 y *hmuR* (receptor de hierro tipo hemo): CAD66184.1). Se verificó que los genes se encontrarán en una misma región del cromosoma y que $\geq 50\%$ de los genes estuvieran presentes para tomar como positiva la presencia de la correspondiente PAI. En la tabla 5 se detallan los marcadores buscados para cada isla de patogenicidad.

Tabla 5. Islas de Patogenicidad de cepas prototipo UPEC, su contenido génico y el gen usado para su búsqueda en paréntesis.

| Cepa prototipo | PAI | Factores codificados |
|----------------|---------|--|
| CFT073 | PAI I | α -hemolisina (<i>hlyA</i>), fimbria P (<i>papC</i>) y aerobactina (<i>iutA</i>), Iha (<i>iha</i>), Ag43 (<i>ag43</i>), cápsula K2 (<i>kpsMII</i>) |
| | PAI II | Fimbria P (<i>papC</i>) y genes reguladores de hierro (<i>ireA</i>), Sat (<i>sat</i>) |
| J96 | PAI I | α -hemolisina (<i>hlyA</i>) y fimbria P (<i>papC</i>) |
| | PAI II | α -hemolisina (<i>hlyA</i>), fimbria Prs (<i>prsG</i>), factor necrotizante citotóxico (<i>cnf1</i>) |
| 536 | PAI I | α -hemolisina (<i>hlyA</i>), fimbria CS12 (<i>cs12</i>) y adhesina tipo fimbria F17 (<i>f17</i>) |
| | PAI II | α -hemolisina (<i>hlyA</i>), fimbria relacionada a fimbria P (<i>pfrX</i>), adhesina tipo hemaglutinina (<i>focH</i>), adhesina Hek (<i>tia/hek</i>), fimbria P (<i>papC</i>) |
| | PAI III | Fimbria S (<i>sfaA</i>), salmoquelina (<i>iroN</i>), receptor hemo tipo HmuR (<i>hmuR</i>), proteasa de hemoglobina tipo Tsh (<i>tsh</i>), antígeno 43 (<i>ag43</i>) |
| | PAI IV | Sistema sideróforo yersiniabactina (<i>fyuA</i>) |

Tabla modificada de Östblom *et al.*, 2011; Najafi *et al.*, 2017, Desvaux, *et al.*, 2020

Al igual para verificar la presencia de la PAI's en los genomas se comparó el contenido de las PAI de las cepas prototipo recortadas del genoma completo versus el genoma en estudio, pudiendo visualizar la sintenia de genes con la herramienta *Artemis Comparison Tool* (ACT), además que a través de ella también se determinó el contenido de GC en la región de estudio. Las PAI putativas fueron recortadas de los genomas en estudio de acuerdo con la búsqueda de los factores individuales y su localización sumando 10,000 pb río arriba y río abajo; localizando adicionalmente de manera manual la presencia de un ARNt.

8.2.7 Búsqueda de elementos genéticos móviles/movilizables

Se emplearon tres herramientas diferentes: Mobile Element Finder 1.0.3 que permitió la detección de Secuencias de inserción (IS), Unidad Transposón (Tn); Elementos conjugativos integrativos (ICE); Repeticiones invertidas miniatura (MITE), Transposones compuestos (ComTn), Elementos movilizables cis (CIME) y Elementos movilizables integrativos (IME). Plasmid Finder permitió la búsqueda de plásmidos a través de los replicones contenidos en estos y para la detección de integrasa clase 1 (Int1) se realizó un alineamiento manual de los *primers* (oligonucleótidos) Int1-F: GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG y Int1-R: CGACGATGATTTACACGCATGT (Mazel *et al.*, 2000).

8.2.8 Mapeo genético de integrones clase 1

A partir de la integrasa encontrada en los genomas, se corroboró que la estructura del integrón clase 1 se encontrara dentro de los genomas, se graficó cada estructura a través del programa Rstudio.

9. PARAMETROS BIOINFORMÁTICOS

9.1 Serotype Finder 2.0

Se usó un porcentaje de cobertura e identidad de 60/85 respectivamente, para validar la comparación realizada. Esta herramienta detecta 202 variantes del gen *wzx*, 209 variantes de *wzy*, 14 de *wzm* y 14 *wzt*, genes implicados en la síntesis del antígeno O, cubriendo los serotipos O1 al O187, con excepción de los serotipos O14 y O57. Para determinar el antígeno H, esta herramienta contiene 93 variantes de *fliC*, 5 de *flkA*, 2 de *fliA*, 1 *flmA* y 1 *flnA* cubriendo los 53 serotipos de antígeno flagelar conocidos (Joensen *et al.*, 2015).

9.2 Clermont typing 1.4.0

Se realizó la detección mediante PCR *in silico* de los genes *arpA* (Proteína reguladora similar a la anquirina), *chuA* (receptor de hierro tipo hemo), *yjaA* (Proteína putativa), *TspE4C* (fragmento de DNA desconocido), *cfaB* (Antígeno I del factor de colonización subunidad B) y *ybgD* (Proteína de tipo fimbrial no caracterizada) para la determinación del filogrupo, pudiendo detectar los filogrupos A, B1, B2, C, D, F y G mediante esta herramienta. Adicionalmente, la plataforma ofrece una comparación a nivel genoma con una base de datos (*Mashgroup*) contenida en la misma, que permite la determinación más exacta del filogrupo adecuado (Beghain *et al.*, 2018; Clermont *et al.*, 2019).

9.3 MLST 2.0

Para la determinación de la secuencia tipo, se usaron los dos esquemas existentes de clasificación, mediante la detección alélica de diferentes genes *housekeeping*. Para el Esquema 1 (Atchman), se usaron 7 genes: *adk* (adenilato quinasa), *fumC* (fumarato hidratasa), *gyrB* (DNA girasa), *icd* (isocitrato/isopropilmalato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *purA* (adenilosuccinato deshidrogenasa) y *recA* (recombinasa A), con un promedio de 228 alelos por locus de cada gen. Para el Esquema 2 (Pasteur), se emplearon 8 genes *housekeeping*: *dinB* (DNA polimerasa IV), *icdA* (Isocitrato deshidrogenasa), *pabB* (aminodeoxicorismato sintasa subunidad 1), *polB* (DNA polimerasa II), *putP* (Simporte Na⁺: Prolina), *trpA* (Subunidad α triptófano sintasa), *trpB* (Subunidad β triptófano sintasa) y *uidA* (β -D-glucoronidasa) con 143 alelos por *locus* de cada gen (Larsen *et al.*, 2013).

9.4 Virulence Finder 2.0 (VF)

Se usó un porcentaje de cobertura e identidad de 60/90 respectivamente, para validar el alineamiento realizado. Esta herramienta permite la detección de 76 factores asociados a virulencia con 114 variantes de estos genes (Joensen *et al.*, 2014; Larsen *et al.*, 2012).

9.5 Virulence Factor Data Base (VFDB)

Emplea los Modelos de Markov- HMMER3 *package*, con los que detecta 167 factores de virulencia asociados a 2691 genes para el género *Escherichia*.

9.6 xblast

Se empleó el alineamiento a través de xblast (búsqueda en base de datos de proteínas, a partir de una secuencia de nucleótidos), usando un porcentaje de cobertura e identidad de 60/90 respectivamente, para validar la comparación realizada con secuencias de genes asociados a virulencia no contenidos en las plataformas antes mencionadas y para determinar la presencia de los marcadores de las PAI's (Stephen *et al.*, 1997).

9.7 ResFinder 4.1

Se usó un porcentaje de cobertura e identidad de 60/90 respectivamente, para validar la comparación realizada. La plataforma permite la detección de 2690 genes asociados a resistencia a antimicrobianos, además de la detección de 266 mutaciones cromosómicas puntuales (Bortolaia *et al.*, 2020; Zankari *et al.*, 2013).

9.8 Mobile Element Finder 1.0.3

Se usó un porcentaje de cobertura e identidad de 95/90 para validar la comparación realizada. MEF permite la detección de Secuencias de inserción (IS), Transposon unidad (Tn), Elementos conjugativos integrativos (ICE), Repeticiones invertidas miniatura (MITE) y Transposones compuestos (ComTn). Para la detección de integrones clase 1, se realizó alineamiento manual de los *primers* IntI1-F: GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG e IntI1-R: CGACGATGATTTACACGCATGT (Mazel, *et al.*, 2000; Johansson *et al.*, 2021) .

9.9 PlasmidFinder 2.1:

Se usó un porcentaje de cobertura e identidad de 60/95. La herramienta contiene 116 sondas que permiten la detección de 58 tipos de replicones (Camacho *et al.*, 2009; Carattoli *et al.*, 2014).

10. RESULTADOS DE ESTUDIO EXPERIMENTAL

10.1 Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos

De manera general dentro de estas cepas se encontró un porcentaje mayor al 50% de resistencia frente a NA y CIP (50.8% y 58.7% respectivamente) y un 48.4% de resistencia frente a ampicilina en ambos tipos de muestras. Al realizar la clasificación de las cepas de acuerdo con los criterios de Magiorakos, se encontró que el 49% de las cepas fue MDR. De manera específica las 20 cepas aisladas de orina tuvieron porcentajes más altos de resistencia a los antibióticos que las cepas aisladas de heces, siendo AMP (70%) y AN (55%) los antibióticos con mayor resistencia entre las cepas, seguido de CIP y TE con un porcentaje del 50% cada uno en las cepas de orina. Entre las cepas aisladas de heces se encontraron porcentajes arriba del 50% frente a NA (59.4%) y CIP (50.9%); sin embargo, a diferencia de las cepas de orina, dentro de las comensales existió una cepa resistente a fosfomicina.

Dentro del grupo de cepas seleccionadas de acuerdo con los objetivos (cepa de orina y heces provenientes de la misma paciente), se encontró que el 100% de las cepas de orina fue resistente a la AMP, el 83.3% fue resistente a TE y 66.7% a las quinolonas CIP y NA. Adicionalmente todas las cepas mostraron sensibilidad a fosfomicina y al cloranfenicol. Las cepas provenientes de heces mostraron un fenotipo de resistencia frente a AMP y NA (62.5% cada uno), seguido de STX con 54.2% y CIP con 50%. Al contrario que las cepas de orina, dentro de estas cepas hubo unas que se mostraron resistencia a FOS y C. Al comparar las cepas de orina y heces provenientes de la misma paciente, se encontró en la paciente 1 el 94% de similitud en el fenotipo de susceptibilidad frente a los antibióticos evaluados; en la paciente 2 hubo un 52.9% de similitud siendo la cepa de heces resistente solo a NA; la paciente 3 tuvo un porcentaje de similitud de 41.2 a 88.2% entre sus cepas; la paciente 4 el porcentaje de similitud fue de 52.9% a 82.3% entre cepas, las cepas de la paciente 5 se observó el más alto porcentaje de similitud del 94.1% al 100% (5-O, 5-H2, 5-H3, 5-H4, 5-H7, 5-H8) (figura 2); por último en las cepas de la paciente 6 se observó un porcentaje de similitud del 70.6%, siendo las dos cepas de heces aisladas sensibles a todos los antibióticos probados 5-H7, 5-H8) (Tabla 6).

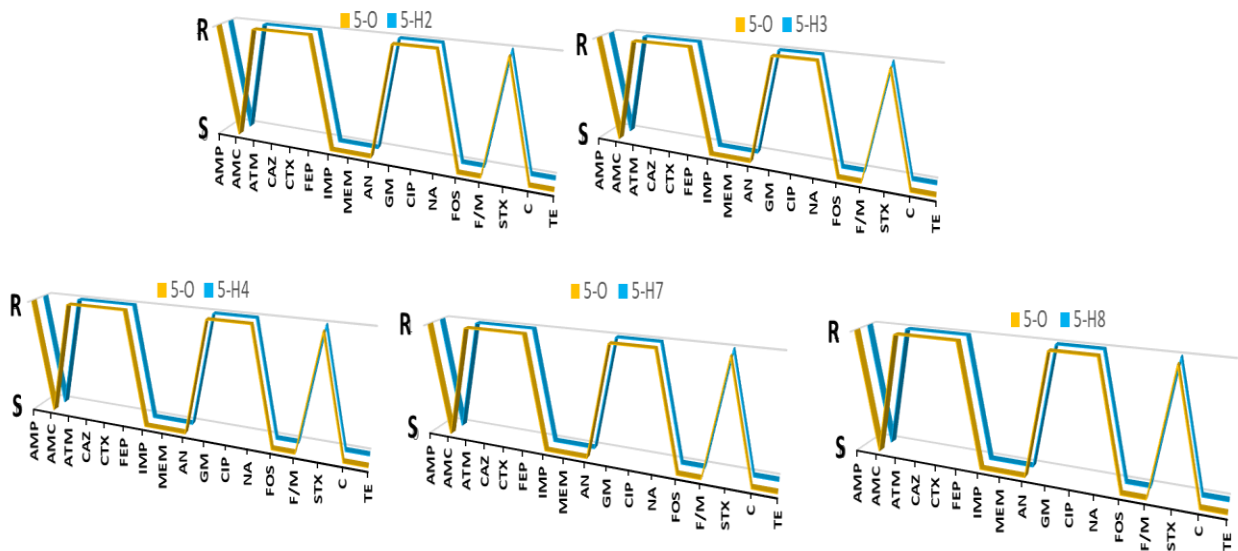


Figura 2. Fenotipo de susceptibilidad de la cepa de orina (n=1) vs. cepas de heces (n=5) de la paciente 5. Se observa el mismo fenotipo tanto en la cepa de orina como en las cinco de heces. AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, FEP: cefepime, IMP: imipenem, MEM: meropenem, AN: amikacina, GM: gentamicina, CIP: ciprofloxacino, NA: ácido nalidixico, FOS: fosfomicina, F/M: nitrofurantoína, STX: trimetoprim-sulfametoxazol, C: cloranfenicol, TE: tetraciclina

Tabla 6. Resultados del fenotipo de susceptibilidad de cepas pareadas de 6 pacientes embarazadas.

| Cepa | H | O | AMP | AMC | ATM | CAZ | CTX | FEP | IMP | MEM | AN | GM | CIP | NA | FOS | F/M | STX | C | TE | C.M |
|------|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|----|-----|-----|-----|---|----|--------|
| 1-O | | x | R | R | S | S | S | S | S | S | R | R | R | R | S | S | S | S | R | MDR |
| 1-H | x | | R | R | S | S | S | S | S | S | S | R | R | R | S | S | S | S | R | MDR |
| 2-O | | x | R | S | S | S | S | S | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | R | MDR |
| 2-H | x | | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S |
| 3-O | | x | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | MDR |
| 3-H1 | x | | R | S | S | S | S | S | R | S | R | R | R | R | S | S | S | S | S | MDR |
| 3-H2 | x | | R | S | S | S | S | S | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | S | MDR |
| 3-H3 | x | | R | R | S | S | S | S | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 3-H4 | x | | R | S | S | S | S | S | R | R | S | S | S | S | S | S | R | S | R | MDR |
| 3-H5 | x | | R | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S |
| 3-H6 | x | | R | S | S | S | S | S | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | R | MDR |
| 4-O | | x | R | R | S | S | S | S | R | S | S | S | R | R | S | R | S | S | R | MDR |
| 4-H1 | x | | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | R | S | S | S |
| 4-H2 | x | | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | R | S |
| 4-H3 | x | | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S |
| 4-H4 | x | | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | R | S |
| 4-H5 | x | | S | S | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | MDR |
| 4-H6 | x | | S | R | S | S | S | S | S | S | R | S | R | R | R | S | R | R | R | MDR |
| 5-O | | x | R | S | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | S | S | R | S | S | MDR |
| 5-H1 | x | | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | R | S | S | S | MDR |
| 5-H2 | x | | R | S | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | S | S | R | S | S | MDR |
| 5-H3 | x | | R | S | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | S | S | R | S | S | MDR |
| 5-H4 | x | | R | S | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | S | S | R | S | S | MDR |
| 5-H5 | x | | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | S | R | S | S | S |
| 5-H6 | x | | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | S | S | R | S | S | MDR |
| 5-H7 | x | | R | S | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | S | S | R | S | S | MDR |
| 5-H8 | x | | R | S | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | S | S | R | S | S | MDR |
| 6-O | | x | R | S | S | S | S | S | R | R | S | S | S | R | S | S | S | S | R | MDR |
| 6-H1 | x | | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | No MDR |
| 6-H2 | x | | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | No MDR |

H: heces, O: orina, S: sensible R: Resistente, R: Intermedio en fenotipo, extrapolado a resistente, AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, FEP: cefepime, IMP: imipenem, MEM: meropenem, AN: amikacina, GM: gentamicina, CIP: ciprofloxacino, NA: ácido nalidixico, FOS: fosfomicina, F/M: nitrofurantoína, STX: trimetoprim-sulfametoxazol, C: cloranfenicol, TE: tetraciclina, C.M: clasificación de Magiorakos, MDR: multidrogo resistente.

10.3 Producción fenotípica de BLEE

De las 126 cepas analizadas el 12.7% (16/126) fueron cepas productoras de BLEE, 3 cepas eran de orina y 13 de heces. Dentro de las 13 cepas de heces productoras de BLEE, 7 pertenecieron a la paciente 5 (una cepa de orina y seis cepas de heces), las otras cepas BLEE (+) se encontraron en 8 pacientes diferentes de los no se presentaron muestras pareadas de orina o heces (Tabla 7 recuadro). Además, la mayoría de ellas compartieron el fenotipo de susceptibilidad (5-O, 5-H2, 5-H3, 5-H4, 5-H7, 5-H8) con excepción de 5-H6 que presentó un fenotipo diferente. El sinergismo observado, con excepción de 5-H2, fue hacia ATM, CAZ, CTX y FEP; 5-H2 sólo presentó sinergismo con CAZ.

Debido a la contingencia sanitaria por COVID-19 en 2020, las actividades del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad fueron suspendidas, por lo que el desarrollo experimental del estudio planteado en el protocolo original se redirigió hacia una proyección *in silico* que se describirá más adelante.

Tabla 7. Fenotipo BLEE en 6 cepas de orina y 24 cepas de heces provenientes de 6 pacientes embarazadas (pareadas) y otras 8 cepas no pareadas (en el recuadro) BLEE (+)

| Cepa | Origen | | Fenotipo BLEE | Cepa | Origen | | Fenotipo BLEE |
|------|--------|-------|---------------|-------|--------|-------|---------------|
| | Heces | Orina | | | Heces | Orina | |
| 1-O | | x | - | 5-O | | x | + |
| 1-H | x | | - | 5-H1 | x | | - |
| 2-O | | x | - | 5-H2 | x | | + |
| 2-H | x | | - | 5-H3 | x | | + |
| 3-O | | x | - | 5-H4 | x | | + |
| 3-H1 | x | | - | 5-H5 | x | | + |
| 3-H2 | x | | - | 5-H6 | x | | + |
| 3-H3 | x | | - | 5-H7 | x | | + |
| 3-H4 | x | | - | 5-H8 | x | | + |
| 3-H5 | x | | - | 6-O | | x | - |
| 3-H6 | x | | - | 6-H1 | x | | - |
| 4-O | | x | - | 6-H2 | x | | - |
| 4-H1 | x | | - | 1-U | | x | + |
| 4-H2 | x | | - | 12-U | | x | + |
| 4-H3 | x | | - | 143-H | x | | + |
| 4-H4 | x | | - | 213-H | x | | + |
| 4-H5 | x | | - | 216-H | x | | + |
| 4-H6 | | x | - | 220-H | x | | + |
| | | | | 243-H | x | | + |
| | | | | 249-H | x | | + |

11. RESULTADOS *in silico*

Genomas analizados

En la base de datos GenBank se localizaron 1794 genomas completos de *E. coli* hasta el 31 de diciembre de 2020; esta plataforma no permite un filtro estrecho de los genomas (como por fuente de aislamiento por ejemplo), por lo que se recurrió a otras plataformas como Pathogen Finder, en la cual se aplicaron 6 filtros para localizar las cepas provenientes de orina (urine, clinical sample: urine, UTI, urinary tract, urine from healthy adult with cystitis, urine; urinary tract infection) y 12 filtros para aislados comensales (stool, human stool, Human stool, rectal swab, Rectal swab, Rectal Swab, rectal swab from healthy college student, feces, feces from healthy individual, fecal sample, feces Human, Healthy human (stool)). En esta búsqueda se detectó que no todos los genomas cuentan con los datos completos, por lo que después de los filtros se realizó la revisión manual de los bioproyectos y biomuestra; con ayuda de la base de datos PATRIC 3.6.8 se corroboraron los criterios de inclusión, faltantes en las bases de datos antes mencionadas. A través de este proceso se seleccionaron las cepas aisladas de orina humana, con o sin síntomas de ITU, sometidos hasta el 31 de diciembre del 2020, obteniendo un total de **87** genomas denominados como UPEC y **85** genomas comensales de acuerdo con el criterio de aislamiento en heces humanas de individuos sanos con la misma fecha límite. Así, los 172 genomas fueron incluidos en el estudio (Anexo A).

Más de 1000 genomas fueron eliminados del estudio debido a la fuente de aislamiento, tipo de hospedero o que pertenecían a algún patotipo diarreogénico.

11.1 Genotipificación de los genomas

Se identificaron 9 serogrupos y 81 serotipos distintos entre los 172 genomas analizados (UPEC= 87 y comensales= 85); 4 serotipos y 24 serogrupos se encontraron de manera exclusiva en genomas UPEC y 2 serotipos y 45 serogrupos fueron exclusivos de genomas comensales, mientras que 15 fueron compartidos entre ambos tipos de genomas (Figura 3): 3 serogrupos (H21, H28, H9) y 12 serotipos (O1:H6, O101:H10, O101:H17, O101:H21, O101:H9, O102:H6, O13:H4, O17:H18, O18ab:H14, O25:H4, O6:H1, O75:H5). Los serogrupos y serotipos encontrados pueden observarse en la Figura 3 y la frecuencia de estos en la Figura 4.

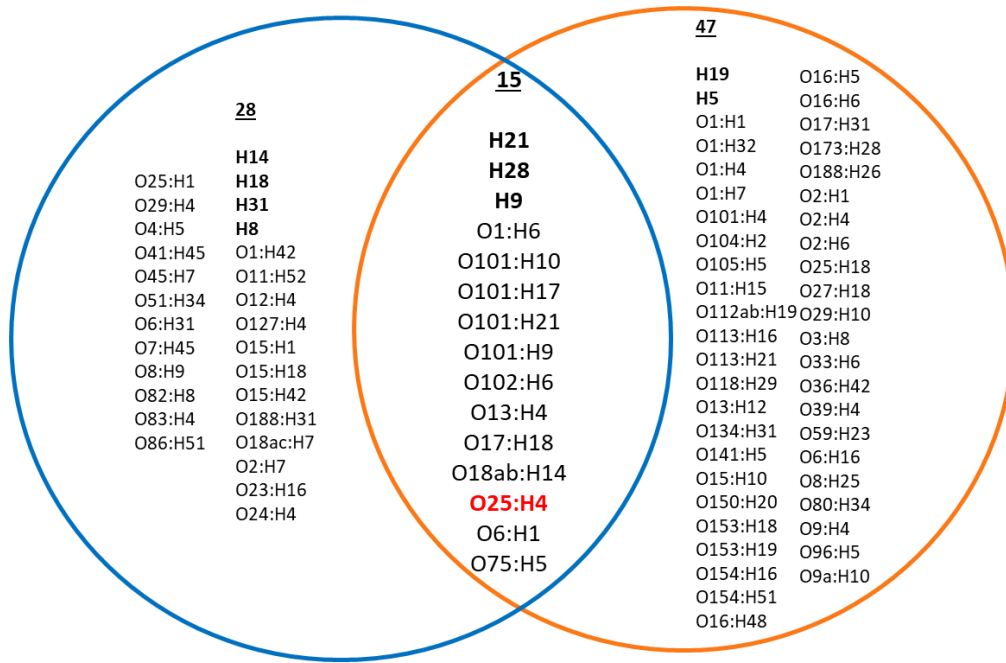


Figura 2. Diagrama de Venn de serogrupos (en negritas) y serotipos encontrados (Círculo azul: UPEC= 87, círculo naranja: comensales= 85), se destaca con rojo el serotipo reportado con mayor frecuencia en las cepas aisladas de ITU.

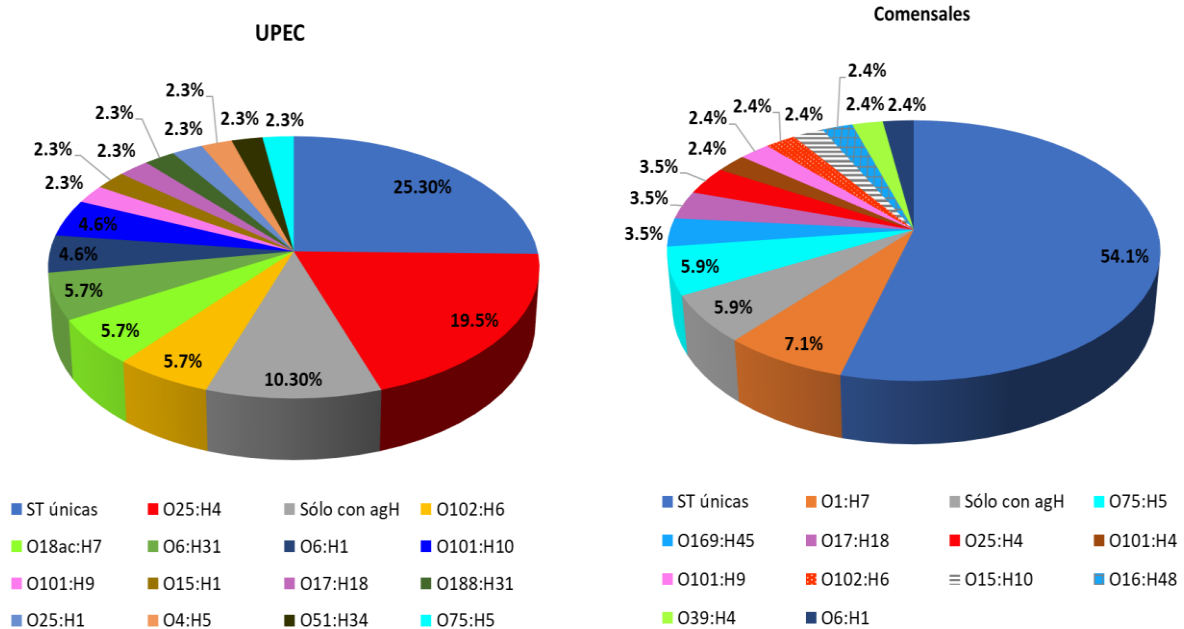


Figura 4. Prevalencia de serogrupos y serotipos en genomas UPEC= 87 y comensales= 85. Se observa al serotipo O25:H4 (rojo, 19.5%) con mayor frecuencia en los genomas UPEC (n=17) y el O1:H7 (naranja, 7.1%) de mayor frecuencia en genomas comensales (n=6). Se observó una gran frecuencia de serotipos únicos en ambos tipos de genomas.

Mediante la herramienta Clermontyping, se clasificó a los genomas dentro de los ocho filogrupos conocidos (A, B1, B2, C, D, E, F y G) de *E. coli*; a pesar de haber detectado el filogrupo G (en un genoma UPEC) este no fue considerado dentro de la clasificación de los genomas de estudio, ya que de acuerdo al mashgroup que realiza una comparación a través de relaciones filogenéticas, este genoma se consideró dentro del filogrupo F. Los genomas UPEC se distribuyeron de manera mayoritaria dentro del filogrupo B2 (n= 42, 48.3%), seguido del filogrupo A (n= 14, 16.1%); mientras que los genomas comensales se encontraron principalmente dentro del filogrupo A (n=33, 38.8%) y B2 (n=27, 31.8%). Solamente en los genomas comensales se encontró al menos una cepa dentro cada uno de los ocho filogrupos detectados (Figura 5).

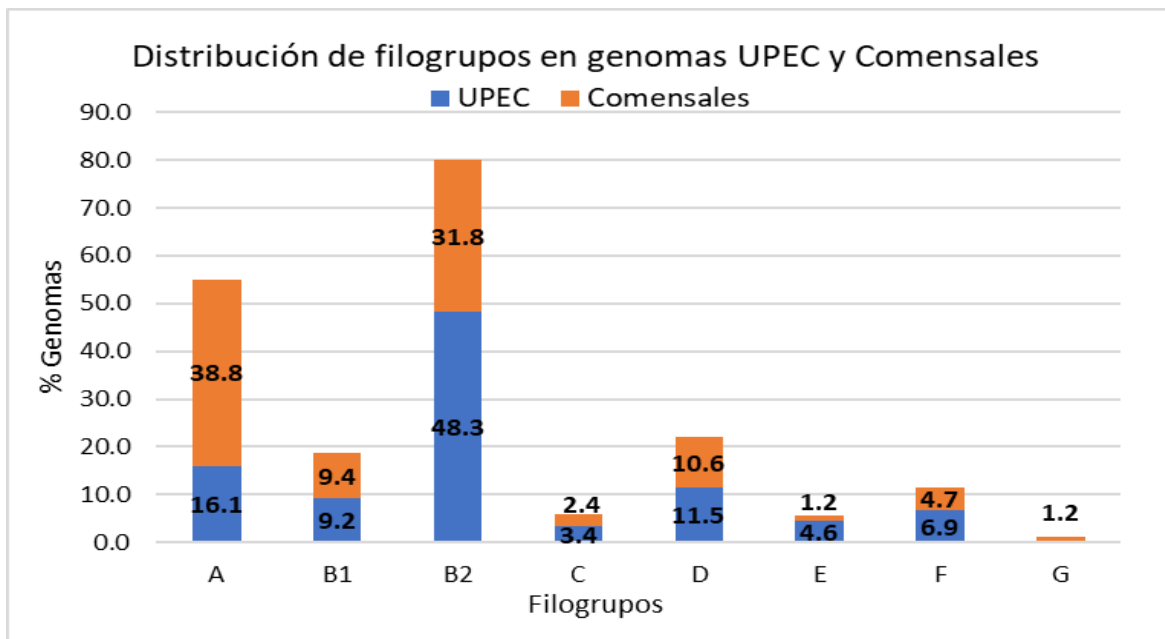


Figura 5. Prevalencia de filogrupos detectados en cepas UPEC=87 y *E. coli* comensales= 85. Los genomas UPEC se distribuyeron con mayor frecuencia dentro del filogrupo B2 (48.3%) y los comensales en el filogrupo A (38.8%), solo dentro los genomas comensales se encontró uno dentro el filogrupo G

11.2 Determinación de secuencia tipo

Entre los 172 genomas analizados bajo el esquema Atchman, se detectaron 75 secuencias tipo diferentes, dentro de estas, 13 ST (10, 38, 69, 73, 95, 131, 167, 394, 405, 410, 648, 1193, 1434) fueron compartidas entre ambos tipos de genomas (Figura 6). Para un porcentaje de los genomas (3 de 172, 1.7%) no se pudo determinar su ST mediante este esquema, sólo se pudo determinar a través del esquema de Pasteur; resultando un genoma UPEC ST48 y dos genomas comensales ST832 y ST999, además uno de los genomas UPEC y 6 (7.1 %) genomas comensales no pudieron ser tipificados mediante su ST con ninguno de los dos esquemas.

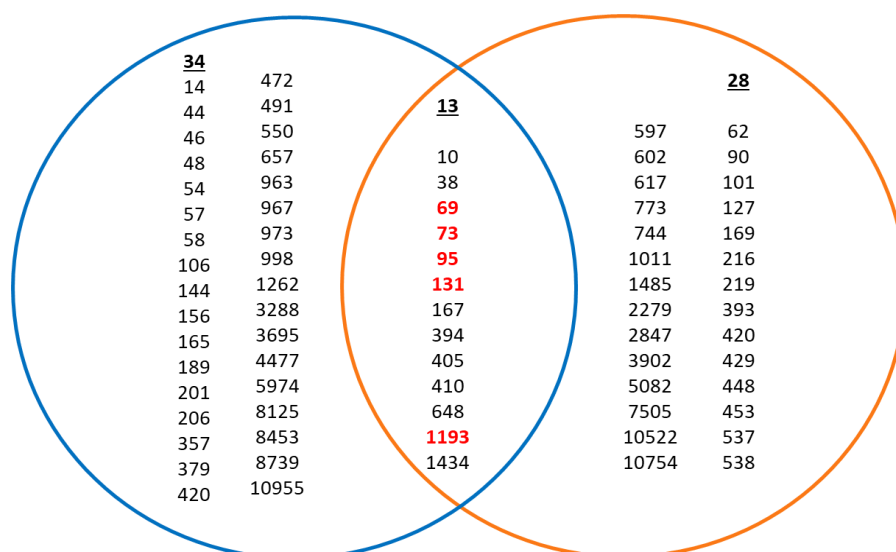


Figura 6. Diagrama de Venn de secuencias tipo encontrados con el esquema de Atchman (Círculo azul: UPEC=87, círculo naranja: comensales= 85). Se destacan con rojo las secuencia tipo (ST) reportadas en la literatura internacional con más frecuencia en aislados de infección de tracto urinario.

11.3 Comparación de tamaños de los genomas y contenido de genes de virulencia y genes asociados a resistencia a antimicrobianos (ARA)

Mediante la paquetería Office365, a través de la prueba estadística *t de Student*, para dos muestras (UPEC= 87 y comensales= 85) suponiendo varianzas diferentes, se comparó tamaño en mega bases (Mb), contenido de genes asociados a factores de virulencia y contenido de genes asociados a resistencia a antimicrobianos (ARA) en ambos tipos de genomas (Tabla 8).

Tabla 8. Medias de tamaño del genoma en mega bases (Mb), contenido de genes asociados a factores de virulencia y contenido de genes asociados a resistencia a antimicrobianos (ARA), de ambos tipos de genoma

| Genomas | Tamaño Promedio (Mb) | Genes promedio asociados a factores de virulencia | Genes asociados a resistencia a antimicrobianos |
|-------------------|-----------------------------|--|--|
| UPEC | 5.22 | 87 | 10 |
| Comensales | 5.07 | 74 | 7 |
| Diferencia | 0.15 | 16 | 3 |
| Valor de P | 7.5639E-06 | 1.61E-04 | 0.00471184 |

En todas las comparaciones realizadas existió diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con 95% de confianza.

11.4 Búsqueda de factores de virulencia

A través de VF y VFDB se detectó un total de 169 genes (109 genes organizados en 19 operones y 60 genes individuales codificantes para un factor de virulencia cada uno) asociados a 79 factores de virulencia. De los 79 diferentes factores de virulencia encontrados, 68 de los 79 se encontraron en los genomas UPEC con excepción de KpsMIII, Cba, EspI y EspP (EHEC), K88 (ETEC), Dispersina, AggR y AatA (EAEC), CelB (EPEC), VirF (*Shigella*) y HlyA (*Aeromonas*) y 74 de 79 en genomas comensales con excepción de fimbria P, Cdt, TibA (ETEC) y AIDA-I (DAEC)]. Entre ambos tipos de genomas se detectaron 29 factores de virulencia asociado a cinco de los seis patotipos de *E. coli* conocidos (EHEC, ETEC, EAEC, DAEC y EPEC) y 3 factores de virulencia asociados a otras especies bacterianas: VirF (*Shigella*) (en genoma comensal SCU-387), Fimbria T3 (*Klebsiella*) (detectada en genoma UPEC: Combat11I9 y genomas comensales 2017.15.01CC y G4.9) y hlyA (*Aeromonas*) (en genoma comensal SCU-488) (Figura 7).

En el 100% de ambos tipos de genomas se encontró al menos un gen asociado a virulencia de otro patotipo; en un genoma UPEC (UPEC 201609) se encontró un máximo de 10 genes asociados a factores de virulencia de diferentes patotipos DEC: EHEC (*ecp*, *elf*, *hcp*, *lfpA*, *cah* y *ehaB*), ETEC (*eaeh*) y EAEC (*aatA*, *air/eaex*, *eilA*) y en 2 genomas comensales (SCU-106 y SCU-152) se detectaron 12 genes asociados a factores de virulencia de patotipos DEC; en SCU-106 se detectaron genes asociados a los patotipos: EHEC (*ecp*, *elf*, *hcp*, *lfpA*, *ehaA*, *ehaB*, *espl*, *espP*), ETEC (*cfa*, *eaeh*), EAEC (*pet*) y EPEC (*celB*); en SCU-152 también se observó la predominancia de genes de virulencia asociados a EHEC (*ecp*, *elf*, *hcp*, *lfpA*, *cah*, *ehaA*, *ehaB*) y a los patotipos ETEC (*cfa*, *eaeh*, *astA*) y EAEC (*air/eaex*).

Los factores de mayor prevalencia que se encontraron entre los genomas fueron *terC* y *gad* (UPEC 100% y comensales 100%) que confieren resistencia al telurio y al ácido estomacal, respectivamente y la hemolisina *hlyE* (UPEC 96.6% y comensales 90.6%) los de menor frecuencia fueron las colicinas que se encontraron en menos del 30% de los genomas. Los factores de virulencia detectados se encontraban codificados principalmente en el cromosoma en ambos tipos de genomas estudiados. Los factores de virulencia que se encontraron en plásmidos fueron autotransportadores (*pic*, *sat*, *vat*), sistemas de captación de hierro (*iuc*, *iro*, *sit*, *ireA*), toxinas (*hlyA*, *senB*, *hlyF*), factores de superficie y resistencia al suero (*ompT*, *iss*, *traT*) y las colicinas (*cea*, *cia*, *mcbA*, *cba*, *cma*, *cvaC*, *ccl*, *cib*); aunque estos factores también estuvieron presentes dentro del cromosoma en algunos genomas de UPEC y de comensales. De manera exclusiva se encontraron en plásmidos los genes *senB*, *hlyF*, *cia*, *mcbA*, *cba*, *cma*, *cvaC*, *ccl*, *cib* y *traT*. El gene *traT* fue encontrado en un 67.8% en genomas UPEC y 41.2% en comensales; en dos de estos genomas comensales se encontró que codificaban este gen *traT* en el cromosoma.

Dentro de los factores de virulencia asociados a otros patotipos se encontraron con una mayor frecuencia los asociados al patotipo EHEC (ECP: 95.4% y 88.2%; EhaB: 93.1% y 87.1%, en UPEC y comensales respectivamente) y HCP en el 100% de los genomas de ambos orígenes y del patotipo ETEC (*eaeh*: 89.7% y 87.1% en UPEC y comensales respectivamente).

Cabe mencionar que no se detectó ninguno de los marcadores de virulencia usados para la caracterización molecular de los patotipos diarreogénicos de *E. coli* (EHEC, ETEC, EPEC, DAEC, EAEC y AIEC).

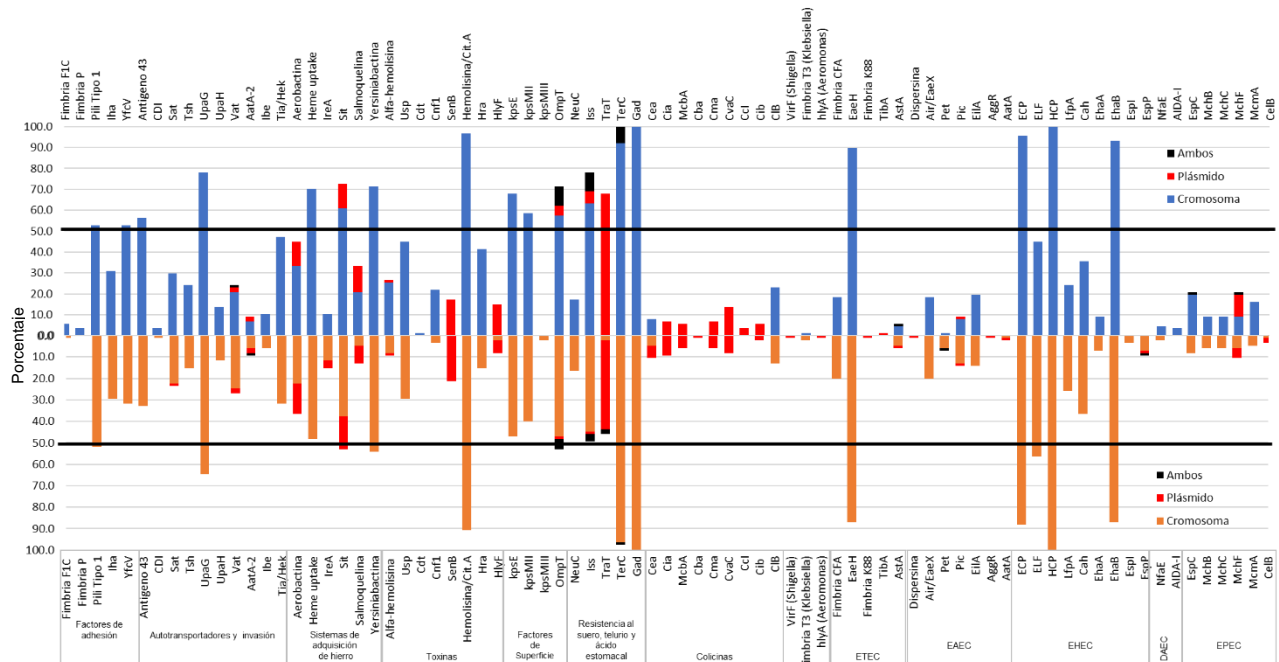


Figura 7. Factores de virulencia determinados por Virulence Finder y Virulence Finder Data Base en genomas UPEC= 87 (gráfica superior, cromosoma azul) y comensales= 85 (gráfica inferior, cromosoma naranja). Se gráfica la frecuencia de los factores de virulencia en ambos tipos de genomas, así como su localización dentro del genoma. La línea negra se sitúa en el 50% de frecuencia de ambos lados del gráfico de espejo.

El pili tipo P, está estructurado por el operón *papIBAHCDJKEFG*; siendo la proteína PapG codificada por el gen *papG*, un marcador de virulencia usualmente buscado en los estudios experimentales; únicamente tres genomas UPEC mostraron el operón completo (CFT073, 536 y ATCC700415); sin embargo, 32 genomas UPEC y 12 genomas comensales portaban el gen *papG*, se procedió a determinar la variante alélica de este gen mediante el algoritmo de la herramienta Phylogeny.fr que incluye: alineamiento (MUSCLE), Curación (Gblocks), filogenia (máxima verosimilitud) y la representación gráfica (TreeDyn); además se usaron las secuencias de aminoácidos de cada variante alélica reportada (*papGI*, *papGII*, como secuencias control. Debido a que algunos genomas tuvieron más de una copia del gen *papG*, se representaron un total de 40 secuencias aminoacídicas codificantes de *papG* de los genomas UPEC y 13 secuencias aminoacídicas de genomas comensales (Figura 8). El 50% (16/32) de los genomas UPEC mostraron la variante alélica *papGII* y el resto *papGIII*; resaltando la presencia de dos genomas con más de una copia del gen *papG* variante II, y cinco genomas con tres copias de la variante *papGIII*. Así mismo, el 91.6% (11/12) de los genomas comensales, mostró la variante *papGII* y sólo uno *papGIII*; se resalta un genoma comensal (SCU-125) que tuvo dos copias de *papGII*.

No se detectó la variante alélica *papGI* en ambos tipos de genoma. Como se menciona anteriormente

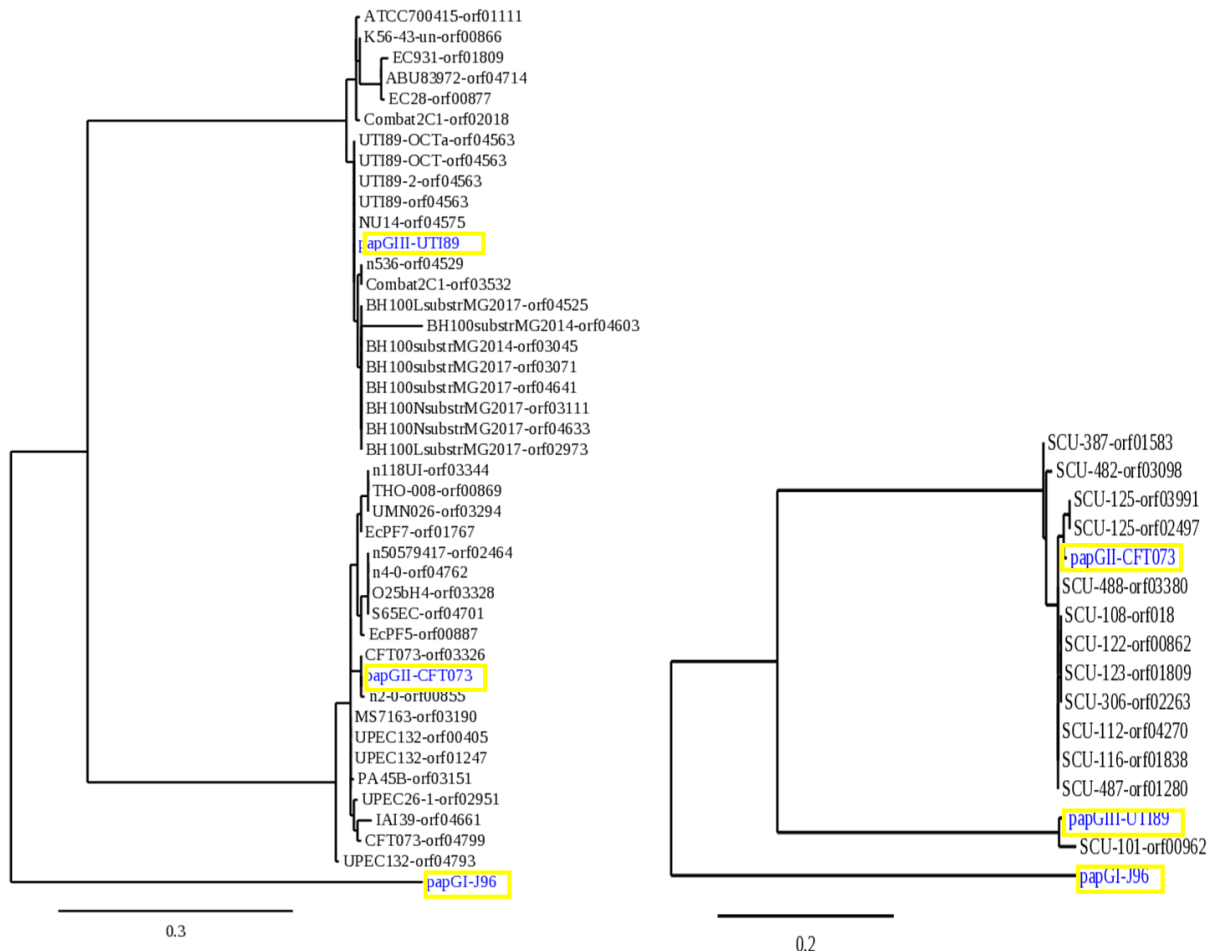


Figura 8. Árbol filogenético, obtenido con el método de máxima verosimilitud, de secuencias de aminoácidos de la adhesina *papG* en genomas UPEC (32 genomas con un total de 40 alelos de *papG*) y comensales (12 genomas con un total de 13 alelos de *papG*); incluyendo las secuencias de las adhesinas *papGI*, *papGII* y *papGIII* como secuencia control (recuadros amarillos). Destaca una mayor presencia de la variante *papGII* en los genomas comensales. Realizado a través de Phylogeny.fr.

11.5 Búsqueda de Islas de Patogenicidad

A partir de la búsqueda de factores de virulencia realizada mediante las plataformas VF y VFDB, se seleccionaron aquellos genes asociados a PAI's [*hlyA* (α -hemolisina), *papC* (subunidad principal pilina de pili tipo P), *iutA* (receptor de aerobactina), *iha* (adhesina regulada por hierro), *ag43* (Antígeno 43), *kpsMIII* (Proteína transportadora de ácido polisiálico de cápsula tipo 2), *ireA* (regulador de hierro), *sat* (toxina autotransportadora secretada), *cnf1* (factor citotóxico necrotizante), *focH* (adhesina fimbrial tipo hemaglutinina), *hek/tia* (adhesina de invasión), *sfaA* (subunidad principal pilina de fimbria S), *iroN* (receptor de salmoquelina) , *tsh* (hemaglutinina termosensible) y *fyuA* (receptor de yersiniabactina)] de las cepas prototipo UPEC (CFT073, 536 y J96) y aquellos factores no contenidos en las plataformas y que se sabe son parte de las PAI's, se localizaron mediante Blast [*cs12* (fimbria CS12) , *prfX* (regulador transcripcional de fimbria tipo pili P) *f17* (fimbria F17), *prsG* (adhesina de fimbria Prs), *hmuR* (receptor de hierro tipo hemo)].

Para tomar como presente la PAI se estableció como criterios: a) que se detectaran >50% de los factores de virulencia contenidos según la literatura, b) que su localización se encontrará dentro la misma región del cromosoma y c) que el contenido de Guanina-Citocina (%GC) en esta región fuera menor al contenido promedio de %GC del genoma, determinado a través de *Artemis Comparison Tool* (ACT). En la Figura 9 se muestra un ejemplo de la comparación realizada entre la secuencia de una PAI de las cepas prototipo (CFT073, 536) y una PAI putativa a través de dicha herramienta. No se detectó ninguna PAI en plásmidos.

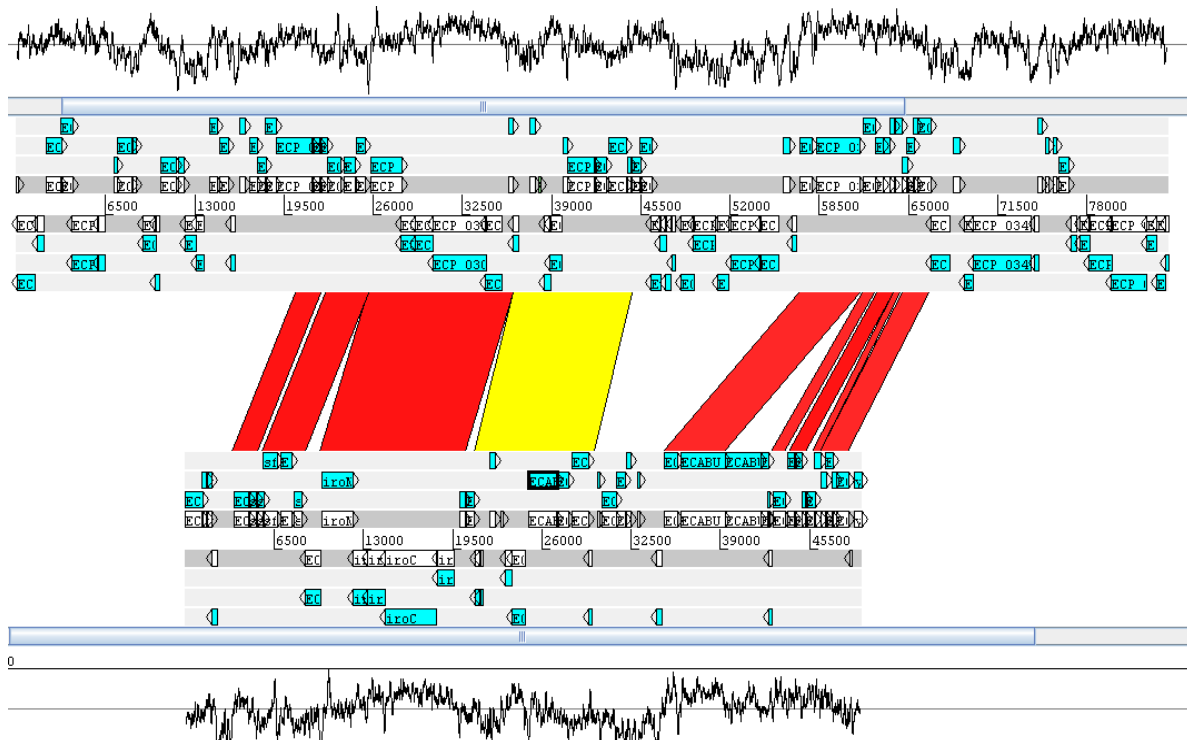


Figura 9. Comparación mediante *Artemis Comparison Tool* (ACT) de la isla de patogenicidad (PAI) 536-III (arriba) y PAI 536-III putativa en ABU83972 (abajo) secuencia recortada del genoma de acuerdo a la localización de la búsqueda individual de marcadores de PAI's, las barras paralelas (rojas) señalan los genes homólogos en ambos genomas. La barra amarilla denota el gen seleccionado en el momento del análisis. En los extremos inferior y superior se visualiza el contenido de Guanina-Citocina en la región seleccionada con respecto a la media de Guanina-Citocina del genoma.

A partir de la búsqueda individual de los genes de virulencia se detectó en 79 genomas UPEC y 64 genomas comensales al menos un factor de virulencia asociado a las PAI's; a partir de este primer filtro se localizaron los genomas que cumplían los criterios antes descritos, obteniendo un total de 64 genomas UPEC y 47 genomas comensales con al menos una PAI, encontrándose de manera predominante en ambos tipos de genomas la PAI 536-IV (UPEC=60/79, 75.9% y comensales=47/64, 73.4%). Además, también se encontraron regiones en el genoma de las cepas que portaban factores de virulencia asociadas a más de una PAI; las combinaciones encontradas fueron de marcadores de CFT073-I y 536-II; 536-I y 536-II; 536-I, 536-II y J96-II (*cnf1*); 536-I, 536-II y J96-II (*prsG*, *cnf1*); 536-III y 536-IV; CFT073-I, CFT073-II y J96-II (*prsG*, *cnf1*); CFT073-I y CFT073-II.

Existen marcadores de virulencia que no son específicos de una sola PAI en particular, estos pueden estar presentes en varias PAI's, tal como la α -hemolisina y la fimbria P, por ello con base a la búsqueda individual de estos marcadores no se puede determinar si se encuentran en alguna PAI en específico. Una de las ventajas de realizar la búsqueda *in silico*, es contar con herramientas que nos permitan la visualización de la PAI completa. En este estudio se empleó la herramienta ACT para dicho objetivo, pudiendo identificar las PAI's de las cepas prototipo CFT073 y 536; lamentablemente el genoma de la cepa J96 no se encuentra disponible en el *GenBank*, por lo que esta comparación no pudo ser realizada con los genomas de estudio; sin embargo se encontró la presencia de los marcadores de virulencia codificados en la PAI J96-II (*prsG*, *cnf1*), asociados a otras PAIs, es decir una probable fusión de estos marcadores con otras PAIs: 536-I- II y la CFT073-I y II de las cepas prototipo (Figura 10).

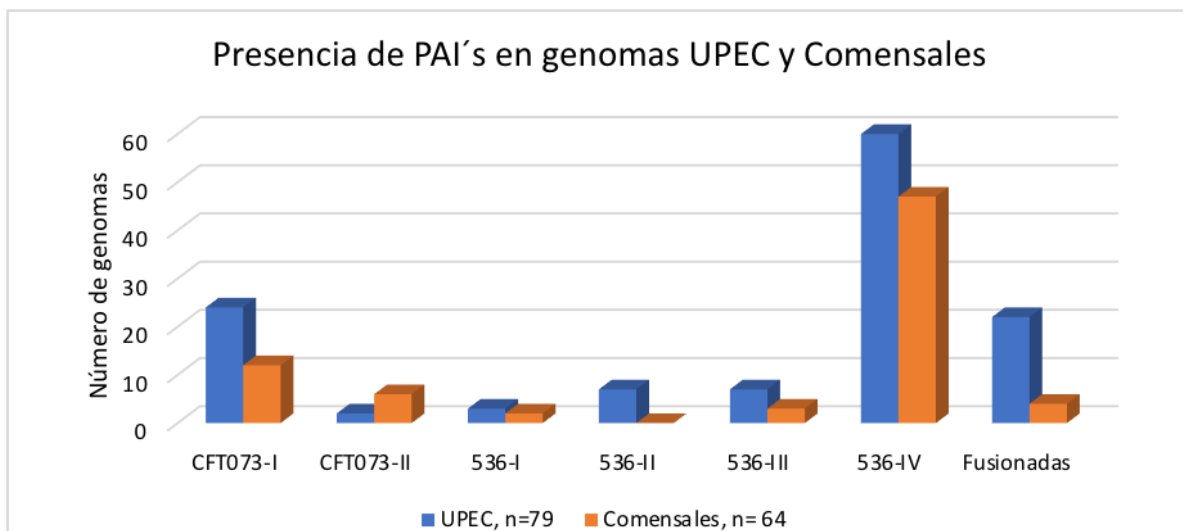


Figura 10. Presencia de PAI's de las cepas prototipo en genomas UPEC=79/87 y comensales= 64/85, determinada a través de *Artemis Comparison Tool* (ACT) con base a los marcadores *hlyA* (α -hemolisina), *papC* (subunidad principal pilina de pili tipo P), *iutA* (receptor de aerobactina), *iha* (adhesina regulada por hierro), *ag43* (Antígeno 43), *kpsMIII* (Proteína transportadora de ácido polisialílico de cápsula tipo 2), *ireA* (elemento regulador de hierro), *sat* (toxina autotransportadora secretada), *cnf1* (factor citotóxico necrotizante), *focH* (adhesina tipo hemaglutinina), *hek/tia* (adhesina de invasión), *sfaA* (subunidad principal pilina de fimbria S), *iroN* (receptor de salmoquelina), *tsh* (hemaglutinina termosensible), *cs12* (fimbria CS12), *prfX* (regulador transcripcional de fimbria tipo pili P), *f17* (fimbria F17), *prsG* (adhesina de fimbria Prs), *hmuR* (receptor de hierro tipo hemo) y *fyuA* (receptor de yersiniabactina).

11.6 Análisis de marcadores *chuA*, *fyuA*, *yfcV* y *vat*

En estudios anteriores, se ha propuesto el uso de 4 marcadores: *chuA* (receptor de hierro tipo hemo), *fyuA* (receptor de yersiniabactina), *yfcV* (subunidad principal de fimbria Yfc) y *vat* (toxina autotransportadora vacuolizante), para poder clasificar una cepa como UPEC, para lo cual, si esta posee mínimo tres de ellos es clasificada como *E. coli* uropatógena. Se determinó la presencia de estos cuatro genes dentro de los genomas de ambos orígenes, observando que un 52.9% de cepas de UPEC cumplían con este requisito; sin embargo, un porcentaje (17.2%) de estos genomas no contaban con ninguno de los marcadores propuestos. Entre los genomas comensales se encontró un porcentaje menor con dichos marcadores (35.3%) (Figura 11).

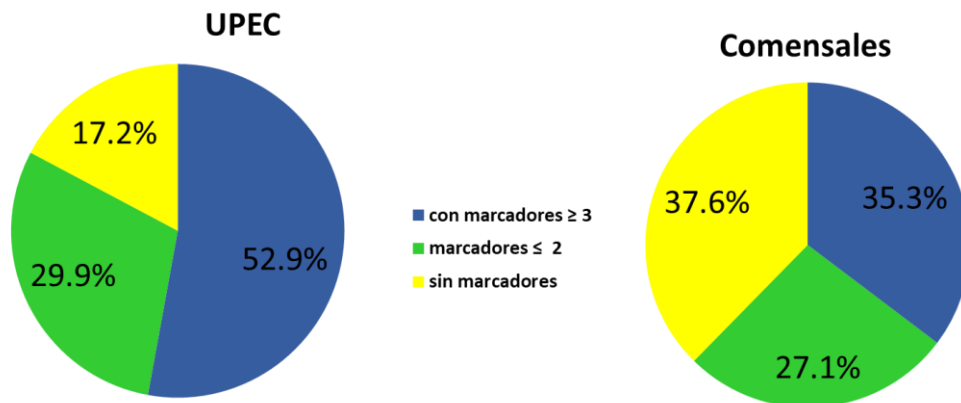


Figura 11. Caracterización del potencial uropatógeno de cepas UPEC y comensales de acuerdo con la presencia de los marcadores *chuA* (receptor de hierro tipo hemo), *fyuA* (receptor de yersiniabactina), *yfcV* (subunidad principal de fimbria Yfc) y *vat* (toxina autotransportadora vacuolizante). Se observó un porcentaje (17.2%) de cepas aisladas de infección del tracto urinario que carecen de la presencia de estos y un 35.3% de genomas comensales que los posee.

11.7 Búsqueda de genes asociados a resistencia a antimicrobianos

En el 82.8% (n=72/87) de los genomas UPEC y en el 67.1% (n=57/85) de los genomas comensales se detectó al menos un determinante de resistencia a antimicrobianos; de manera predominante se encontraron genes adquiridos asociados a resistencia a antimicrobianos dentro los genomas; el 79.3% y 61.2% de los genomas UPEC y comensales respectivamente portó algún gen de estos, además de portar estos genes, el 59.8% y 37.6% de genomas UPEC y comensales respectivamente tuvieron mutaciones cromosómicas asociadas a resistencia a antimicrobianos; en un menor porcentaje se encontraron genomas que tuvieran como determinante de resistencia solo genes ARA (19.5% de genomas UPEC y un 23.5% en comensales) y en un porcentaje aún más bajo se encontraron genomas con solo mutaciones cromosómicas asociadas a resistencia a antimicrobianos (3.4% en UPEC y 6.9% en comensales)

Un total de 708 genes asociados a resistencia a antimicrobianos fueron detectados en los genomas UPEC (n=69) y 382 genes ARA en comensales (n=62); en ambos tipos de genomas se encontraron con mayor prevalencia los genes asociados a resistencia a aminoglucósidos (27.1% UPEC y 27.0% comensales) y a betalactámicos (23.2% UPEC y 22.8% comensales), a diferencia de los genomas UPEC (0.6%) en los genomas comensales no se detectaron genes asociados a resistencia a rifampicina (Figura 12).

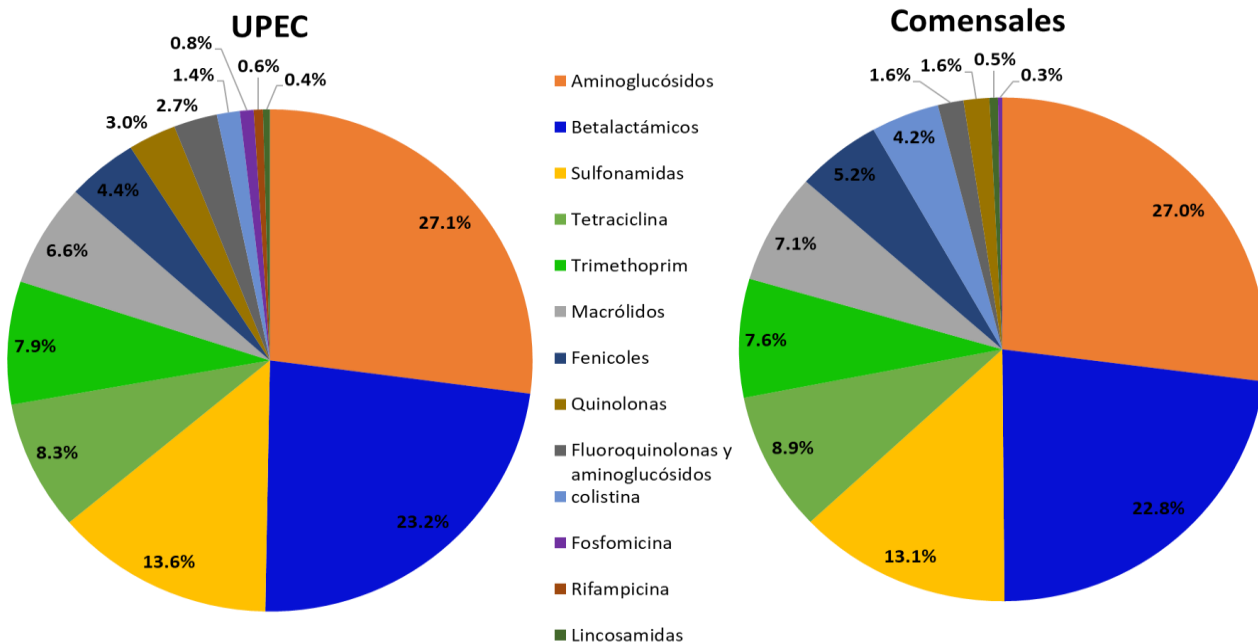


Figura 12. Prevalencia de genes de resistencia por familia de antibióticos en genomas UPEC=69 y comensales= 62. En ambos tipos de genomas predominaron los genes asociados a resistencia a aminoglucósidos y betalactámicos y un porcentaje bastante similar frente a los demás antimicrobianos. Genes que codifican para resistencia a rifampicina solo fueron detectados en genomas UPEC (0.6%).

Se detectaron 21 variantes de genes asociados a resistencia a aminoglucósidos, siendo las más predominantes: *aph(3'')-Ib* (42%), *aph(6)-Id* (42%), *aadA1* (40.6%), *aadA5* (33.3%), *aac(3)-IId* (23.2%) y *aadA2* (20.3%) en UPEC y *aph(3'')-Ib* (46.2%), *aph(6)-Id* (46.2%) y *aadA5* (21.2%) en comensales. 51 variantes de betalactamasas fueron detectadas entre ambos tipos de genomas, las más frecuentes fueron *bla_{TEM-1B}* (63.8% UPEC y 48.1% comensales), *bla_{CTX-M-15}* (24.6% UPEC y 13.5% comensales) y *bla_{OXA-1}* (18.8% UPEC y 13.5% comensales).

Se encontraron 17 mutaciones cromosómicas diferentes en los genes *gyrA*, *parE*, *parC* y *prmB*, las más frecuentes fueron en *gyrA* S83L y D87N en ambos tipos de genomas (62.1% y 49.4% en UPEC y 35.3% y 23.5% en comensales respectivamente); seguida de las mutaciones en *parC* S80I y E84V en UPEC (52.9% y 17.2% respectivamente) y S80I en 23.5% en comensales. Las mutaciones en *parE* I529L y S458A fueron más frecuentes en genomas UPEC 17.2% y 19.5%.

11.8 Estructura poblacional de ST131

Con base a los resultados de genotipificación y de genes de resistencia, se hizo el análisis de la estructura poblacional de los genomas ST131 estudiados de acuerdo a lo reportado en la literatura (Tabla 9), observando que 19 genomas pertenecieron a la secuencia tipo 131, de los cuales 16 fueron UPEC y 3 fueron genomas comensales.

De acuerdo con las características visualizables en la tabla 10, se clasificaron en los clados A, B, C0, C1 y C2. Dentro de este grupo de genomas clasificados, sólo un genoma, clasificado en C2, tuvo un *fimH* distinto (*fimH1196*); sin embargo, coincidió con las demás características del clado, como son el serotipo O25:H4 y la presencia de BLEE (CTX-M-15). 6 genomas UPEC a pesar de ser ST131 no pudieron ser clasificados dentro de estos clados, 5 de estos fueron *fimH30*, pero no portaron las betalactamasas típicas de los clados C1 y C2, portaron TEM-1B; un genoma tuvo *fimH30* y no portó ninguna BLEE; sin embargo, fue resistente a fluoroquinolonas por mutaciones cromosómicas (Figura 13).

Tabla 9. Características de la estructura poblacional de ST131

| Clado | Serotipo | Alelo <i>fimH</i> predominante | Sinónimo de clado | Perfil de resistencia |
|-------|----------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|
| A | O16:H5 | 41 | - | - |
| B | O25:H4 | 22 | - | - |
| C0 | O25:H4 | 30 | H30 | - |
| C1 | O25:H4 | 30 | R1 | FQ, BLEE (CTX-M-14 o CTX-M-27) |
| C2 | O25:H4 | 30 | Rx | FQ, BLEE (CTX-M-15) |

-: no tiene, FQ: fluoroquinolonas, BLEE: β -lactamasas de espectro extendido

Tabla modificada de Pitout & Finn, 2020.

Tabla 10. Características poblacionales de genomas UPEC y comensales ST131 de este estudio

| Cepa | Serotipo | Fim H | Sinónimo de clado | Resistencia plasmídica a FQ | Resistencia cromosómica a FQ | BLEE- Cromosómicas | BLEE- Plasmídicas | CLADO |
|-------------|----------|-------|-------------------|---|---|--------------------|-------------------------|-------|
| SE15 | O16:H5 | 41 | NA | | <i>parE</i> 1529L | | | A |
| SA186 | O25:H4 | 22 | NA | | <i>gyrA</i> S83L | | TEM-1B | B |
| 81009 | O25:H4 | 30 | R1 | | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | | CTX-M-27 | C1 |
| THO-015 | O25:H4 | 30 | R1 | | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | | CTX-M-27, CTX-M-44 | C1 |
| 4.4 | O25:H4 | 30 | R1 | | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | | CTX-M-27, TEM-1B | C1 |
| 2/0 | O25:H4 | 30 | Rx | | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | CTX-M-15 | TEM-1B | C2 |
| 4/0 | O25:H4 | 30 | Rx | <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | | CTX-M-15, OXA-1 | C2 |
| EC958 | O25:H4 | 30 | Rx | <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | CMY-23 | CTX-M-15, TEM-1B, OXA-1 | C2 |
| JJ1887 | O25:H4 | 30 | Rx | <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> , <i>qepA</i> 1 | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | CTX-M-15 | TEM-1B, OXA-1 | C2 |
| O25b:H4 | O25:H4 | 1196 | Rx | <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | CTX-M-15, OXA-1 | | C2 |
| S65EC | O25:H4 | 30 | Rx | | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | CTX-M-15 | TEM-1B | C2 |
| uk_P46 | O25:H4 | 30 | Rx | | <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | | CTX-M-15, TEM-1B, OXA-1 | C2 |

En negritas: genomas comensales, NA: No aplica, FQ: fluorocinolonas, BLEE: β-lactamasas de espectro extendido.
?: No clasificable por las características citadas

Tabla 10. Características poblacionales de genomas UPEC y comensales ST131 de este estudio

| Cepa | Serotipo | Fim H | Sinónimo de clado | Resistencia plasmídica a FQ | Resistencia cromosómica a FQ | BLEE- Cromosómicas | BLEE- Plasmídicas | CLADO |
|-------------|----------|-------|-------------------|---|---|--------------------|-------------------------|-------|
| SE15 | O16:H5 | 41 | NA | | <i>parE</i> 1529L | | | A |
| SA186 | O25:H4 | 22 | NA | | <i>gyrA</i> S83L | | TEM-1B | B |
| 81009 | O25:H4 | 30 | R1 | | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | | CTX-M-27 | C1 |
| THO-015 | O25:H4 | 30 | R1 | | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | | CTX-M-27, CTX-M-44 | C1 |
| 4.4 | O25:H4 | 30 | R1 | | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | | CTX-M-27, TEM-1B | C1 |
| 2/0 | O25:H4 | 30 | Rx | | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | CTX-M-15 | TEM-1B | C2 |
| 4/0 | O25:H4 | 30 | Rx | <i>aac</i> (6')- <i>lb-cr</i> | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | | CTX-M-15, OXA-1 | C2 |
| EC958 | O25:H4 | 30 | Rx | <i>aac</i> (6')- <i>lb-cr</i> | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | CMY-23 | CTX-M-15, TEM-1B, OXA-1 | C2 |
| JJ1887 | O25:H4 | 30 | Rx | <i>aac</i> (6')- <i>lb-cr</i> , <i>qepA</i> 1 | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | CTX-M-15 | TEM-1B, OXA-1 | C2 |
| O25b:H4 | O25:H4 | 1196 | Rx | <i>aac</i> (6')- <i>lb-cr</i> | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | CTX-M-15, OXA-1 | | C2 |
| S65EC | O25:H4 | 30 | Rx | | <i>parE</i> 1529L, <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | CTX-M-15 | TEM-1B | C2 |
| uk_P46 | O25:H4 | 30 | Rx | | <i>parC</i> S801, E84V, <i>gyrA</i> S83L, D87N | | CTX-M-15, TEM-1B, OXA-1 | C2 |

En negritas: genomas comensales, NA: No aplica, FQ: fluorocinolonas, BLEE: β-lactamasas de espectro extendido.
?: No clasificable por las características citadas

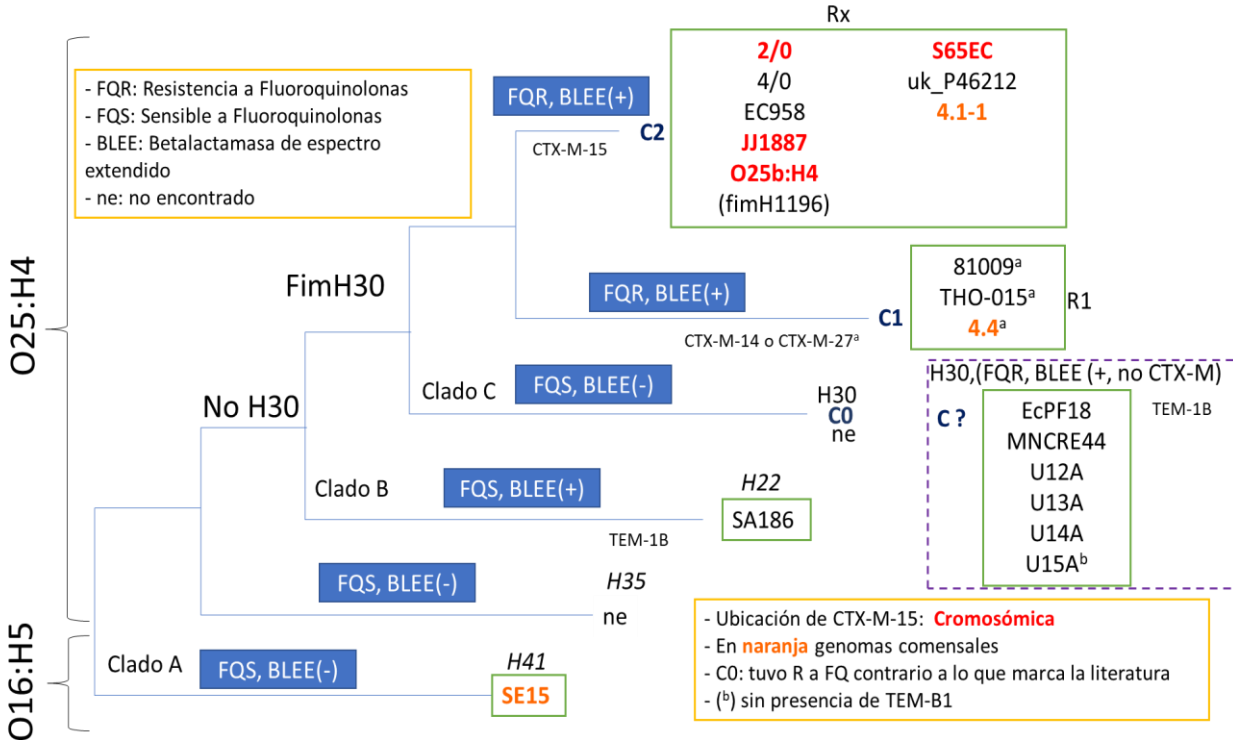


Figura 13. Estructura poblacional de genomas UPEC= 16 y comensales= 3 ST131 encontrados en este estudio, realizado manualmente. Dentro del clado A solamente se encontró un genoma comensal (SE15); en el clado B se encontró un genoma UPEC (SA186), *fimH22* y BLEE TEM-1B; en el clado C0 o H30 no se encontró ninguna cepa; en el clado C1 o R1 se encontraron dos genomas UPEC (81009 y THO-015) y un comensal (4.4) todas portaron CTX-M-27; en el clado C2 o Rx, se encontraron ocho genomas UPEC y un genoma comensal, 4 de los genomas UPEC portaron la CTX-M-15 en el cromosoma, además el genoma UPEC O25b:H. Destaca el grupo de cepas encerrada con línea discontinua, que porta otro tipo de BLEE (TEM-1B, con excepción de U15A) y que poseen otras características de la cepas con ST131 como *fimH-30* y serotipo O25:H4.

11.9 Elementos genéticos móviles/movilizables presentes dentro de los genomas UPEC y comensales de *E. coli*.

Mediante la plataforma Mobile Element Finder se detectaron entre los genomas UPEC= 87 y comensales= 85, 5 tipos de elementos móviles/movilizables (Secuencias de inserción (IS), Transposones (Tn), Elementos Conjugativos Integrativos (ICE), Repeticiones invertidas miniatura (MITE) y Tn compuestos (ComTn). Adicionalmente, se detectó la integrasa tipo 1 (IntI1) mediante PCR *in silico*. La distribución de estos fue muy similar entre ambos tipos de genomas (Figura 14). Las secuencias de inserción fueron predominantes en ambos tipos de genomas (69.5% UPEC y 71.8% comensales) y los Elementos Conjugativos Integrativos fueron los que menos se detectaron (0.6% UPEC y 0.4% comensales).

Los Tn e IntI1 fueron encontrados principalmente en plásmidos (ver más adelante los resultados), los demás elementos se encontraron de manera frecuente dentro del cromosoma bacteriano.

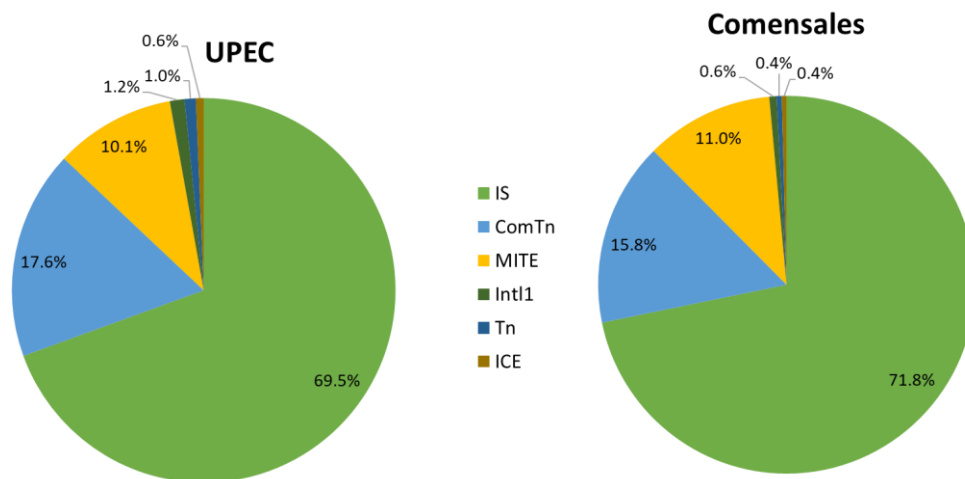


Figura 14. Tipos de elementos genéticos móviles/Movilizables encontrados en genomas UPEC= 87 y comensales= 85, se detectó con mayor frecuencia IS, se observa que el porcentaje de los elementos genéticos móviles/movilizables es similar entre ambos tipos genomas.

IS: Secuencias de inserción; **Tn:** Unidad Transposón; **ICE:** Elementos conjugativos integrativos; **IntI1:** integrasa clase 1; **MITE:** Repeticiones invertidas miniatura, **ComTn:** Tn compuestos.

11.10 Búsqueda de plásmidos

El número de plásmidos detectados entre los genomas fue muy similar: se encontraron 233 plásmidos en 72 genomas UPEC y 227 en 67 genomas comensales; los genomas UPEC portaron de 1 a 13 plásmidos, el número máximo de plásmidos fue encontrado en un solo genoma UPEC EC931, en los comensales se encontró de 1 a 10 plásmidos por genoma, siendo el genoma comensal SCU-106 el de mayor número de plásmidos con 10 de ellos.

El 55.8% de los plásmidos presentes en los genomas UPEC y 51.5% de los genomas comensales, pudieron ser tipificados de acuerdo a los replicones contenidos en la herramienta usada. Se detectaron 27 replicones diferentes; sin embargo, un porcentaje de ambos tipos de genomas no pudo ser tipificado a través de la herramienta utilizada.

Cabe destacar que la mayoría de los genes ARA estuvieron codificados en plásmidos (82.3% de 708 genes en genomas de orina y 84.5% de 382 en genomas comensales), sin embargo, existió un porcentaje que se encontró codificado en el cromosoma (15.2% en genomas de orina y 13.2% en genomas comensales) al igual que un pequeño porcentaje de genes ARA de los cuales existía una copia tanto en cromosoma como en plásmido (2.5% genomas de orina y 2.0% genomas comensales). Contrariamente los genes asociados a factores de virulencia que se encontraron predominantemente en el cromosoma tanto en genomas de orina como comensales (93.1% y 92.3% respectivamente) y menos del 10% se encontró codificado en plásmido (6.3 y 7.4 % genomas de orina y comensales respectivamente); al igual que los genes ARA sólo un porcentaje pequeño de factores de virulencia se encontró tanto en cromosoma como en plásmido (0.6% genomas de orina y 0.3% genomas comensales).

Los replicones detectados con mayor frecuencia fueron para UPEC IncFII 14.2% (33 plásmidos), IncFIB 10.7% (25 plásmidos), IncFIA 8.2% (19 plásmidos), e IncI1-1 5.6% (13 plásmidos) y en los genomas comensales IncFII 10.1% (23 plásmidos), IncFIB 7.5% (17 plásmidos), Col 6.6% (15 plásmidos) e IncFIA 5.3% (12 plásmidos). La presencia de estos plásmidos se relacionó con genes asociados a resistencia a antimicrobianos en ambos tipos de genomas (IncFII-NDM-5 en ambos tipos de genomas e IncFII-CTX-M15 y OXA-1 en UPEC; así como IncFIB-CTX-M15 y OXA-1 e IncFIA-CTX-M27 en los plásmidos de genomas comensales) (Figura 15).

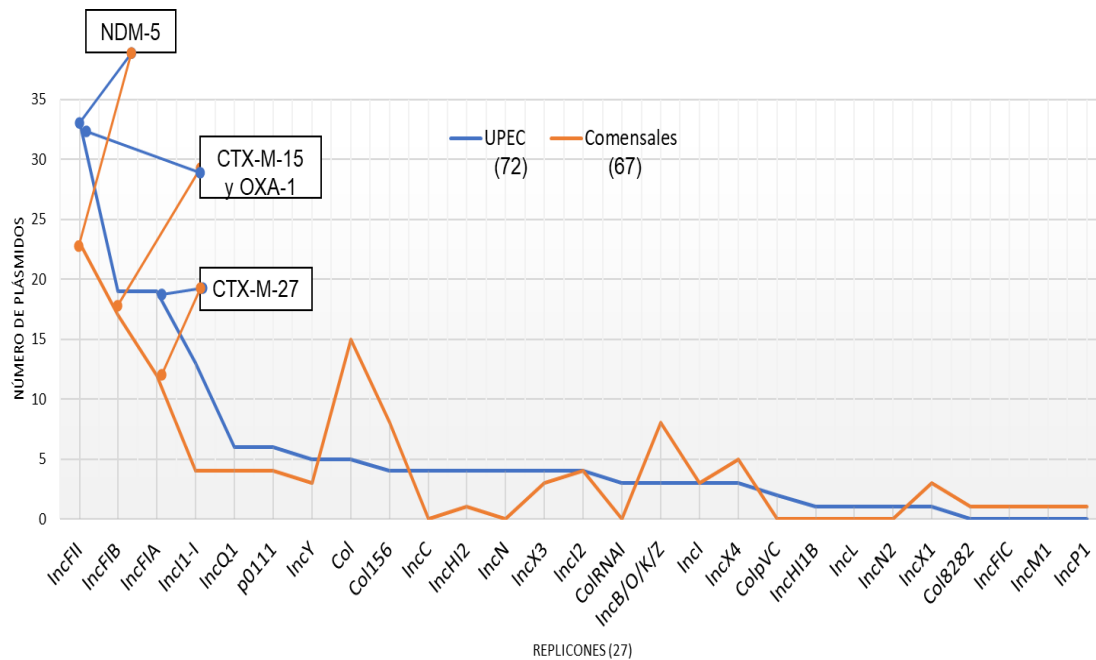


Figura 15. Replicones detectados a través de PlasmidFinder en los plásmidos de UPEC y de genomas comensales. En ambos tipos de genomas se observó con mayor frecuencia los plásmidos del grupo de incompatibilidad IncF que además se relacionaron con ciertos genes asociados a resistencia a antimicrobianos

11.11 Análisis de integrones clase 1

En 28 genomas UPEC y 16 genomas comensales se detectó la presencia de *intl1*; detectando un total de 36 integrones en genomas UPEC y 18 integrones en genomas comensales. De acuerdo a la estructura prototípica descrita en la literatura del integrón tipo 1 (Figura 16) dentro de la región variable de todos los integrones, se encontraron 23 genes ARA (Figura 17) en diferentes combinaciones, siendo más frecuentes *aadA2* con el 35.1% y *drfA12* en un 37.8% en genomas UPEC, y *aadA5* y *drfA17* en un 33.3% cada uno en genomas comensales.

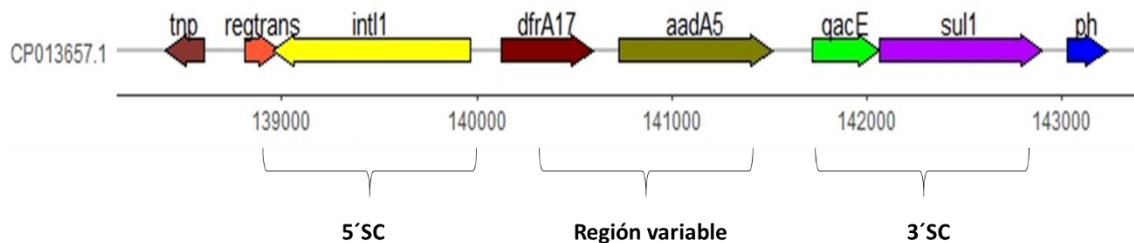


Figura 16. Estructura prototípica de integrón clase 1, encontrado en genoma UPEC uk_P46212 codificado en un plásmido IncFII, se observa la secuencia 5' conservada (5' SC), la región variable y la secuencia 3' conservada (3' SC).

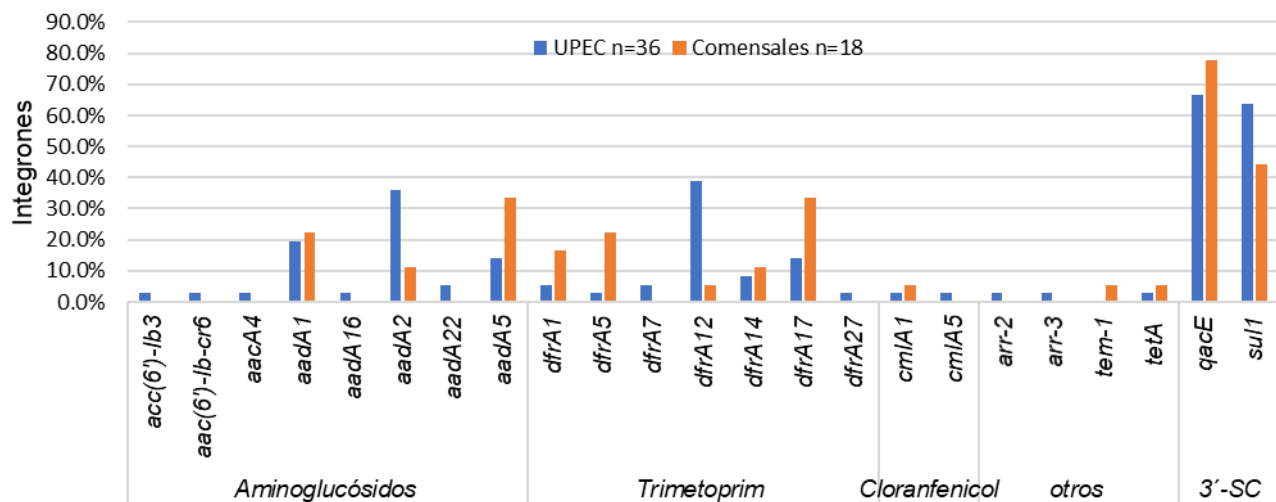


Figura 17. Genes ARA identificados en integrones de genomas UPEC= 36 y comensales= 18 y porcentaje de integrones con el extremo 3' SC. Los genes que portaron los integrones principalmente fueron asociados acetilasas (*aac*), adenilasas (*aad*), dihidrofolato reductasas (*drfA*), bombas de eflujo de cloranfenicol (*cmlA*), ribosiltransferasas (*arr*) solo detectadas en integrones de genomas UPEC, una betalactamasa (*tem-1*) encontrada en un solo genoma comensal, bombas de eflujo de tetraciclina (*tetA*) y la secuencia conservada 3' (3'-SC) que contiene un gen de resistencia que confiere resistencia a los antisépticos (*qacE*) y dihidropteroato sintasa (*sul1*).

En los 44 genomas (UPEC y comensales) que se les detectó *intl1* se observaron 8 patrones de combinación de genes asociados a resistencia a antimicrobianos contenidos en la región variable del integrón (A, B, C, D, E, F, G, H) (Anexo B), la presencia de mayor diversidad de genes asociados a resistencia a antimicrobianos (ARA) en los integrones detectados en los genomas UPEC, se relacionó con el mayor contenido de genes resistencia encontrados a través de ResFinder.

El número de genes asociados a resistencia en la región variable fue de 1 a 4 genes, los integrones que portaban 2 genes ARA en la región variable fueron los más frecuentes dentro en ambos tipos de genomas en UPEC, 19 (35.2%) y 12 (22.2%) en comensales, se encontraron 16 (29.6%) y 6 (11.1%) integrones que contenían un solo gen ARA en UPEC y comensales respectivamente; un integrón (1.8%) porto cuatro genes ARA en dicha región (UPEC Y5, localizado en cromosoma).

Estos integrones se detectaron principalmente en plásmidos del tipo IncF (51.8%, 28 integrones); sin embargo, algunos de ellos se encontraron localizados en el cromosoma bacteriano (13%) (Tabla 11) e incluso se encontraron genomas con más de un integrón: el genoma UPEC 190 con dos integrones (localizados en plásmido IncFII e IncA/C2 cada uno), BH100Lsubstr.MG2017 con dos integrones (localizados en cromosoma ambos), Combat11I9 con dos integrones (localizados en plásmido IncFIB e IncHI2A ambos), EC1515 con dos integrones (localizados en plásmido IncFIB e IncI1) y XH990 con dos integrones (localizados uno en cromosoma y uno en plásmido IncHI2A) y UPEC EC974 con tres integrones (localizados uno en IncFIB, IncI1 y en el cromosoma); en los genomas comensales incluso se encontraron dentro del mismo plásmido; YJ1 que portó en un plásmido IncFIB con dos integrones localizados en las regiones 73716-76949 y 84111-87319 pb), P225M porto dos integrones en plásmidos distintos (IncFIC Y un no tipificado).

Tabla 11. Localización de patrones observados en los integrones de clase 1 en los genomas UPEC y comensales

| Patrón | Contenido de genes de resistencia | Localización en UPEC (n= 36) | Localización en Comensales (n= 18) |
|-----------------|-----------------------------------|---|---|
| A | <i>dfrA17, aadA5</i> | IncFIA (3), IncFII (2) | IncFII (2), IncFIB (3), Col156 |
| B | <i>dfrA12, aadA2</i> | IncFIA (2), IncFIB (4), IncHI2A (2), NT, Cromosoma | - |
| C | <i>aadA1</i> | Cromosoma (2) | - |
| D | <i>dfrA17</i> | IncFIB, IncFIC | - |
| E | <i>aadA22</i> | IncI1 (2) | - |
| F | <i>dfrA14</i> | IncFIB, IncHI2A | - |
| G | <i>aadA1, dfrA1</i> | - | IncI1, IncFIB (2) |
| H | <i>dfrA5</i> | - | IncFII, IncB/O/K/Z |
| Arreglos únicos | variable | Cromosoma (4), IncA/C2 (3), IncFII (4), IncHI2A, ColIRNAI | IncFII (2), IncFIB, IncFIC, IncHI2A, Col156, NT |

(n): Número de integrones, -: Ausente

12. DISCUSIÓN

Es importante mencionar que debido a la pandemia por SARS-Cov2 las instalaciones de la Universidad han permanecido cerradas desde marzo de 2020, por lo que solo fue posible obtener resultados de los dos primeros objetivos del protocolo original.

Debido a esto, se decidió plantear objetivos de trabajo *in silico*, mediante el estudio bioinformático que aquí se describe, enfocado a obtener resultados del análisis de secuencias de genomas completos de cepas de *E. coli* aisladas de orina, así como genomas de cepas comensales depositadas en el GenBank, sin perder el enfoque del estudio original, el cual fue caracterizar y comparar el contenido de marcadores moleculares de virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles que portan las cepas tanto de origen urinario como de origen fecal, y obtener información sobre el potencial genómico que poseen este tipo de cepas para poder adaptarse a diferentes microambientes, como son el intestinal y tracto urinario.

Por lo anterior, se describen resultados de ensayos experimentales solo de los objetivos 1 y 2, y los resultados *in silico* de los objetivos alcanzados mediante el estudio bioinformático.

12.1 Análisis experimental

12.1 Estudios experimentales

En las cepas de *E. coli* aisladas de orina se observó un alto porcentaje de resistencia a TE, 83.3%, CIP, 66.7% y NA, 66.7%; mientras que el total de cepas analizadas (n=6) fue resistente a AMP, esta alta tasa de resistencia ya ha sido reportada por Ballesteros *et al.*, en 2020, en dos Estados de la República Mexicana (Puebla, n=25 y Sonora, n=50) donde el 100% de las cepas analizadas mostró este fenotipo en este tipo de población (mujeres embarazadas); en comparación con los aislados de *E. coli* obtenidos por Forson, *et al.*, en 2019 que fueron altamente resistentes a AMP (79.3%) sin llegar al más alto porcentaje; sin embargo, para TE (70.7%) el porcentaje de resistencia fue parecido al obtenido en este estudio. Con respecto al ácido nalidíxico el porcentaje (48.8%), estuvo ligeramente más elevado en nuestro estudio comparado con el análisis de Forson *et al.*. Como se evidenció en el perfil de susceptibilidad, se observaron cepas con fenotipos de resistencia a 3 o más familias de antibióticos, por lo cual, con base a los criterios de Magiorakos, *et al.*, el 100% de las cepas de *E. coli* aisladas de orina fueron MDR. Por otro lado, el 100% de las cepas de orina ensayadas fueron sensibles para la FOS y C.

Las condiciones fisiológicas de la población de estudio limitan las opciones terapéuticas a emplear para tratar la ITU, las cuales al no tratarse adecuadamente podrían complicarse desarrollando desde una pielonefritis, un parto prematuro ó tener un recién nacido con bajo peso (Tchente *et al.*, 2019). Existen ciertos factores de riesgo de infección por una cepa MDR, por lo que para no favorecer la aparición de estas es importante tenerlos en cuenta en el momento de indicar un tratamiento empírico (Klein & Hultgren, 2020); en este estudio ninguna de las pacientes refirió

ser hospitalizada con anterioridad; sin embargo, refirieron haber cursado por otro tipo de infección, algunas de las cuales fueron tratadas con betalactámicos (AMP, AMC) (comunicación personal, datos no mostrados).

En cuanto a las cepas de *E. coli* aisladas de heces el fenotipo de susceptibilidad se observó de manera similar al obtenido de las cepas de orina, es decir, hubo alto porcentaje de resistencia a AMP (62.5%), CIP (50%) y NA (62.5%), a diferencia de las cepas aisladas de orina se observó un alto porcentaje de resistencia a STX, 54.2%; contrariamente en un meta-análisis realizado por Nji *et al.*, en 2021 (n=33), que abarca cepas desde 1989 a 2019, reveló más altos porcentajes de resistencia frente a STX (78%), AMP (72%), TE y trimetoprim 67%.

Es importante mencionar que, dentro de estas cepas, aisladas del tracto gastrointestinal y siendo consideradas como comensales, se encontraron fenotipos de susceptibilidad resistente a los carbapenémicos y FOS, que incluso en el meta-análisis de 2021 (Nji, *et al.*, 2021), no fue detectada ninguna cepa comensal con estas resistencias. Dentro de estas cepas más del 50% fue MDR de acuerdo con los criterios de Magiorakos; bajo otros criterios Nkansa-Gyamfi *et al.*, han clasificado a través de un meta-análisis de 14336 aislados con un 27% de cepas comensales MDR, mucho menor a lo encontrado en este estudio.

Analizando la cepa aislada de orina y la (s) cepa (s) aislada de las heces de la misma paciente, hubieron cepas pareadas que mostraron una gran similitud en el fenotipo de susceptibilidad como la cepa 1-O de orina y la cepa 1-H de la paciente 1 que solo difirieron en el fenotipo de susceptibilidad *versus* amikacina (AN), de igual manera la cepa 5-H6 sólo difirió en el fenotipo *versus* ampicilina-ácido clavulánico (AMC) de la cepa aislada de orina; sin embargo, las cepas 5-H2, 5-H3, 5-H4, 5-H7 y 5-H8 247-H5, tuvieron el mismo fenotipo de susceptibilidad con su respectiva cepa de orina. Esto nos indica que probablemente, la cepa recuperada de heces sea la misma que ocasionó la infección en el tracto urinario o al menos comparten características de susceptibilidad. En el estudio realizado por Parikumsil *et al.*, en 2017, en Tailandia, al determinar los fenotipos y genotipos de virulencia en cepas obtenidas de hisopado rectal y aisladas de ITU del mismo paciente encontraron 8 de 90 aislados que tenían idéntico serogrupo, filogrupo y perfil de virulencia asociado, por lo que si se continuara con el análisis de las cepas de este estudio podría brindar mayor información para establecer si hay alguna relación entre las cepas comensales como potenciales desencadenadoras de ITU o si pudiera ser un microorganismo transitorio colonizante.

Fenotípicamente, el 23% (7/23) de las cepas estudiadas fueron productoras de BLEE, estas cepas se distribuyeron dentro de un grupo de cepas aisladas de una misma paciente, la paciente 5; la 5-O, cepa aislada de orina y seis de ocho cepas aisladas de sus heces (5-H2, 5-H3, 5-H4, 5-H6, 5-H7 y 5-H8) y que además como se ha mencionado, compartieron algunas de ellas el fenotipo de susceptibilidad. La aparición de las BLEE es una preocupación latente en salud pública en México, se reportó en 2018 por Galindo en Oaxaca un 31.2% (90/288) de cepas productoras de BLEE, sin embargo, para 2019 en un estudio realizado en Guadalajara por Sierra *et al.*, el 48.52% de los aislados de *E. coli* fue productor de BLEE (477/983); en este

trabajo el porcentaje menor de cepas productoras de BLEE pudo deberse al número de cepas incluidas en el estudio, no obstante, no se resta importancia al tratarse de cepas provenientes de mujeres embarazadas, en este tipo de pacientes una de las primeras opciones terapéuticas considerados seguros son los antibióticos betalactámicos (Bookstaver *et al.*, 2015), al haber presencia de BLEE, se excluye este tipo de antibiótico para el tratamiento y se tiene que recurrir a otro tipo de antibióticos con la evaluación de riesgo beneficio para ambos individuos (madre-hijo). Esto denota la importancia de realizar una prescripción médica orientada por un antibiograma, ya que, por la fisiología de la paciente, las opciones terapéuticas se limitan y al no contar con un antibiograma que oriente sobre la susceptibilidad del agente causal, se podría retrasar el proceso de recuperación de la paciente.

12.2 Análisis *in silico*

Es bien conocido que *E. coli* es un microorganismo de origen comensal que forma parte de la microflora intestinal pero también se le ha dado importancia al papel de este microorganismo como reservorio y participante en la diseminación de la resistencia a antibióticos (Nji *et al.*, 2021; Nkansa-Gyamfi *et al.*, 2019); sin embargo, se han dejado de lado otras características que podrían potenciar la probabilidad de que este tipo de cepas puedan causar enfermedad en un individuo, como se ha sugerido que en las ITU's provocadas por *E. coli*, participan cepas colonizantes de intestino que se adquieren por la vía fecal-perineal-uretral alcanzando tracto urinario. Existen pocos estudios enfocados a demostrar este hecho y a determinar el potencial genético de virulencia, resistencia y elementos genéticos de movilidad de estos genes, entre cepas comensales y cepas aisladas de ITU, que apoyen este hecho. Debido a esto, nuestro objetivo principal fue estudiar *in silico*, mediante herramientas bioinformáticas, este bagaje de genes que portan los genomas completos de cepas de *E. coli* depositados en el banco de datos estadounidense, aislados de orina humana proveniente de ITU y de heces de personas asintomáticas, con la finalidad de hacer una comparación entre ellos y documentar información sobre la virulencia, resistencia y presencia de elementos genéticos móviles, en cepas comensales de *E. coli* que le otorguen el genotipo necesario para ascender, colonizar tracto urinario, adaptarse y provocar una infección.

En el transcurso de los años, se ha documentado, que existen ciertas características de tipificación de cepas aisladas de ITU, como son la presencia de los serogrupos O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O22, O25, O75 y O83, que se han asociado con uropatogenicidad (Prakapaite *et al.*, 2019), también se ha definido la prevalencia de ciertos filogrupos entre los aislados uropatogénicos, así como secuencias tipo (ST).

En este estudio se encontraron varias semejanzas en cuanto a características tipificables de los genomas UPEC y los comensales. En los genomas comensales se encontraron incluso serogrupos (O2:H4, O2:H6) frecuentemente observados en aislados que se han asociado a ITU, mientras que en los genomas UPEC no se encontraron.

La distribución de los genomas entre los filogrupos conocidos coincide con lo descrito en la literatura, la cual reporta que se han encontrado cepas UPEC entre

los filogrupos B2 y D principalmente y a las cepas comensales entre A y B1 (Clermont, *et al.*, 2020), en este estudio los genomas UPEC se encontraron mayoritariamente entre los filogrupos B2 (48.3%), seguido del filogrupo A (14.9%) y entre los genomas comensales el filogrupo predominante fue el A (38.8%); sorprendentemente un porcentaje importante de estos genomas se encontró en el filogrupo B2 (31.8%), Como se sabe el filogrupo B2 es caracterizado por ser uno de los filogrupos catalogado como de alta virulencia por su fondo filogenético, siendo que en este estudio, en ambos tipos de genomas se reflejó esa relación filogrupo B2-contenido de virulencia, al encontrar que los genomas UPEC y comensales pertenecientes a este filogrupo tuvieron un contenido promedio de 30.9 y 29.0 factores de virulencia respectivamente, en comparación con los otros filogrupos que tuvieron un contenido menor de genes de virulencia (UPEC 14.9-26.0, comensales 13.5-22.8).

Existe una asociación entre las cepas ST131, filogrupo B2, serotipo O16:H5 u O25b:H4 y la presencia de BLEE (CTX-M-14 o CTX-M-27, CTX-M-15) (Pitout & Finn, 2020) que ha definido la estructura poblacional de esta ST distribuyéndola en clados (A, B, C0, C1 y C2). En este estudio los genomas analizados de UPEC cumplieron con estas características en un 62.5% (10/16 UPEC ST131) y sorprendentemente, los comensales en un 100% (3/3 comensales ST131); sin embargo, el 37.5% de los genomas UPEC no pudieron ser clasificados en esta estructura debido a la variación de la BLEE que portaban (5 genomas) o a la ausencia de la BLEE (1 genoma), por lo que se podría sugerir un clado nuevo dentro de esta estructura.

Además de compartir estas características de tipificación, al realizar la comparación de tamaños y contenidos de los genomas, se observó que existió entre ellos diferencia estadísticamente significativa; sin embargo, con el análisis realizado se muestra que, a pesar de esta diferencia, los genomas comensales comparten varias semejanzas con los genomas UPEC respecto a factores de virulencia, elementos genéticos móviles/movilizables e incluso los genes asociados a resistencia a antibióticos, lo cual llama la atención, indicando que las cepas comensales poseen el bagaje de genes que las capacitan para provocar una ITU.

Como se sabe las cepas UPEC se ubican dentro de la clasificación de cepas extraintestinales patógenas de *E. coli* (ExPEC) debido a como lo indica su nombre, tienen el potencial de desencadenar una infección fuera del nicho intestinal. Se han descrito ciertos marcadores moleculares asociados a factores de virulencia para clasificar a una cepa de *E. coli* como ExPEC; con base a estos se encontró que solamente el 37.9% de los genomas UPEC cumplían con características de ExPEC según los criterios de Picard *et al.* y Johnson *et al.*, basados en la presencia de al menos 2 de 5 genes (*iuc*, *kpsMIII*, *afa/dr*, *pap*, *sfa*) que determinan el potencial de virulencia intrínseco de las cepas extraintestinales de *E. coli*, mientras que las comensales el 20% también mostró la presencia de estos factores. Los genomas estudiados con características ExPEC, se encontraron con mayor frecuencia dentro del filogrupo B2 en ambos tipos de cepas, que es el filogrupo dentro del cual se encuentran más frecuentemente las cepas aisladas de ITU.

El proceso de adhesión es un paso determinante para la patogénesis de las ITU, la cual se inicia con la adhesión de UPEC al tejido urinario, que se logra a través de distintas adhesinas fimbriales y no fimbriales las cuales se expresan en la superficie de la bacteria; se sabe que el pangenoma de *E. coli* codifica para 38 pilis tipo chaperona-usher (CUP) y que un genoma individual puede portar hasta 12 operones CUP (Klein & Hultgren, 2020).

En los genomas estudiados se encontró que todas las cepas codifican para al menos dos factores asociados a adherencia, encontrándose un máximo de 9 factores de adherencia en el genoma UPEC CLSC36. El 100% de los genomas tanto UPEC como comensales presentó el pili hemorrágico (*hcp*); el segundo factor más frecuente asociado a virulencia fue el pili común de *E. coli* (*Ecp*) (95.4% UPEC y 88.2% comensales); lo que llama la atención, ya que ambos factores se han asociado al patotipo enterohemorrágico de *E. coli* (*EHEC*). En el estudio de Rendón *et al.*, en 2007, sugieren que la presencia del *Ecp* es una característica común de cepas colonizantes del intestino y otros tejidos, además del patotipo *EHEC*. En 2020, Paniagua, *et al.*, reportan la presencia del *Ecp* en el 100% de los genomas UPEC analizados (24 genomas), siendo considerado uno de los genes conservados dentro de los genomas de *E. coli*. El pili tipo 1 (*fimAICDFGH*) es considerado como parte del core genoma de *E. coli* (Alam Parvez & Rahman, 2019), en este análisis, no se encontró el operón completo en todos los genomas, solo el 52.9% UPEC y 51.8% comensales tuvieron el operón completo; sin embargo, la presencia de la adhesina FimH de este pili se detectó en más del 90% de ambos tipos de genomas (90.8% UPEC y 91.8% comensales). Se ha demostrado experimentalmente que la presencia del pili tipo 1, es necesario para la trascendencia de una ITU (Poole, *et al.* 2017), por lo que llama la atención que la detección de los operones completos no pudo alcanzarse, tal vez debido a las mutaciones que estos pudieran tener, lo cual reduce el porcentaje de identidad y por lo tanto no entró en el rango de identidad establecido en este estudio como criterio. Las cepas que no portaron el operón completo del pili tipo 1, tuvieron la presencia de otras fimbrias (*Ecp*, *EaeH*) que pudieron favorecer la progresión de la ITU, o al igual otro elemento de la triada ecológica, como la condición del hospedero, pudo haber sido el favorecedor para la progresión de esta.

El pili P, es frecuentemente buscado para caracterizar a las cepas UPEC provenientes de ITU de vías altas (invasiva o pielonefritis); en este estudio de los 8 genomas UPEC provenientes de pielonefritis, según la base de datos, solo 2 de ellos (CFT073 y 536) portaron el operón completo del pili P (*papIBAHCDJKEFG*); no obstante, la adhesina *papG* fue detectada en 32 genomas UPEC (incluyendo los 6 genomas restantes provenientes de pielonefritis según la base de datos) y en 12 genomas comensales. De acuerdo a la literatura la variante alélica de *papG* puede ser útil para la caracterización de cepas al relacionar a la variante alélica *papGII* con aislados provenientes de pielonefritis y la variante *papGIII* con aislados provenientes de cistitis (Wiles, *et al.*, 2008); sin embargo, al comparar la información clínica disponible, se encontró que en algunos casos esta asociación no se cumple y probablemente la evolución clínica de los pacientes portadores de esas cepas fue influenciada por las características propias de los pacientes, o por algún otro componente de la triada ecológica. En el estudio realizado por Biggel *et al.*, en 2020,

describen que de 385 genomas UPEC invasivos, 333 genomas portaron *papGII*; sin embargo, sólo en 35 genomas pudieron resolver el contexto genético completo debido a los datos de secuenciación de lectura corta; de estos, seis genomas tuvieron más de un locus para este gen; en los genomas considerados como no invasivos (n= 337) detectaron 52 genomas con esta variante e incluso entre los genomas comensales usados como referencia fue detectada la misma variante (35 de 185 genomas). En nuestro estudio, la falta de datos clínicos no permitió clasificar adecuadamente los genomas UPEC en invasivos (aislados de pielonefritis) y no invasivos (aislados de cistitis), aunque se emplearon genomas cerrados y con ello se redujo la posibilidad de falsos negativos, como se menciona anteriormente sólo en dos genomas se detectó el operón completo *papG*.

De manera sorprendente los genomas comensales que portaron la adhesina *papG* (n=12) presentaron la variante alélica GII, lo que denota el potencial que poseen este tipo de cepas para ser la fuente causal de ITU con una probable evolución a una forma clínica más severa, en este caso una pielonefritis.

En 2020 Tseng *et al.*, relacionan la presencia de *papGII* y *fimH* como una sinergia para el establecimiento de la pielonefritis; es decir, la presencia de ambas adhesinas en las cepas favorecerá hacia esta evolución clínica en modelos murinos. En nuestro estudio se encontró que las cepas que portaban *papGII* (UPEC=16, comensales=11) también contenían la adhesina FimH, y que en su mayoría coincidían con el tipo de ITU a la que ha sido asociada (cistitis o pielonefritis); la sinergia de la variante alélica *papGIII* con *fimH in vitro*, aún no ha sido estudiada; con los datos obtenidos en nuestro estudio se observó que los genomas que portaban *papGIII* (UPEC=16, comensales=1), con excepción de un genoma (UPEC EC931), también portaban la adhesina FimH.

La segunda clase de factores de virulencia encontrados con mayor frecuencia fueron los asociados a la captación de hierro, dentro de estos, destacó la presencia del sistema de captación de hierro y manganeso (*sit*) que se encontró con mayor frecuencia en los genomas UPEC (72.4%) que en los genomas comensales (52.9%). Se sabe que el manganeso ayuda a *E. coli* a tolerar el estrés oxidativo activando Mn-SOD (Super óxido dismutasa dependiente de manganeso) y metalizando enzimas dañadas dependientes de hierro (Robinson *et al.*, 2018), por lo que la presencia de este sistema favorece la supervivencia de UPEC en el tracto urinario y se encuentra con mayor prevalencia dentro de este tipo de genomas; otros factores de virulencia con mayor frecuencia en ambos tipos de genomas fueron el sistema de captación de hierro en forma hemo (*chu*), al igual que la presencia de los sideróforos Yersiniabactina (*ybt*) y aerobactina (*iuc*).

Varios autores han estudiado el papel que desempeñan los sideróforos en la patogénesis de una ITU, en el estudio de Su *et al.*, en 2016, mediante deleciones de operones en *E. coli* 83972 (UPEC) asocian la biosíntesis del sideróforo salmoquelina como principal modulador de virulencia de UPEC; por otro lado, en el estudio realizado por Khasheii *et al.*, en el mismo año destacan al sideróforo yersiniabactina (68.2%, 118 de 170 de los genomas) como el principal sideróforo presente en cepas UPEC tal como en el análisis aquí presentado, donde el sideróforo más frecuente encontrado fue yersiniabactina en genomas UPEC (70.1%) y en comensales (54.1%).

Más del 80% de los genomas UPEC (71/87) y más del 60% (55/85) de los comensales portaron al menos un sideróforo; esta diferencia de la presencia de los sistemas de captación de hierro puede deberse a la diferencia de nichos que colonizan de origen las cepas, ya que el nicho intestinal es muy rico en nutrientes y en el tracto urinario existe una limitación de los mismos, provocando que *E. coli* al encontrarse en estas condiciones llegue a expresar hasta los cuatro sideróforos conocidos (Mann, *et al.* 2017). En este estudio se encontró que el 11.2% de genomas UPEC portaron 3 sideróforos (Salmoquelina, Aerobactina y Yersiniabactina), incluso el 10.9% de comensales provenientes de un nicho considerado rico en nutrientes portaron hasta 3 sideróforos (el operón completo de enterobactina no está incluida en ninguna de las plataformas empleadas). Cabe destacar que entre los genomas UPEC existió un porcentaje de ellos (11.5%) que no portó ningún sideróforo de los contenidos en las bases de datos empleadas, ni algún otro sistema de adquisición de hierro.

Entre los autotransportadores (AT) destacó la presencia de dos de ellos: EhaB y UpaG, en ambos tipos de genomas. Los AT juegan un papel importante en la patogénesis de UPEC, se asocian a la adherencia a células epiteliales y a las proteínas de la matriz extracelular; además de que parecen participar en la formación de biofilm, invasión y conferir resistencia al suero (William O'Hara *et al.*, 2019). UpaG, identificada en *E. coli* CFT073, media la adhesión a las células epiteliales de la vejiga humana, además de ser un probable antígeno protector en ExPEC (Totsika, *et al.* 2012); en este estudio se encontró con mayor frecuencia este factor de adhesión incluso por encima del pili tipo 1. En cuanto a EhaB se han detectado parálogos en EPEC, EHEC y ExPEC (Wiles, *et al.*, 2008) y se ha observado su participación en la formación de biopelícula en UPEC CFT073 (Vo, *et al.* 2017); este gen se detectó en más del 80% en ambos tipos de genoma (UPEC 93.1% y comensales 87.1%), sin embargo, pocas veces es tamizado en estudios *in vitro*, estos a menudo se centran en la búsqueda de genes *csg* codificante de fimbria curli, las cuales se asocian también con la formación de biofilm (Terlizzi, *et al.*, 2017; Etefia & Ben, 2020).

En la actualidad se ha evaluado la caracterización de los aislados UPEC mediante los criterios de Spurbeck *et al.*, con base a la presencia de 3 o más de los 4 factores de virulencia (*chuA*, *fyuA*, *yfcV*, *vat*) propuestos para definir a una cepa como UPEC. Flament, *et al.*, dentro de sus cepas de estudio encuentra que el 100% de ellas cumplen este criterio (46 cepas, España); sin embargo, Nascimento, *et al.*, reporta que hay una gran variabilidad de la presencia de estos genes dentro de sus cepas de estudio, encontrando que el 22.2% de ellas no portan ningún gen de los propuestos. En nuestro estudio, se encontró que, aunque más del 50% de los genomas UPEC cumplió con la presencia de 3 o más de estos genes, no todas las cepas provenientes de orina cumplen este criterio; el 29.9% de ellos portó sólo dos de estos e incluso el 17.2% no portó ningún gen de los mencionados. Dentro de los genomas comensales, era esperado que existiera un porcentaje más alto que no cumpliera este criterio (64.7%); sin embargo, un porcentaje de los genomas comensales portó estos genes, evidenciando el potencial uropatogénico bajo este criterio.

Otra manera de caracterizar a las cepas UPEC, ha sido mediante la presencia de islas de patogenicidad (Pathogenicity Island, PAI) que portan las cepas uropatogénicas prototipo (CFT073, 536 y J96), lo cual se ha realizado por años *in vitro* con la amplificación de ciertos marcadores genéticos contenidos en estas PAI, propuestos por Sabaté *et al.*, sin embargo, en la búsqueda *in vitro* de estas PAI, no se determina la integridad de la PAI completa dentro de las cepas. Al paso de los años se han estudiado más características de las PAI's como son la composición de la secuencia que difiere en el contenido GC, presencia de ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) cercano a los extremos de la región y río arriba secuencias directas repetidas (DR) (da Silva Filho *et al.*, 2018); estas se han usado en herramientas bioinformáticas para que a través de estas puedan detectarse las PAI's cuando se cuenta con el genoma completo de la cepa en estudio.

Este estudio *in silico*, permitió la detección de la PAI de manera más completa la cual fue evidenciada identificando la presencia de los marcadores de virulencia, en su totalidad en algunos casos, localizados en una misma región dentro del genoma, así como la diferencia del contenido de GC entre la región donde se localizan los factores de virulencia característicos y el resto del genoma. Así, este análisis demostró que el 74% de los genomas UPEC contenían alguna PAI, mientras que en los genomas comensales el 55% tuvo alguna PAI, contrariamente a varios estudios *in vitro* donde determinan que más del 90% de los genomas UPEC porta al menos una PAI (Samei, *et al.*, 2016; Ghosh & Mukherjee, 2019).

Existen estudios que asocian cierta prevalencia de las diferentes PAI's dentro de las cepas UPEC; en 2018, Najafi, *et al.*, encontraron con mayor frecuencia la PAI 536-IV (77.14%, 108/140) que se caracteriza por portar los genes que codifican para el sideróforo yersiniabactina y que se ha evidenciado en estudios *in vitro* a través del gen *irp2*; en nuestro análisis este gen se encontró en más del 70% (64/87) de genomas UPEC, como en el estudio de Najafi, *et al.*, y más del 50% (47/85) en genomas comensales; al realizar la revisión del contenido de GC en el contexto genético se encontró el operón completo del sideróforo yersiniabactina y se observó que el contenido de GC en esa región estaba por encima del contenido promedio del genoma; sin embargo se encontró que más del 80% de ambos tipos de genomas que portaban este operón estaban flanqueados por tARN por lo que se interpretó como positiva la presencia de la PAI 536-IV. Es de hacerse notar también, que en 4 genomas UPEC se encontró de manera inesperada que los marcadores de esta PAI se encontraban en la misma región de marcadores de otra PAI, la PAI 536-III. Esta "fusión" de PAI's fue observada en 22 genomas UPEC y en 4 genomas comensales y tuvieron un tamaño desde 37.6 a 152.6 Kb y contenían marcadores de las PAI's CFT073-I, 536-I, 536-II y J96-II, en diferentes combinaciones.

Otra de las PAI con mayor frecuencia en ambos tipos de genomas fue la CFT073-I, dentro de la cual se encuentran codificados la α -hemolisina, fimbria P, aerobactina, Iha, Ag43 y cápsula K2 (Desvaux *et al.*, 2020; Najafi *et al.*, 2018; Östblom *et al.*, 2011). Esta PAI es una de las más frecuentes encontradas en cepas UPEC; en 2017, Samei *et al.*, describen la presencia *in vitro* de esta, en más del 40% de sus cepas UPEC (60/150 cepas), además en un estudio realizado *in silico* en 2020 por

Cruz, *et al.*, describen a esta como la más frecuente en un 73.1% de las cepas (67 cepas) de manera completa y parcialmente en 26.9%.

Dentro del análisis presentado, también se encontraron en ambos tipos de genomas factores de virulencia asociados a otros patotipos de *E. coli*. Los factores de virulencia más frecuentes fueron los asociados al patotipo EHEC, y como se ha mencionado destacó la presencia de los factores de adherencia como el pili común de *E. coli* (*Ecp*) y el pili hemorrágico (*Hcp*), seguido de la fimbria *elf* (44.8% UPEC y 56.5% Comensales) y el autotransportador *cah* (>35% en ambos tipos); también se detectaron en menos frecuencia otros factores asociados a virulencia de este patotipo (datos no mostrados). Igualmente, la presencia de factores de virulencia de patógenos intestinales de *E. coli* (IPEC) ha sido estudiada en cepas UPEC; en 2014 Toval, *et al.*, reportan 28 de 265 aislados con la presencia de al menos un factor de virulencia de las cepas IPEC. Actualmente a un aislado con presencia fenotípica/genotípica de determinantes de diferentes patotipos de *E. coli* es nombrada como, “*E. coli* heteropatogénica” (Lara, *et al.* 2017); cabe destacar que dentro de los genomas analizados en este estudio, ninguno portó los marcadores característicos de los patotipos DEC, por lo que no se reportaron híbridos.

En los genomas analizados se encontraron con mayor frecuencia genes asociados a resistencia a β -lactámicos, detectando 51 variantes de estos; igualmente, a pesar de no ser empleados como tratamiento de elección en ITU no complicada, se detectó una alta prevalencia de genes de resistencia a los aminoglucósidos (31 variantes); esto podría complicar la prescripción de un tratamiento efectivo, ya que se acude a los aminoglucósidos junto con una cefalosporina de segunda generación o en su caso gentamicina y amoxicilina en ITU complicada como tratamiento empírico de este tipo de infección uropatogénica (Kot, 2019). El tercer grupo de genes con mayor prevalencia dentro de los genomas fueron los asociados a resistencia a sulfonamidas: 60 genomas UPEC y 32 comensales portaron genes *sul1*, *sul2* y/o *sul3*, y en 22 (22/28) genomas UPEC y en 10 (10/16) genomas comensales, *sul1* estuvo asociado como componente de integrones de clase 1, al igual en un genoma comensal (1/16) se encontró *sul3* en un integrón. Los integrones juegan un papel importante en la diseminación de la resistencia a antimicrobianos, no solamente por que portan el gen *sul1*, como parte de su estructura clásica, sino también por la propiedad que tienen estos de poder integrar otros genes de resistencia dentro de su estructura y así contribuir a la MDR de las cepas.

Una diferencia observada en el contenido de genes ARA en los genomas fue la presencia de genes que confieren resistencia a rifampicina (*arr*) estos solo fueron detectadas dentro de los genomas UPEC (0.6% 4/708); la rifampicina es usada como profiláctico de infecciones estafilococales y meningococales; aunque de manera más común, junto con otras drogas, para el tratamiento de la tuberculosis, también tiene acción frente a *E. coli* y *pseudomonas* (Weinstein & Zaman, 2019), la presencia de genes *arr-2* ha sido asociada con la presencia de transposones e integrones (Baysarowich *et al.*, 2008), en nuestro estudio, se encontró en UPEC 190 dentro de un integrón clase 1 contenido en un plásmido IncA/C2. La variante *arr-3* se ha descrito también como un gen casete de integrones de clase 1 (Da Fonseca *et al.*, 2008), en nuestro estudio solo uno de estos genes estuvo asociado

a un integrón en el cromosoma de UPEC Y5, a demás dentro de este genoma se detectó otra copia del gen *arr-3* en el cromosoma; en el genoma UPEC EC25 este gen está contenido en un plásmido IncQ1. La prevalencia de genes *arr* en el género *Escherichia* es mínima en el estudio de Morgado *et al.*, en 2021 describen que de 21,302 genomas analizados solo 442 (2%) portaban algún gen *arr*, tal como en este estudio donde solo 3 genomas (3.4%) de los 87 analizados porto dicho gen.

Un porcentaje de estos genes de resistencia detectados a través de Resfinder estuvieron asociados a elementos genéticos movilizables (EGM) (UPEC 31.8% de genes ARA y comensales 32.2% de genes ARA) en ambos tipos de genomas, principalmente a secuencias de inserción (IS) que de igual manera fueron los EGM más frecuentes entre ambos tipos de genomas. Además, algunos genes de resistencia (orina 12.1% de genes ARA y comensales 10.2% de genes ARA) encontrados estuvieron relacionados con la presencia de integrones de clase 1 que han sido descritos como los integrones más prevalentes dentro de aislados clínicos (Partridge *et al.*, 2018), estos fueron principalmente genes asociados a resistencia a aminoglucósidos y trimetoprim; cabe destacar que si bien algunos de los integrones mostraron la estructura clásica (extremo 3' y 5' conservado), existieron otros que presentaban alguna variación de esta. Al igual que en el estudio *in vitro* realizado por Khan *et al.*, 2018, más del 50% de los integrones localizados contaban con los tres elementos característicos de estos (*intl1*, *qacE* y *sul1*) y más del 80% de estos integrones se encontraron codificados en plásmidos tipo IncF (30/47). Como se ha demostrado experimentalmente, estos plásmidos tienen capacidad conjugativa lo que favorece la diseminación de estos elementos (Poey *et al.*, 2019). Los genes casetes dentro de la región variable fueron diversos, observándose 8 arreglos (*dfrA17- aadA5*, *dfrA12- aadA2*, *aadA1*, *dfrA17*, *aadA22*, *dfrA14*, *aadA1-dfrA1*, *dfrA5*) en 35 integrones y 19 casetes únicos; 6 (*dfrA17- aadA5*, *dfrA12- aadA2*, *aadA1*, *dfrA17*, *aadA1- dfrA1*, *dfrA5*) de los 8 arreglos de casetes ya han sido reportados en el estudio de Weiss *et al.*, en 2018, en cepas de origen fecal e incluso en cepas no humanas. De manera importante dentro de los genomas comensales, el 32.2% (123/382) de los genes ARA estuvieron asociados a estos EGM, lo que denota el potencial de las cepas comensales de poder desempeñar un papel de suma importancia en la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos.

Los plásmidos han desempeñado un papel clave en la diseminación de los genes ARA, uno de los genes de resistencia más comunes transportados por estos son las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE); estos elementos no solo permiten el intercambio interespecie, sino también intraespecie y ha sido observado entre *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Lerminiaux & Cameron, 2019). En este análisis, se encontró que más del 80% de los genes ARA fueron portados en plásmidos; con la herramienta usada se detectaron 27 replicones y en ambos tipos de genomas el número de plásmidos fue muy similar (UPEC= 233 y comensales=227); sin embargo, un porcentaje de los replicones no pudo ser clasificado según la base de datos utilizada, por lo que se denominaron como no tipificables (NT). El tipo de replicón plasmídico más frecuente fue el IncFII, en general los plásmidos tipo IncF han sido frecuentemente encontrados dentro de la

familia *Enterobacteriaceae*, y se asocian con portar BLEE tipo CTX-M (Partridge *et al.*, 2018). En nuestro análisis se encontró variedad de genes ARA en los plásmidos de este tipo, como es el caso del plásmido FII detectado en ambos tipos de genomas pero que en genomas comensales portaban NDM-5 y en genomas UPEC: CTX-M-15 y OXA-1; esta misma combinación de genes fue observada en los plásmidos FIB en los genomas comensales; al igual se detectó CTX-M-27 codificada en plásmidos tipos FIA en ambos tipos de genomas. Se observó una diferencia en la prevalencia de los plásmidos tipo Col, estos se encontraron dentro de los genomas comensales con mayor frecuencia, este tipo de plásmidos son conocidos por portar factores asociados a virulencia en cepas ExPEC (McKinnon, *et al.*, 2020). Con estos resultados se confirma el potencial de las cepas comensales de poder ser desencadenantes de ITU y reservorios de genes de multidrogorresistencia.

Con base a la presencia de BLEE en ambos tipos de genomas y de acuerdo al tipo de estas, se hizo una correlación dentro de los genomas ST131 para determinar su estructura poblacional que según la literatura se clasifica de acuerdo a serogrupo O25:H4 u O16:H5, *fimH30* o *fim* no H30 (H22, H35, H41) y la presencia de CTX-M-14 o CTX-M-15 (Johnson *et al.*, 2016; Pitout & DeVinney, 2017). Con este análisis se determinó que no todos los genomas, a pesar de cumplir algunas de estas características, pueden clasificarse a través de unas cuantas semejanzas, si bien, al paso de los años estas se han encontrado en este tipo de cepas, es importante actualizar o ampliar los criterios para clasificarlas con fines epidemiológicos geográficos a nivel mundial.

13. CONCLUSIONES

Análisis experimental

- El análisis experimental reveló que el perfil fenotipo de resistencia es compartido entre algunas cepas *E. coli* provenientes de un mismo hospedero de dos fuentes diferentes (orina e intestino).

Análisis *in silico*

- No existe un marcador genotípico propio del patotipo UPEC que pueda diferenciarlo de las cepas comensales,
- Con base a los resultados *in silico*, la denominación de UPEC como patotipo seguiría siendo principalmente por su origen urinario.
- Si bien existen ciertos factores de virulencia que se encuentran con mayor frecuencia en los aislados de infecciones de vías urinarias, estos no se encuentran en el 100% de cepas, por lo que tratar de caracterizar sólo mediante factores de virulencia a este patotipo, resulta poco útil.

- La caracterización de los aislados uropatogénicos debería darse por un conjunto de características dependientes tanto de la bacteria como de los signos clínicos que causan en el hospedero.
- Tanto el estudio experimental como el estudio *in silico*, y de acuerdo con la literatura, se continúa aceptando que las cepas comensales actúan como reservorios de un arsenal de factores tanto de virulencia, resistencia a antimicrobianos y elementos genéticos móviles, que la dotan de potencial genético para poder trascender de una cepa comensal a una cepa que provoca una ITU.

14. PERSPECTIVAS

Continuar el estudio *in vitro* de estas cepas (y en lo posible ampliar el número de éstas) para obtener más información acerca de otras características genotípicas (secuencia tipo, perfil de virulencia, relación clonal, perfil plásmidico) que pueden compartir entre ellas sirviendo de sustento para reafirmar la vía de transmisión fecal-perineal-uretral de la ITU.

La información obtenida se puede usar como base para el diseño de una PCR multiplex con el fin de ayudar a la caracterización de los genomas UPEC.

Diseñar un nuevo método (como el *primer walking*) para la detección de PAI's en los estudios experimentales que permita asegurar que los marcadores buscados forman parte de esta y no son sólo un gen dentro del genoma.

15. BIBLIOGRAFÍA

- Adamus-Białek, W., Baraniak, A., Wawszczak, M., Głuszek, S., Gad, B., Wróbel, K., Bator, P., Majchrzak, M., & Parniewski, P. (2018). The genetic background of antibiotic resistance among clinical uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Molecular Biology Reports*, 45(5), 1055–1065. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4254-0>
- Aijuka, M., Santiago, A. E., Girón, J. A., Nataro, J. P., & Buys, E. M. (2018). Enteroaggregative *Escherichia coli* is the predominant diarrheagenic *E. coli* pathotype among irrigation water and food sources in South Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 278, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.018>
- Alam Parvez, S., & Rahman, D. (2019). Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli*. In *Microbiology of Urinary Tract Infections - Microbial Agents and Predisposing Factors*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79557>
- Ballesteros-Monrreal, M. G., Arenas-Hernández, M. M. P., Enciso-Martínez, Y., Martínez-De la Peña, C. F., Rocha-Gracia, R. D. C., Lozano-Zaraín, P., Navarro-Ocaña, A., Martínez-Laguna, Y., & de la Rosa-López, R. (2020). Virulence and resistance determinants of uropathogenic *Escherichia coli* *Escherichia coli* strains isolated from pregnant and non-pregnant women from two states in Mexico. *Infection and Drug Resistance*, 13, 295–310. <https://doi.org/10.2147/IDR.S226215>
- Barrios-Villa, E., Cortés-Cortés, G., Lozano-Zaraín, P., Arenas-Hernández, M. M. D. L. P., Martínez De La Peña, C. F., Martínez-Laguna, Y., Torres, C., & Rocha-Gracia, R. D. C. (2018). Adherent/invasive *Escherichia coli*(AIEC) isolates from asymptomatic people: New *E. coli* ST131 O25:H4/H30-Rx virotypes. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0295-4>
- Baysarowich, J., Koteva, K., Hughes, D. W., Ejim, L., Griffiths, E., Zhang, K., Wright, G. D. (2008). Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: Structure and diversity of Arr. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(12), 4886–4891. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711939105>
- Beghain, J., Bridier-Nahmias, A., Nagard, H. Le, Denamur, E., & Clermont, O. (2018). ClermonTyping: An easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microbial Genomics*, 4(7), 1–8. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000192>
- Behzadi, P. (2020). Classical chaperone-usher (CU) adhesive fimbriome: uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and urinary tract infections (UTIs). In *Folia Microbiologica* (Vol. 65, Issue 1, pp. 45–65). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00719-x>
- Behzadi, P., & Behzadi, E. (2017). Uropathogenic escherichia coli: An ideal resource

- for DNA microarray probe designing. *Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 10209 LNCS, 12–19. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56154-7_2
- Ben Sallem, R., Ben Slama, K., Rojo-Bezares, B., Porres-Osante, N., Jouini, A., Klibi, N., Boudabous, A., Sáenz, Y., & Torres, C. (2014). IncI1 plasmids carrying blaCTX-M-1 or blaCMY-2 genes in *Escherichia coli* from healthy humans and animals in Tunisia. *Microbial Drug Resistance*, 20(5), 495–500. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0224>
- Biggel, M., Xavier, B. B., Johnson, J. R., Nielsen, K. L., Frimodt-Møller, N., Matheussen, V., Goossens, H., Moons, P., & Van Puyvelde, S. (2020). Horizontally acquired *papGII*-containing pathogenicity islands underlie the emergence of invasive uropathogenic *Escherichia coli* lineages. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19714-9>
- Blanco, J., Mora, A., Mamani, R., López, C., Blanco, M., Dahbi, G., Herrera, A., Marzoa, J., Fernández, V., De La Cruz, F., Martínez-Martínez, L., Alonso, M. P., Nicolas-Chanoine, M. H., Johnson, J. R., Johnston, B., López-Cerero, L., Pascual, Á., & Rodríguez-Baño, J. (2013). Four main virotypes among extended-spectrum- β -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: Bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3358–3367. <https://doi.org/10.1128/JCM.01555-13>
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., ... Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
- Brandon Bookstaver, P., Bland, C. M., Griffin, B., Stover, K. R., Eiland, L. S., & McLaughlin, M. (2015). A review of antibiotic use in pregnancy. In *Pharmacotherapy* (Vol. 35, Issue 11, pp. 1052–1062). Pharmacotherapy Publications Inc. <https://doi.org/10.1002/phar.1649>
- Brown-jaque, M., Hurtado, J. C., Moreno, A., Muniesa, M., Vila, J., Espinal, P., & Navarro, F. (2020). Cross-Comparison of Commensal and Clinical Isolates for Diversity of Plasmids in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *February*, 1–8.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F. M., & Hasman, H. (2014). *In Silico* detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3895–3903.
<https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
- Chang, Y., Siu, L. K., Wang, J., Wu, T., Chuang, Y., Lin, J., & Lu, P. (2019). Resistance mechanisms and molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Escherichia coli* in Taiwan , 2012-2015. 2113–2123.
- Chervy, M., & Barnich, N. (2020). Adherent-Invasive *E. coli* : Update on the Lifestyle of a Troublemaker in Crohn ' s Disease. 1–34.
- City, Y., Boroumand, M., Sharifi, A., Manzouri, L., & Khoramrooz, S. S. (2019). Evaluation of *pap* and *sfa* Genes Relative Frequency P and S Fimbriae Encoding of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Hospitals and Medical Evaluation of *pap* and *sfa* Genes Relative Frequency P and S Fimbriae Encoding of Uropathogenic *Escherichia coli*. September.
<https://doi.org/10.5812/ircmj.89499>
- Clermont, O., Dixit, O. V. A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., & Gordon, D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental Microbiology*, 21(8), 3107–3117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>
- CLSI. (2019). CLSI M100-ED29 : 2019 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing , 29th Edition. In *Clsi*.
- Cosentino, S., Voldby Larsen, M., Møller Aarestrup, F., & Lund, O. (2013). PathogenFinder - Distinguishing Friend from Foe Using Bacterial Whole Genome Sequence Data. *PLoS ONE*, 8(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077302>
- Da Cruz Campos, A. C., Couto, N., Lucas da Silva Andrade, N., Friedrich, A. W., de Paula Rosa, A. C., Vieira Damasco, P., Chlebowicz-Fliss, M. A., & Rossen, J. W. A. (2020). Virulence and resistance properties of *E. coli* isolated from urine samples of hospitalized patients in Rio de Janeiro, Brazil – The role of mobile genetic elements. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(8).
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151453>
- Da Fonseca, É. L., Freitas, F. D. S., De Amorim, J. C., & Vicente, A. C. P. (2008). Detection of new *arr-4* and *arr-5* gene cassettes in clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* strains from Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(5), 1865–1867. <https://doi.org/10.1128/AAC.00017-08>
- Da Silva Filho, A. C., Raittz, R. T., Guizelini, D., De Pierri, C. R., Augusto, D. W., dos Santos-Weiss, I. C. R., & Marchaukoski, J. N. (2018). Comparative Analysis of Genomic Island Prediction Tools. *Frontiers in Genetics*, 9(December), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00619>
- De Souza da-Silva, A. P., de Sousa, V. S., Martins, N., da Silva Dias, R. C., Bonelli, R. R., Riley, L. W., & Moreira, B. M. (2017). *Escherichia coli* sequence type 73 as a cause of community acquired urinary tract infection in men and women in

- Rio de Janeiro, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(1), 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.024>
- Desvaux, M., Dalmasso, G., Beyrouthy, R., Barnich, N., Delmas, J., & Bonnet, R. (2020). Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 11(September). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02065>
- Dionisio, F., Zilhão, R., & Gama, J. A. (2019). Interactions between plasmids and other mobile genetic elements affect their transmission and persistence. *Plasmid*, 102(February), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2019.01.003>
- Douarre P-E, Mallet L, Radomski N, Felten A and Mistou M-Y (2020) Analysis of COMPASS, a New Comprehensive Plasmid Database Revealed Prevalence of Multireplicon and Extensive Diversity of IncF Plasmids. *Front. Microbiol.* 11:483. doi: 10.3389/fmicb.2020.00483
- El-Najjar, N. G., Farah, M. J., Hashwa, F. A., & Tokajian, S. T. (2010). Antibiotic resistance patterns and sequencing of class i integron from uropathogenic *Escherichia coli* in Lebanon. *Letters in Applied Microbiology*, 51(4), 456–461. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02926.x>
- Etefia, E. U., & Ben, S. A. (2020). Virulence Markers , Phylogenetic Evolution , and Molecular Techniques of Uropathogenic *Escherichia coli*. 13–22. <https://doi.org/10.4103/JNSM.JNSM>
- Flament-Simon, S. C., Nicolas-Chanoine, M. H., García, V., Duprilot, M., Mayer, N., Alonso, M. P., García-Meniño, I., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2020). Clonal structure, virulence factor-encoding genes and antibiotic resistance of *Escherichia coli*, causing urinary tract infections and other extraintestinal infections in humans in Spain and France during 2016. *Antibiotics*, 9(4), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040161>
- Flores-Encarnación, M., Nava-Nolazco, R. M., Aguilar-Gutiérrez, G. R., Espino-Benítez, A. S., Morales-Baéz, J. R., & Cabrera-Maldonado, C. (2019). The survival strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Current Research and Review*, 11(23), 6–9. <https://doi.org/10.31782/IJCRR.2019.11232>
- Forson, A. O., Tsidi, W. B., Adjei, D. N., Quarchie, M. N., & Nkrumah, N. O. (2019). *Escherichia coli* bacteriuria in pregnant women in Ghana : antibiotic resistance patterns and virulence factors. *BMC Research Notes*, 2018, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3989-y>
- Galindo-Méndez, M. (2018). Caracterización molecular y patrón de susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido en infección del tracto urinario adquirida en la comunidad. *Revista Chilena de Infectología*, 35(1), 29–35. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000100029>
- Garretto, A., Miller-Ensminger, T., Ene, A., Merchant, Z., Shah, A., Gerodias, A.,

- Biancofiore, A., Canchola, S., Canchola, S., Castillo, E., Chowdhury, T., Gandhi, N., Hamilton, S., Hatton, K., Hyder, S., Krull, K., Lagios, D., Lam, T., Mitchell, K., ... Putonti, C. (2020). Genomic Survey of *E. coli* From the Bladders of Women With and Without Lower Urinary Tract Symptoms. *Frontiers in Microbiology*, 11(September). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02094>
- Ghosh, A., & Mukherjee, M. (2019). Incidence of multidrug resistance, pathogenicity island markers, and pathoadaptive FimH mutations in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from asymptomatic hospitalized patients. *Folia Microbiologica*, 64(4), 587–600. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00685-4>
- Goh, K. G. K., Phan, M. D., Forde, B. M., Chong, T. M., Yin, W. F., Chan, K. G., Ulett, G. C., Sweet, M. J., Beatson, S. A., & Schembri, M. A. (2017). Genome-wide discovery of genes required for capsule production by uropathogenic *Escherichia coli*. *MBio*, 8(5), 1–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01558-17>
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Guneri, C. O., Koksal, F., Kizilyildirim, S., Bedir, B., & Nagiyev, T. (2020). The Distribution of Cytotoxic Necrotizing Factors (CNF-1, CNF-2, CNF-3) and Cytolethal Distending Toxins (CDT-1, CDT-2, CDT-3, CDT-4) in *Escherichia coli* Strains Isolated from Extraintestinal Infections and The Determination of Their Phylogenetic Relation. 1–26. <http://europepmc.org/abstract/PPR/PPR250940%0Ahttps://doi.org/10.21203/rs.3.rs-120529/v1>
- Haghighatpanah, M., & Mojtahedi, A. (2019). Characterization of antibiotic resistance and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from iranian inpatients with urinary tract infections. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2747–2754. <https://doi.org/10.2147/IDR.S219696>
- Hagos, D. G., Mezgebo, T. A., Berhane, S., & Medhanyie, A. A. (2019). Biofilm and hemagglutinin formation: A Hallmark for drug resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *BMC Research Notes*, 12(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4382-1>
- Hoepers, P. G., Silva, P. L., Rossi, D. A., Valadares Júnior, E. C., Ferreira, B. C., Zuffo, J. P., Koerich, P. K., & Fonseca, B. B. (2018). The association between extended spectrum beta-lactamase (ESBL) and ampicillin C (AmpC) beta-lactamase genes with multidrug resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from turkeys in Brazil. *British Poultry Science*, 59(4), 396–401. <https://doi.org/10.1080/00071668.2018.1468070>
- Jahandeh, N., Ranjbar, R., Behzadi, P., & Behzadi, E. (2015). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence genes: Invaluable approaches for designing dna microarray probes. *Central European Journal of Urology*, 68(4), 452–458. <https://doi.org/10.5173/cej.2015.625>

- Joensen, Katrine G., Tetzschner, A. M. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M., & Scheutz, F. (2015). Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(8), 2410–2426. <https://doi.org/10.1128/JCM.00008-15>
- Joensen, Katrine Grimstrup, Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R. S., Nielsen, E. M., & Aarestrup, F. M. (2014). Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(5), 1501–1510. <https://doi.org/10.1128/JCM.03617-13>
- Johansson, M. H. K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P., & Petersen, T. N. (2021). Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *76*(1), 101–109. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA390>
- Johnson, J. R., Gajewski, A., Lesse, A. J., & Russo, T. A. (2003). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* as a Cause of Invasive Nonurinary Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(12), 5798–5802. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5798-5802.2003>
- Johnson, T. J., Danzeisen, J. L., Youmans, B., Case, K., Llop, K., Munoz-Aguayo, J., Flores-Figueroa, C., Aziz, M., Stoesser, N., Sokurenko, E., Price, L. B., & Johnson, J. R. (2016). Separate F-Type Plasmids Have Shaped the Evolution of the H30 Subclone of *Escherichia coli* Sequence Type 131. *MSphere*, *1*(4), 1–15. <https://doi.org/10.1128/msphere.00121-16>
- Kalová, A., Gelbíčová, T., Overballe-Petersen, S., Litrup, E., & Karpíšková, R. (2021). Characterisation of colistin-resistant enterobacterales and *acinetobacter* strains carrying *mcr* genes from asian aquaculture products. *Antibiotics*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070838>
- Khan, A. U., Maryam, L., & Zarrilli, R. (2017). Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiology*, *17*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1012-8>
- Khan, F., Tabassum, N., Pham, D. T. N., Oloketuyi, S. F., & Kim, Y. M. (2020). Molecules involved in motility regulation in *Escherichia coli* cells: a review. *Biofouling*, *36*(8), 889–908. <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1826939>
- Khan, F. Z., Nawaz, T., Mirani, Z. A., Khan, S., Raza, Y., & Kazmi, S. U. (2018). Study of class 1 integrons in multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolated from different hospitals in Karachi. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *21*(10), 1079–1082. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2018.28807.6966>
- Khasheii, B., Anvari, S., & Jamalli, A. (2016). Frequency evaluation of genes encoding siderophores and the effects of different concentrations of Fe ions on growth rate of uropathogenic *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Microbiology*, *8*(6), 359–365.

- Kittana, H., Gomes-Neto, J. C., Heck, K., Geis, A. L., Segura Muñoz, R. R., Cody, L. A., Schmaltz, R. J., Bindels, L. B., Sinha, R., Hostetter, J. M., Benson, A. K., & Ramer-Tait, A. E. (2018). Commensal *Escherichia coli* Strains can promote intestinal inflammation via differential interleukin-6 production. *Frontiers in Immunology*, 9(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02318>
- Klein, R. D., & Hultgren, S. J. (2020). Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host–pathogen interactions and new treatment strategies. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 18, Issue 4). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0324-0>
- Koli, P., Fitzgerald, D., Adhya, S., & Kar, S. (2011). Conversion of Commensal. *MBio*, 2(5), 1–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00182-11>. Editor
- Kot, B. (2019). Antibiotic Resistance Among Uropathogenic *Escherichia coli*. *Polish Journal of Microbiology*, 68(4), 403–415. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-048>
- Kopotsa, K., Osei Sekyere, J., & Mbelle, N. M. (2019). Plasmid evolution in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* : a review. *Annals of the New York Academy of Sciences*. doi:10.1111/nyas.14223
- Lara, F. B. M., Nery, D. R., de Oliveira, P. M., Araujo, M. L., Carvalho, F. R. Q., Messias-Silva, L. C. F., Ferreira, L. B., Faria-Junior, C., & Pereira, A. L. (2017). Virulence markers and phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains with hybrid EAEC/UPEC genotypes recovered from sporadic cases of extraintestinal infections. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00146>
- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1355–1361. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
- Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 34–44. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
- López-Banda, D. A., Carrillo-Casas, E. M., Leyva-Leyva, M., Orozco-Hoyuela, G., Manjarrez-Hernández, Á. H., Arroyo-Escalante, S., Moncada-Barrón, D., Villanueva-Recillas, S., Xicohtencatl-Cortes, J., & Hernández-Castro, R. (2014). Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/959206>
- Luna-Pineda, V. M., Ochoa, S., Cruz-Córdova, A., Cázares-Domínguez, V., Vélez-González, F., Hernández-Castro, R., & Xicohtencatl-Cortes, J. (2018). Infecciones del tracto urinario, inmunidad y vacunación. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de Mexico*, 75(2), 67–78. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.M18000011>

- Luna-pineda, V. M., Reyes-grajeda, J. P., & Cruz-córdova, A. (2016). Dimeric and Trimeric Fusion Proteins Generated with Fimbrial Adhesins of Uropathogenic *Escherichia coli*. 6(October), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00135>
- MacFaddin Jean F.(2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana. ISBN: 950061572X, 9789500615723
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Manges, A. R. (2016). *Escherichia coli* and urinary tract infections: The role of poultry-meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.11.010>
- Mann, R., Mediati, D. G., Duggin, I. G., Harry, E. J., & Bottomley, A. L. (2017). Metabolic Adaptations of Uropathogenic *E. coli* in the Urinary Tract. 7(June). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00241>
- Matsui, Y., Riley, L. W., Hu, Y., Rubin, J., Souza, R., & Joy, D. A. (2020). Multilocus sequence typing of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infection patients and from fecal samples of healthy subjects in a college community. *March*, 1–9. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1032>
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A., & Davies, J. (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection: Integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1568–1574. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.6.1568-1574.2000>
- McKinnon, J., Roy Chowdhury, P., & Djordjevic, S. P. (2020). Molecular Analysis of an IncF ColV-Like Plasmid Lineage That Carries a Complex Resistance Locus with a Trackable Genetic Signature. *Microbial Drug Resistance*, 26(7), 787–793. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0277>
- Micenková, L., Bosák, J., Vrba, M., Ševčíková, A., & Šmajš, D. (2016). Human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains differ in prevalence of virulence factors, phylogroups, and bacteriocin determinants. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0835-z>
- Millán, Y., Araque, M., & Ramírez, A. (2020). Distribución de grupos filogenéticos, factores de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* uropatógena. *Revista Chilena de Infectología*, 37(2), 117–123. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182020000200117>
- Morales-Espinosa, R., Hernández-Castro, R., Delgado, G., Mendez, J. L., Navarro, A., Manjarrez, Á., & Cravioto, A. (2016). UPEC strain characterization isolated

- from Mexican patients with recurrent urinary infections. *Journal of Infection in Developing Countries*, 10(4), 317–328. <https://doi.org/10.3855/jidc.6652>
- Moreno, E., Andreu, A., Pérez, T., Sabaté, M., Johnson, J. R., & Prats, G. (2006). Relationship between *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in women and the dominant faecal flora of the same hosts. *Epidemiology and Infection*, 134(5), 1015–1023. <https://doi.org/10.1017/S0950268806005917>
- Morgado S, Fonseca É, Vicente AC. (2021) Genomic epidemiology of rifampicin ADP-ribosyltransferase (Arr) in the Bacteria domain. *Sci Rep*.11(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99255-3>
- Najafi, A., Hasanpour, M., Askary, A., Aziemzadeh, M., & Hashemi, N. (2018a). Distribution of pathogenicity island markers and virulence factors in new phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Folia Microbiologica*, 63(3), 335–343. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0570-3>
- Najafi, A., Hasanpour, M., Askary, A., Aziemzadeh, M., & Hashemi, N. (2018b). Distribution of pathogenicity island markers and virulence factors in new phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Folia Microbiologica*, 63(3), 335–343. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0570-3>
- Nascimento, J. A. S., Santos, F. F., Valiatti, T. B., Santos-Neto, J. F., Santos, A. C. M., Cayô, R., Gales, A. C., & Gomes, T. A. T. (2021). Frequency and diversity of hybrid *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections. *Microorganisms*, 9(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040693>
- Newell, D. G., & La Ragione, R. M. (2018). Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(May 2017), 49–71. <https://doi.org/10.1111/tbed.12789>
- Nichols KB, Totsika M, Moriel DG, Lo AW, Yang J, Worpel DJ, Rossiter AE, Strugnell RA, Henderson IR, Ulett GC, Beatson SA, Schembri MA. (2016). Molecular characterization of the vacuolating autotransporter toxin in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 198:1487–1498. doi:10.1128/JB.00791-15.
- Nielsen, D. W., Klimavicz, J. S., Cavender, T., Wannemuehler, Y., Barbieri, N. L., Nolan, L. K., & Logue, C. M. (2018). The impact of media, phylogenetic classification, and *E. coli* pathotypes on biofilm formation in extraintestinal and commensal *E. coli* from humans and animals. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00902>
- Nji, E., Kazibwe, J., Hambridge, T., Joko, C. A., Larbi, A. A., Dampsey, L. A. O., Nkansa-Gyamfi, N. A., Stålsby Lundborg, C., & Lien, L. T. Q. (2021). High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* from healthy human sources in community settings. *Scientific Reports*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82693-4>
- Nkansa-Gyamfi, N. A., Kazibwe, J., Traore, D. A. K., & Nji, E. (2019). Prevalence of multidrug-, extensive drug-, and pandrug-resistant commensal *Escherichia coli*

- isolated from healthy humans in community settings in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Global Health Action*, 12(S1). <https://doi.org/10.1080/16549716.2020.1815272>
- Nolan, L. K., Li, G., & Logue, C. M. (2015). Origin and Dissemination of Antimicrobial Resistance among Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 3(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0007-2012>
- Östblom, A., Adlerberth, I., Wold, A. E., & Nowrouzian, F. L. (2011). Pathogenicity island markers, virulence determinants malX and usp, and the capacity of *Escherichia coli* to persist in infants' commensal microbiotas. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2303–2308. <https://doi.org/10.1128/AEM.02405-10>
- Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S. C., & Colombel, J. (2017). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. 1–14. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314903>
- Paniagua-Contreras, G. L., Monroy-Pérez, E., Díaz-Velásquez, C. E., Uribe-García, A., Labastida, A., Peñaloza-Figueroa, F., Domínguez-Trejo, P., García, L. R., Vaca-Paniagua, F., & Vaca, S. (2019). Whole-genome sequence analysis of multidrug-resistant uropathogenic strains of *Escherichia coli* from Mexico. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2363–2377. <https://doi.org/10.2147/IDR.S203661>
- Parikumsil, N., Prapasawat, W., Siriphap, A., Chonsin, K., Theethakaew, C., Sukolrattanaeetee, N., Ratchatanapha, D., Siripanichgon, K., & Suthienkul, O. (2017). Virulence factors and molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from paired urine and rectal swab samples of patients with urinary tract infections in thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 48(5), 1029–1041.
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), 1–61. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2019). Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options Drugs. *Springer International Publishing*. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01180-3>
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahim, N., Bingen, E., Elion, J., & Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection? *Infection and Immunity*, 67(2), 546–553. <https://doi.org/10.1128/iai.67.2.546-553.1999>
- Pitout, J. D. D., & DeVinney, R. (2017). *Escherichia coli* ST131: A multidrug-resistant clone primed for global domination. *F1000Research*, 6(0), 1–7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10609.1>
- Pitout, J. D. D., & Finn, T. J. (2020). The evolutionary puzzle of *Escherichia coli*

- ST131. *Infection, Genetics and Evolution*, 81(February), 104265. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104265>
- Poey, M. E., Azpiroz, M. F., & Laviña, M. (2019). On sulfonamide resistance, sul genes, class 1 integrons and their horizontal transfer in *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 135(April), 103611. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103611>
- Poole, N. M., Green, S. I., Rajan, A., Vela, L. E., Zeng, X. L., Estes, M. K., & Maresso, A. W. (2017). Role for FimH in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* invasion and translocation through the intestinal epithelium. *Infection and Immunity*, 85(11). <https://doi.org/10.1128/IAI.00581-17>
- Prakapaite, R., Saab, F., Planciuniene, R., Petraitis, V., Walsh, T. J., Petraitiene, R., Semoskaite, R., Baneviciene, R., Kalediene, L., & Kavaliauskas, P. (2019). Molecular characterization of uropathogenic *Escherichia coli* reveals emergence of drug resistant o15, o22 and o25 serogroups. *Medicina (Lithuania)*, 55(11). <https://doi.org/10.3390/medicina55110733>
- Pruthvishree, B. S., Vinodh Kumar, O. R., Sinha, D. K., Malik, Y. P. S., Dubal, Z. B., Desingu, P. A., Shivakumar, M., Krishnaswamy, N., & Singh, B. R. (2017). Spatial molecular epidemiology of carbapenem-resistant and New Delhi metallo beta-lactamase (blaNDM)-producing *Escherichia coli* in the piglets of organized farms in India. *Journal of Applied Microbiology*, 122(6), 1537–1546. <https://doi.org/10.1111/jam.13455>
- Rendón, M. A., Saldaña, Z., Erdem, A. L., Monteiro-Neto, V., Vázquez, A., Kaper, J. B., Puente, J. L., & Girón, J. A. (2007). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25), 10637–10642. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704104104>
- Robinson, A. E., Heffernan, J. R., & Henderson, J. P. (2018). The iron hand of uropathogenic *Escherichia coli*: The role of transition metal control in virulence. *Future Microbiology*, 13(7), 813–829. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0295>
- Rojas-Lopez, M., Monterio, R., Pizza, M., Desvaux, M., & Rosini, R. (2018). Intestinal pathogenic *Escherichia coli*: Insights for vaccine development. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00440>
- Sabaté, M., Moreno, E., Pérez, T., Andreu, A., & Prats, G. (2006). Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(9), 880–886. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01461.x>
- Samei, A., Haghi, F., & Zeighami, H. (2016). Distribution of pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Folia Microbiologica*, 61(3), 261–268. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0433-8>
- Santos, A. C. de M., Santos, F. F., Silva, R. M., & Gomes, T. A. T. (2020). Diversity of Hybrid- and Hetero-Pathogenic *Escherichia coli* and Their Potential

- Implication in More Severe Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00339>
- Shakhatreh, M. A. K., Swedan, S. F., Al-Odat, M. A., & Khabour, O. F. (2019a). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in Jordan: Prevalence of urovirulence genes and antibiotic resistance. *Journal of King Saud University - Science*, 31(4), 648–652. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.03.009>
- Shakhatreh, M. A. K., Swedan, S. F., Al-Odat, M. A., & Khabour, O. F. (2019b). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in Jordan: Prevalence of urovirulence genes and antibiotic resistance. *Journal of King Saud University - Science*, 31(4), 648–652. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.03.009>
- Sierra-Díaz, E., Hernández-Ríos, C. J., & Bravo-Cuellar, A. (2019). Antibiotic resistance: Microbiological profile of urinary tract infections in Mexico. *Cirugia y Cirujanos (English Edition)*, 87(2), 176–182. <https://doi.org/10.24875/CIRU.18000494>
- Stephens, C., Arismendi, T., Wright, M., Hartman, A., Gonzalez, A., Gill, M., Pandori, M., & Hess, D. (2020). F Plasmids Are the Major Carriers of Antibiotic Resistance Genes in Human-Associated Commensal *Escherichia coli*. *MSphere*, 5(4), 1–13. <https://doi.org/10.1128/msphere.00709-20>
- Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Su, Q., Guan, T., He, Y., & Lv, H. (2016). Siderophore Biosynthesis Governs the Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli* by Coordinately Modulating the Differential Metabolism. In *Journal of Proteome Research* (Vol. 15, Issue 4). <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00061>
- Subashchandrabose, S., & Mobley, H. L. T. (2015). Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 3(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0015-2012>
- Tamma, P. D., Doi, Y., Bonomo, R. A., Johnson, J. K., & Simner, P. J. (2019). A Primer on AmpC β -Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-resistant World. *Clinical Infectious Diseases*, 69(8), 1446–1455. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz173>
- Tarltona *et al.*, (2019). Genotypic analysis of uropathogenic *Escherichia coli* to understand factors that impact the prevalence of β -lactam-resistant urinary tract infections in a community. HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.03.002>.Genotypic
- Tchente Nguéack, C., Okalla Ebongue, C., Nouwe Chokothéu, C., Ebong Ewougo, C., Nana Njamé, T., & Mboudou, E. (2019). Clinical presentation, risk factors and pathogens involved in bacteriuria of pregnant women attending antenatal clinic of 3 hospitals in a developing country: A cross sectional analytic study.

BMC Pregnancy and Childbirth, 19(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12884-019-2290-y>

- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: Virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>
- Totsika, M., Wells, T. J., Beloin, C., Valle, J., Allsopp, L. P., King, N. P., Ghigo, J. M., & Schembri, M. A. (2012). Molecular characterization of the EhaG and UpaG trimeric autotransporter proteins from pathogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2179–2189. <https://doi.org/10.1128/AEM.06680-11>
- Tseng, C. C., Lin, W. H., Wu, A. B., Wang, M. C., Teng, C. H., & Wu, J. J. (2020). *Escherichia coli* FimH adhesins act synergistically with PapGII adhesins for enhancing establishment and maintenance of kidney infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, xxxx, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.09.001>
- Vo, J. L., Martínez Ortiz, G. C., Subedi, P., Keerthikumar, S., Mathivanan, S., Paxman, J. J., & Heras, B. (2017). Autotransporter Adhesins in *Escherichia coli* Pathogenesis. *Proteomics*, 17(23–24), 1–10. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600431>
- Walker, D. I., McQuillan, J., Taiwo, M., Parks, R., Stenton, C. A., Morgan, H., Mowlem, M. C., & Lees, D. N. (2017). A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. *Water Research*, 126, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.032>
- Weiss D, Wallace RM, Rwego IB, Gillespie TR, Chapman CA, Singer RS, Goldberg TL (2018) Antibiotic-resistant *Escherichia coli* and class 1 integrons in humans, domestic animals, and wild primates in rural Uganda. *Appl Environ Microbiol* 84:e01632-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01632-18>.
- Weinstein ZB, Zaman MH. (2019). Evolution of rifampin resistance in *Escherichia coli* and *Mycobacterium smegmatis* due to substandard drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e01243-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01243-18>.
- Werneburg, G. T., & Thanassi, D. G. (2018). Pili Assembled by the Chaperone/Usher Pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella*. In *EcoSal Plus* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0007-2017>
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, 85(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.03.007>
- William O'Hara, R., Jenks, P. J., Emery, M., & Upton, M. (2019). Rapid detection of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* multi-locus sequence type 127 using a specific pcr assay. *Journal of Medical Microbiology*, 68(2), 188–196. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000902>

- Yamamoto, S., Tsukamoto, T., Terai, A., Kurazono, H., & Takeda, Y. (1997). Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. 1127–1129.
- Zalewska-Piatek, B., & Piatek, R. (2019). Alternative treatment approaches of urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Acta Biochimica Polonica*, 66(2), 129–138. https://doi.org/10.18388/abp.2018_2787
- Zamani, H., & Salehzadeh, A. (2018). Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: Association with adhesion factor genes. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 48(1), 162–167. <https://doi.org/10.3906/sag-1707-3>
- Zankari, E., Hasman, H., Kaas, R. S., Seyfarth, A. M., Agersø, Y., Lund, O., Larsen, M. V., & Aarestrup, F. M. (2013). Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(4), 771–777. <https://doi.org/10.1093/jac/dks496>

16. ANEXOS

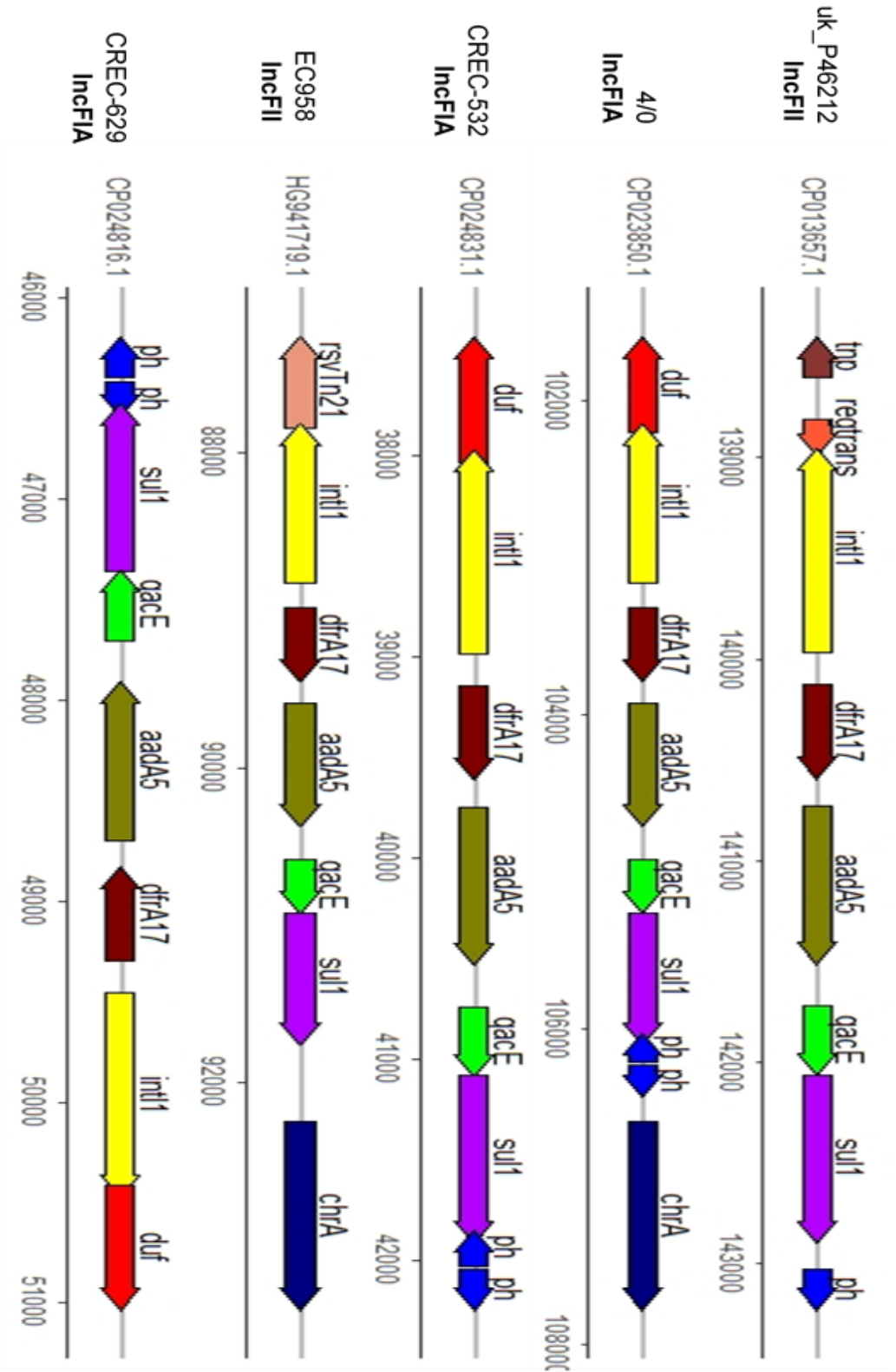
16.1 Anexo A: Genomas incluidos en el estudio

| UPEC | | | Comensales | | |
|------|------------------------------|---------------------|------------|---------------------------|---------------------|
| | Cepa | Núm. Acceso GenBank | | Cepa | Núm. Acceso GenBank |
| 1 | CFT073 | AE014075 | 1 | K-12 Substr.MG1655 | CP014225.1 |
| 2 | 536 | CP000247 | 2 | 4.4 | CP023826.1 |
| 3 | ATCC 700415 | CP022609.1 | 3 | 7.2 | CP023820.1 |
| 4 | 103 | CP020495.1 | 4 | 09-02E | AP022650.1 |
| 5 | 190 | CP020520.1 | 5 | 2017.01.04CC | AP021891.1 |
| 6 | 222 | CP020516.1 | 6 | 2017.15.01CC | AP021890.1 |
| 7 | 52148 | CP050382.1 | 7 | 2018-01-1CC | AP021892.1 |
| 8 | 81009 | CP021179 | 8 | 2018-02-2CC | AP021896.1 |
| 9 | 201609 | CP048107.1 | 9 | 2018-06-4CC | AP021893.1 |
| 10 | 50579417 | CP033884.1 | 10 | 2018-10-1CC | AP021894.1 |
| 11 | 118UI | CP032515.1 | 11 | 2018-11-3CC | AP021895.1 |
| 12 | 13KWH46 | CP019250.1 | 12 | 2EC1 | CP047571.1 |
| 13 | 13TMH22 | CP019256.1 | 13 | 2HS-C | CP038180.1 |
| 14 | 2/0 | CP023853.1 | 14 | 4.1-1 | CP023844.1 |
| 15 | 28Eco12 | CP038505.1 | 15 | 4.2-1 | CP023834.1 |
| 16 | 4/0 | CP023849.1 | 16 | 94EC | CP047576.1 |
| 17 | 5CRE51 | CP021175.1 | 17 | Ec-050 | CP043227.1 |
| 18 | ABU 83972 | CP001671 | 18 | Ec40 | CP025739.1 |
| 19 | ARL09232 | CP049967.1 | 19 | G1-2 | CP060083.1 |
| 20 | BH100 substr. MG2014 | CP024650.2 | 20 | G3-10 | CP060075.1 |
| 21 | BH100 substr. MG2017 | CP025251.1 | 21 | G4.9 | CP060073.1 |
| 22 | BH100L substr. MG2017 | CP025716.1 | 22 | G5 | CP060065.1 |
| 23 | BH100N substr. MG2017 | CP025703.1 | 23 | G6-7 | CP060061.1 |
| 24 | CI5 | CP011018.1 | 24 | G8 | CP060057.1 |
| 25 | CLSC36 | CP041300.1 | 25 | GZ04-0086 | CP042336.1 |
| 26 | Combat11I9 | CP021726.1 | 26 | H9Ecoli | CP029180.1 |
| 27 | Combat13F7 | CP019245.1 | 27 | HS | CP000802.1 |
| 28 | Combat2C1 | CP019243.1 | 28 | HS30-1 | CP029492.1 |
| 29 | CRE1 | CP034399.1 | 29 | M1/5 | CP053296.1 |
| 30 | CREC-532 | CP024830.1 | 30 | MGY | CP019629.1 |
| 31 | CREC-629 | CP024815.1 | 31 | NCTC86 | CP019778.1 |
| 32 | EC1 | CP058574.1 | 32 | NCTC86EC | LT601384.1 |
| 33 | EC1515 | CP021844.1 | 33 | Nissle 1917 | CP007799.1 |
| 34 | EC2 | CP058571.1 | 34 | O42 | CP042934.2 |
| 35 | EC2.1 | CP041955.1 | 35 | P225M | CP044346.1 |
| 36 | EC25 | CP035123.1 | 36 | P276M | CP044293.1 |
| 37 | EC28 | CP049101.1 | 37 | RS571 | CP034389.1 |
| 38 | EC590 | CP016182.2 | 38 | SCU-101 | CP048920.1 |
| 39 | EC931 | CP049118.1 | 39 | SCU-102 | CP051753.1 |

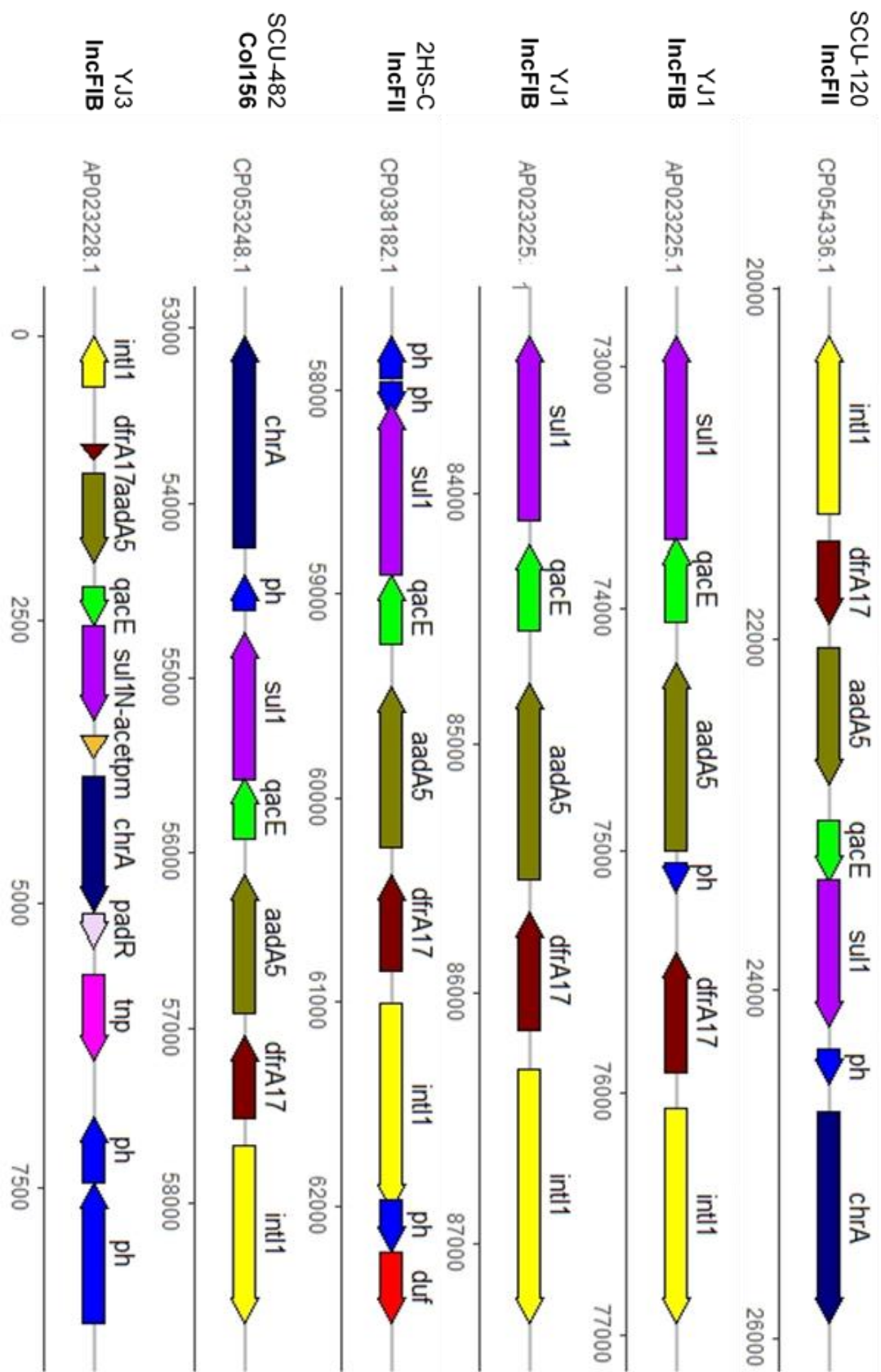
| | Cepa | Núm. Acceso GenBank | | Cepa | Núm. Acceso GenBank |
|----|--------------|----------------------------|----|-------------|----------------------------|
| 40 | EC958 | HG941718 | 40 | SCU-103 | CP054457.1 |
| 41 | EC974 | CP021840.1 | 41 | SCU-104 | CP053284.1 |
| 42 | EcPF14 | CP054230.1 | 42 | SCU-105 | CP051738.1 |
| 43 | EcPF15 | CP054227.1 | 43 | SCU-106 | CP053234.1 |
| 44 | EcPF16 | CP054224.1 | 44 | SCU-108 | CP051735.1 |
| 45 | EcPF18 | CP054219.1 | 45 | SCU-109 | CP051733.1 |
| 46 | EcPF40 | CP054214.1 | 46 | SCU-111 | CP051727.1 |
| 47 | EcPF5 | CP054236.1 | 47 | SCU-112 | CP051725.1 |
| 48 | EcPF7 | CP054232.1 | 48 | SCU-113 | CP051765.1 |
| 49 | FDAARGOS_144 | CP014111.1 | 49 | SCU-115 | CP054368.1 |
| 50 | FDAARGOS_448 | CP023960.1 | 50 | SCU-116 | CP051719.1 |
| 51 | IAI39 | CU928164.2 | 51 | SCU-118 | CP051716.1 |
| 52 | JJ1887 | CP014316.1 | 52 | SCU-120 | CP054335.1 |
| 53 | K56-43-un | CP053079.1 | 53 | SCU-121 | CP054328.1 |
| 54 | KL53 | CP030919.1 | 54 | SCU-122 | CP051714.1 |
| 55 | M160133 | CP022164.1 | 55 | SCU-123 | CP051711.1 |
| 56 | MNCRE44 | CP010876.1 | 56 | SCU-124 | CP051706.1 |
| 57 | MS6192 | CP054940.1 | 57 | SCU-125 | CP051700.1 |
| 58 | MS6193 | CP047405.1 | 58 | SCU-152 | CP051698.1 |
| 59 | MS6198 | CP015834.1 | 59 | SCU-171 | CP054363.1 |
| 60 | MS7163 | CP026853.1 | 60 | SCU-172 | CP054353.1 |
| 61 | MSHS 133 | CP041304.1 | 61 | SCU-176 | CP054345.1 |
| 62 | MSHS 472 | CP041302.1 | 62 | SCU-204 | CP053251.2 |
| 63 | NU14 | CP019777.1 | 63 | SCU-301 | CP051751.1 |
| 64 | O25b:H4 | CP015085.1 | 64 | SCU-306 | CP053231.1 |
| 65 | PA45B | CP021288.1 | 65 | SCU-308 | CP053281.1 |
| 66 | S65EC | CP036245.1 | 66 | SCU-313 | CP051694.1 |
| 67 | SA186 | CP022730.1 | 67 | SCU-316 | CP054371.1 |
| 68 | THO-008 | AP022536.1 | 68 | SCU-318 | CP051692.1 |
| 69 | THO-015 | AP022549.1 | 69 | SCU-321 | CP055158.1 |
| 70 | U12A | CP035476.1 | 70 | SCU-387 | CP051688.1 |
| 71 | U13A | CP035477.1 | 71 | SCU-390 | CP054319.1 |
| 72 | U14A | CP035516.1 | 72 | SCU-479 | CP054317.1 |
| 73 | U15A | CP035720.1 | 73 | SCU-482 | CP053247.1 |
| 74 | uk_P46212 | CP013658.1 | 74 | SCU-483 | CP054314.1 |
| 75 | UMN026 | CU928163.2 | 75 | SCU-484 | CP051744.1 |
| 76 | UPEC 26-1 | CP016497.1 | 76 | SCU-485 | CP053245.1 |
| 77 | UPEC_U013 | CP058596.1 | 77 | SCU-486 | CP051749.1 |
| 78 | UPEC132 | CP040456.1 | 78 | SCU-487 | CP054454.1 |
| 79 | UTI89 | CP000243.1 | 79 | SCU-488 | CP054449.1 |
| 80 | UTI89-2 | CP064825.1 | 80 | SE11 | AP009240.1 |
| 81 | UTI89-OCT | CP062985.1 | 81 | SE15 | AP009378.1 |
| 82 | UTI89-OCTa | CP062228.1 | 82 | YJ1 | AP023224.1 |
| 83 | VR50 | CP011134.1 | 83 | YJ3 | AP023226.1 |
| 84 | W60 | CP058342.1 | 84 | YJ4 | AP023230.1 |
| 85 | XH990 | CP019359.1 | 85 | YJ6 | AP023235.1 |
| 86 | Y5 | CP013483.1 | | | |
| 87 | YD786 | CP013112.1 | | | |

16.2 Anexo B: Integrones encontrados en genomas UPEC y comensales y su localización en el genoma

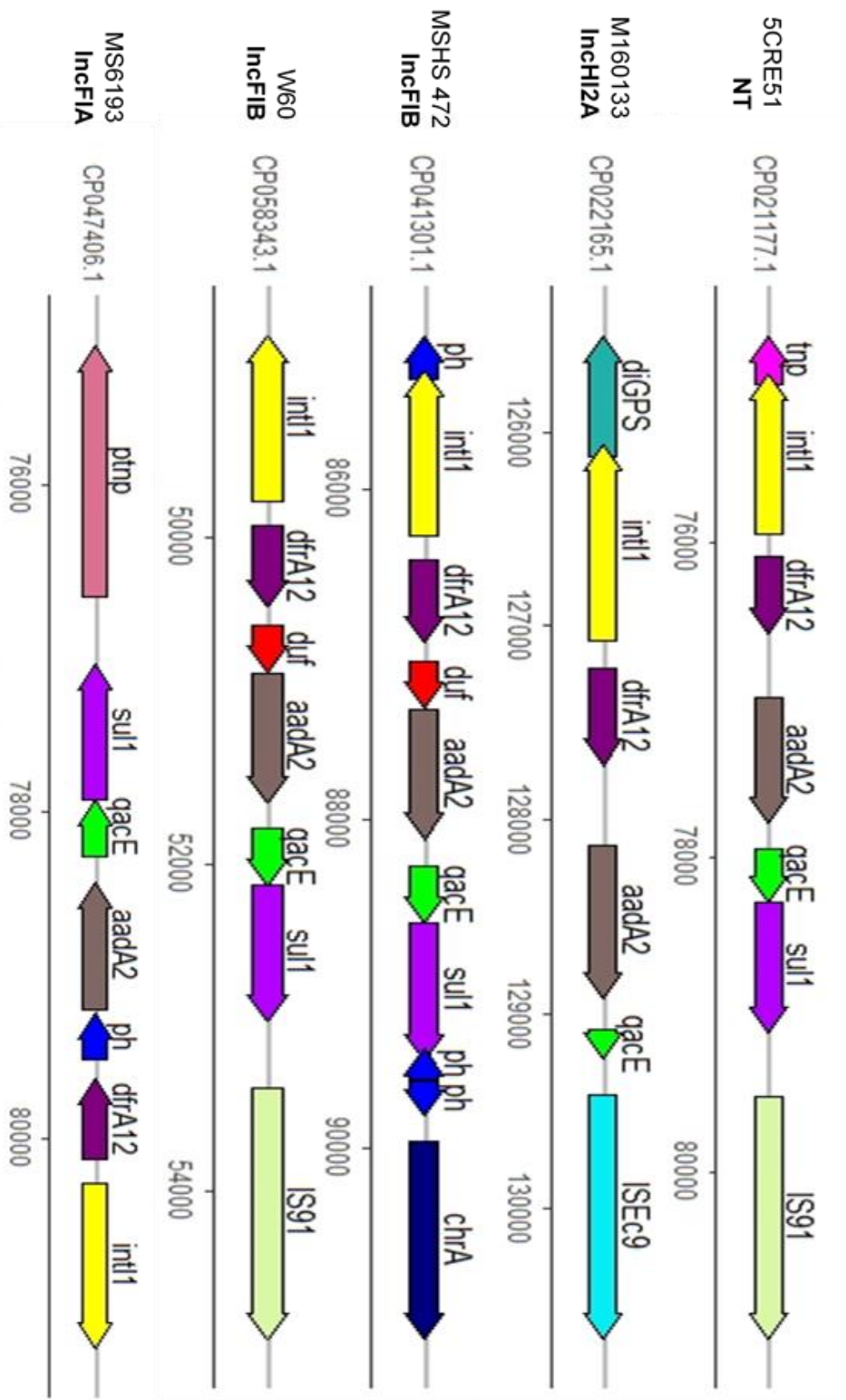
Patrón A en genomas UPEC



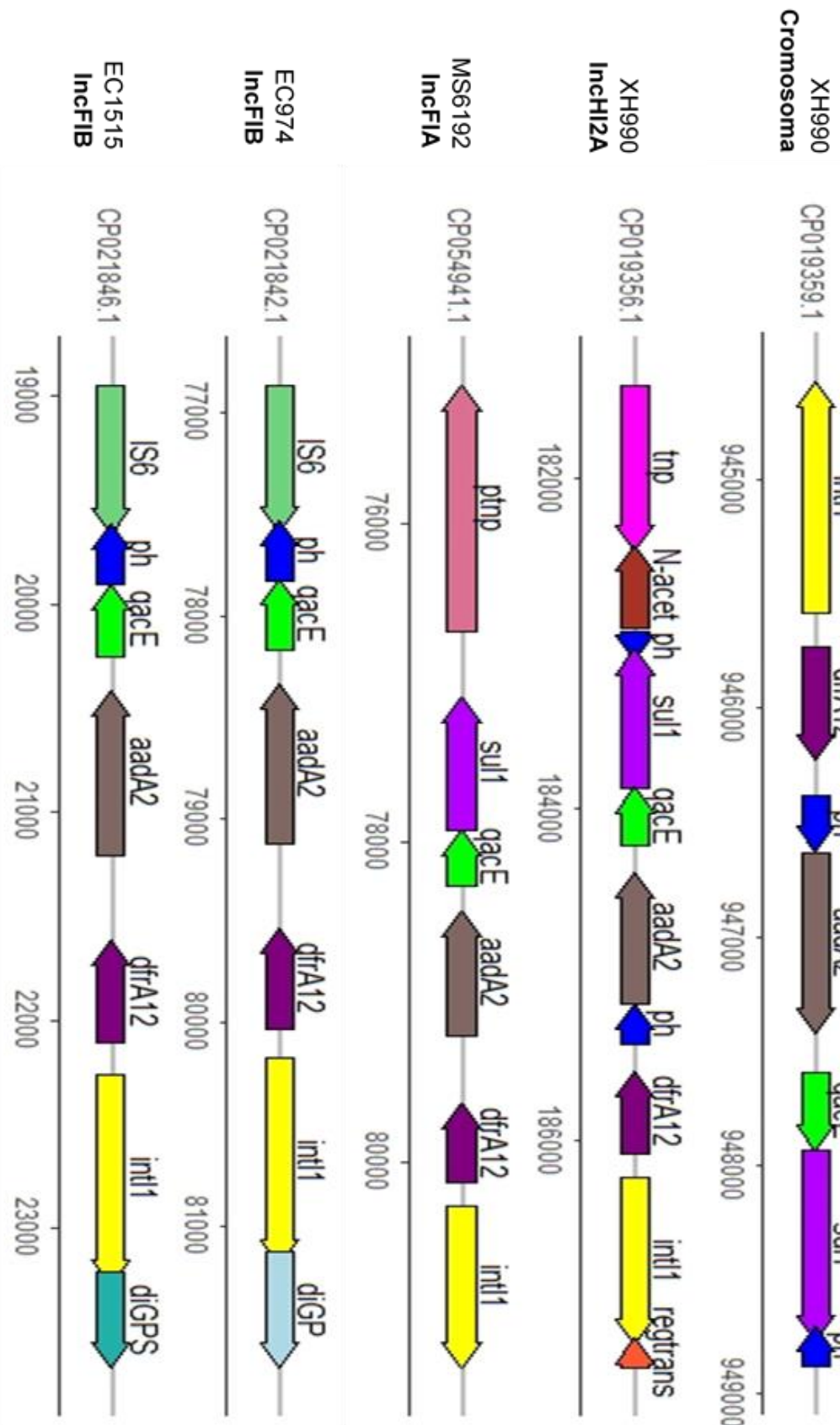
Patrón A en genomas comensales



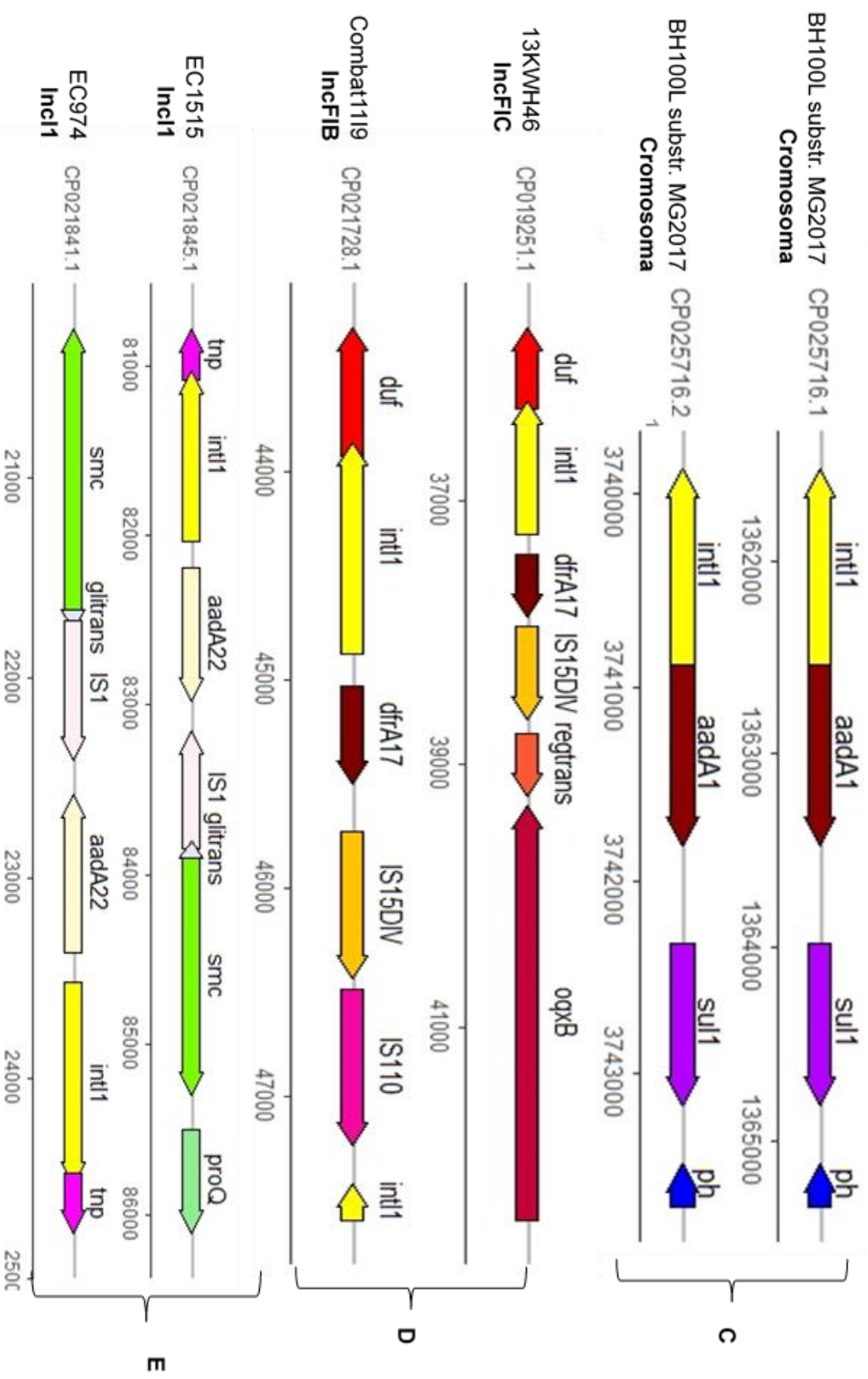
Patrón B en genomas UPEC



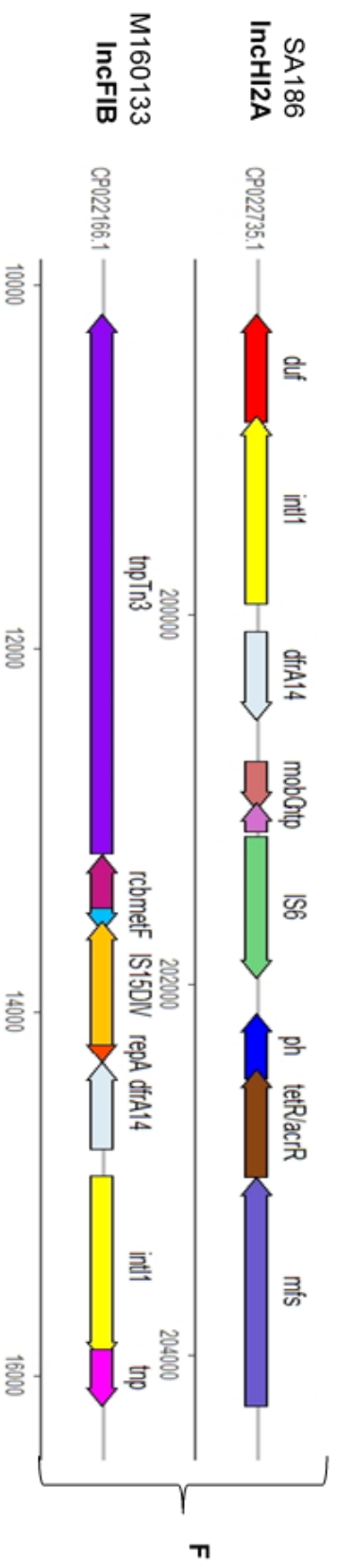
Continuación patrón B en genomas UPEC



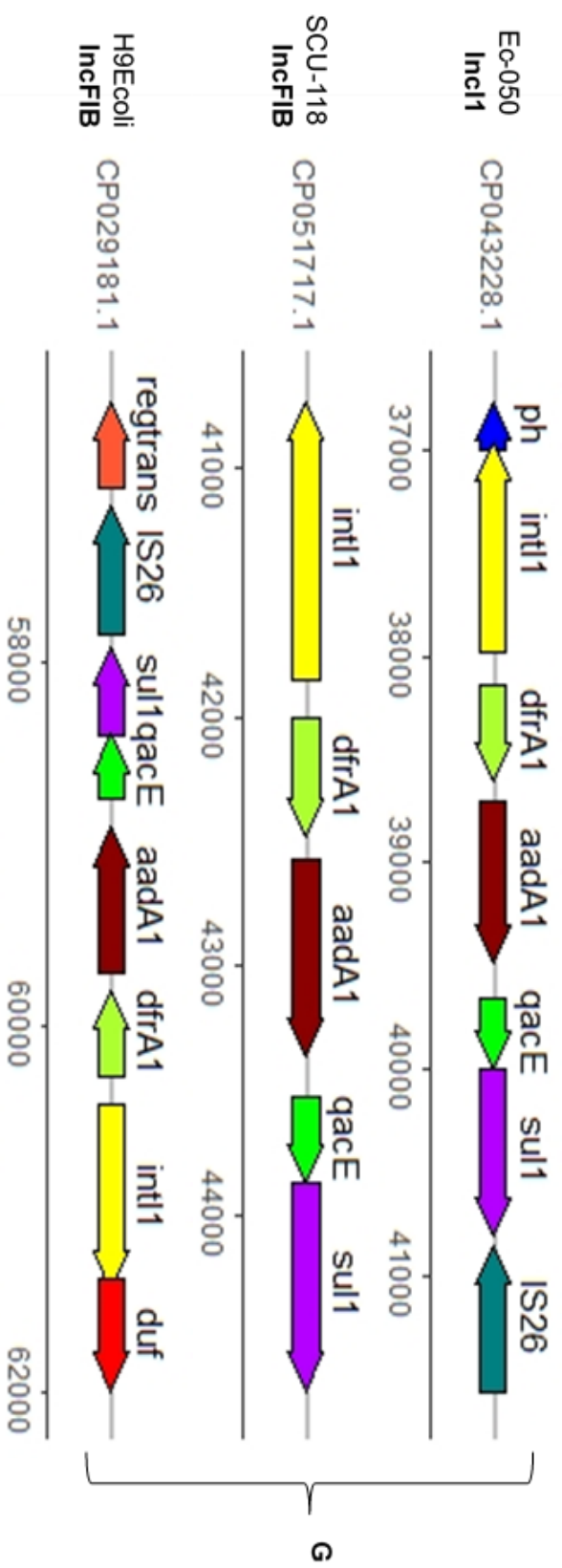
Patrón C, D y E en genomas UPEC



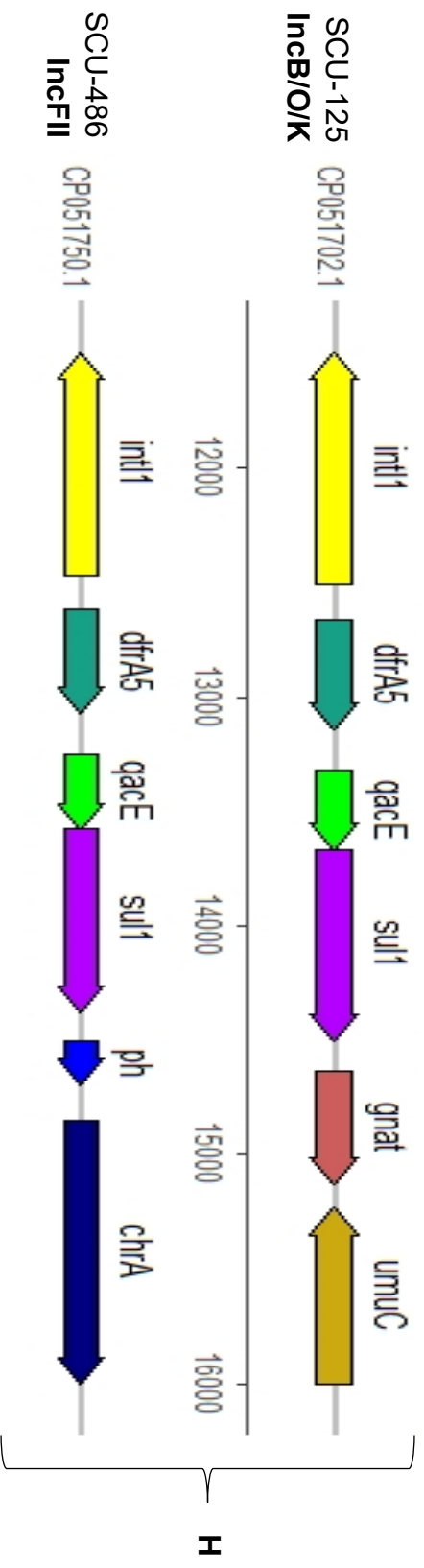
Patrón F en genomas UPEC



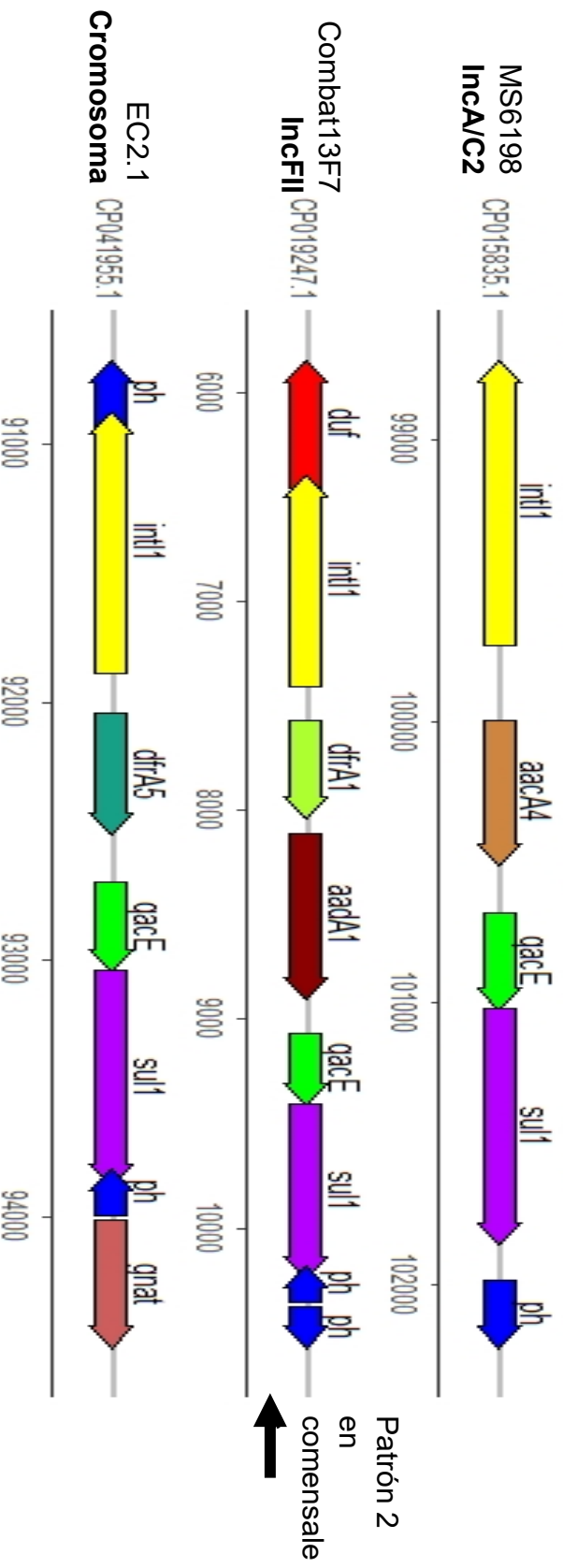
Patrón G en genomas comensales



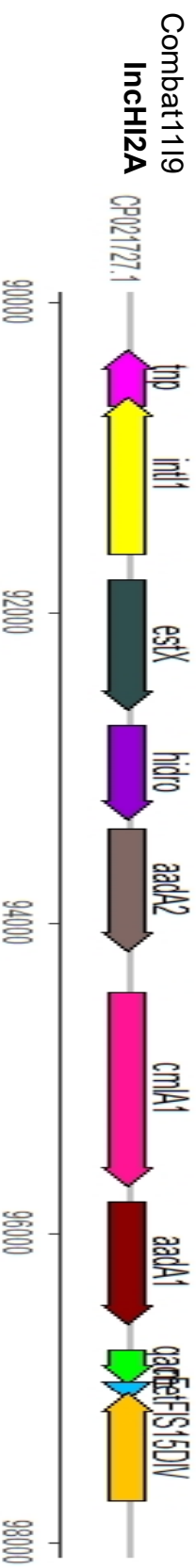
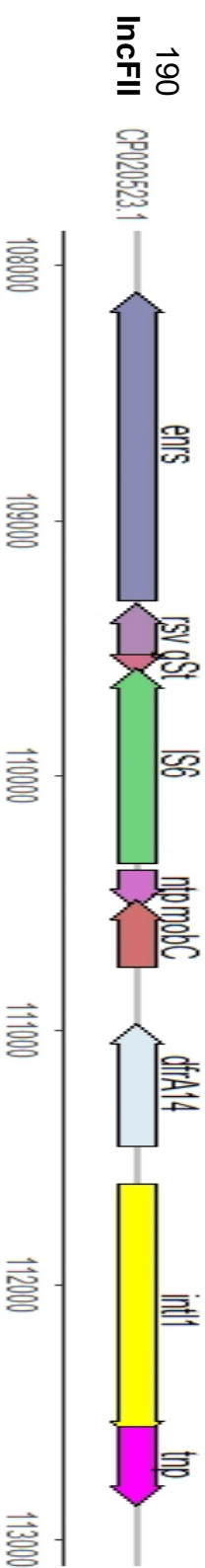
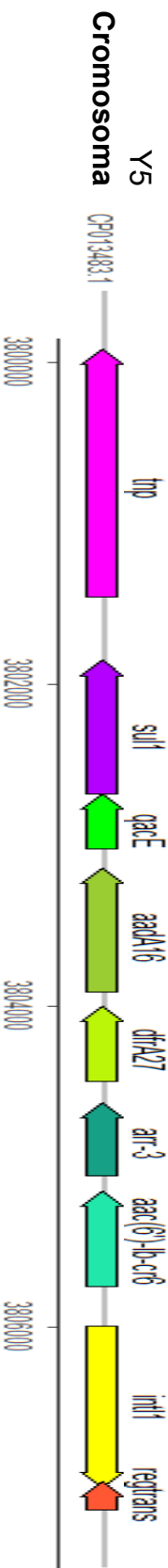
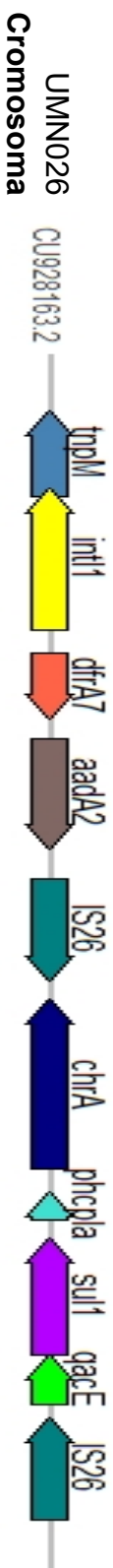
Patrón H en genomas comensales



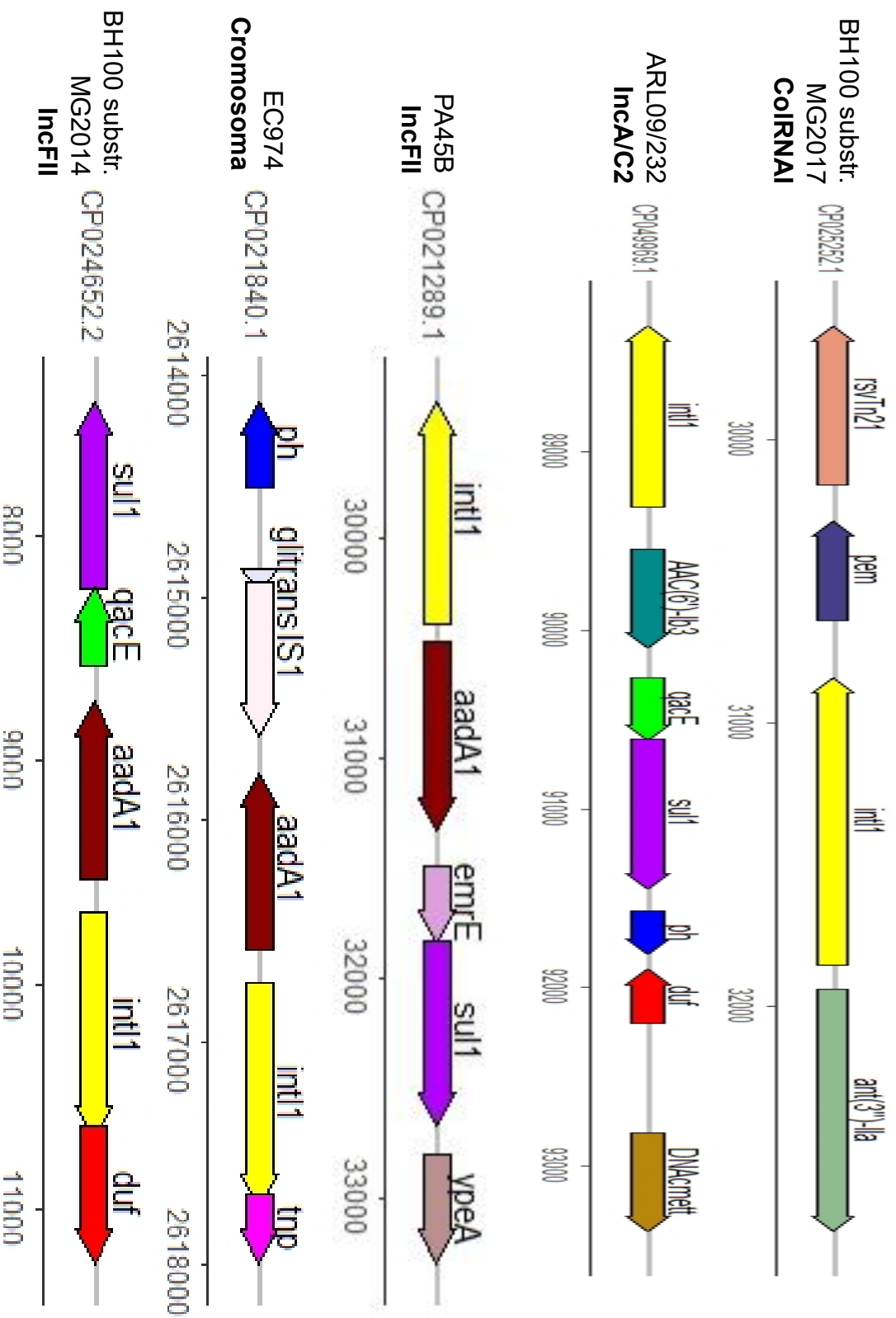
Arreglos únicos en UPEC



Continuación de arreglos únicos en UPEC



Continuación de arreglos únicos en UPEC



Arreglos únicos en genomas comensales



Continuación de arreglos únicos en genomas comensales

