



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**“Estudio de los patotipos y de las características asociadas a virulencia y resistencia en una colección de cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes orígenes y análisis genómico de *E. coli* aislada de portadores”**

**TESIS**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**PRESENTA:**

Q.B.C Judith Zullim Ortega Enriquez

**Directora de tesis**

D.C Margarita Ma. De la Paz Arenas Hernández

**Co-director de tesis**

D.C Edwin Barrios Villa

Puebla, Pue.

Noviembre, 2024



**BUAP**

**Oficio No. PM/095/2024**

**Asunto:** *Asignación de Comité Revisor de Tesis*

**Judith Zullim Ortega Enríquez**  
**Estudiante de Maestría en Ciencias (Microbiología)**  
**CICM-ICUAP**  
**Presente.**

Por este conducto se le informa que se ha designado la Comisión revisora de tesis para su trabajo titulado **“Estudio de los patotipos y de las características asociadas a virulencia y resistencia en una colección de cepas de *Escherichia coli* de diferentes orígenes”**, la comisión estará integrada por:

- ◆ **D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**
- ◆ **D.C. Cristina Lara Ochoa**
- ◆ **D.C. Claudia F. Martínez de la Peña**
- ◆ **D.C. Lucía Soto Urzúa**

Así mismo le comunico que el Comité Revisor contará con **15 días naturales para la revisión y entrega de la versión final de la tesis a partir de la fecha de recepción de su manuscrito** por lo que le solicitamos de la manera más atenta entregue su manuscrito a tiempo para su revisión y realizar las correcciones necesarias.

Sin más que agregar, me despido de usted.

Atentamente.

“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

H. Puebla de Z., a 27 de septiembre 2024.

  
**D.C. José Antonio Munive Hernández**  
Coordinador  
Posgrado en Microbiología  
CICM-ICUAP



c.c.p. Archivo

Posgrado en Ciencias Microbiológicas  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,  
Ciudad Universitaria  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522  
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx



**BUAP**

Puebla, Pue. a 5 de noviembre 2024.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO  
EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP  
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Judith Zullim Ortega Enríquez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:


**“Estudio de los patotipos y de las características asociadas a virulencia y resistencia en una colección de cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes orígenes y análisis genómico de *E.coli* aislada de portadores”**

A nuestro juicio, la alumna **Judith Zullim Ortega Enríquez** 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. Rosa del Carmen Rocha Gracia

  
D.C. Cristina Lara Ochoa

  
D.C. Claudia F. Martínez de la Peña

  
D.C. Lucía Soto Urzúa

Posgrado en Ciencias Microbiológicas  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,  
Ciudad Universitaria  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522  
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

# DEDICATORIA



## **A mis abuelos: Mi tatita Roberto; Mi reina Rogelina; Mi abuela Marina**

Porque todo esto lo realicé pensando en ustedes, porque incluso antes de iniciar todo este proceso sus palabras de aliento siempre me reconfortaban, extraño tanto sus abrazos, estoy segura de que no pude haber tenido mejores abuelos que ustedes.

Mis ángeles en el cielo.

¡Los amo y extraño todos los días!

## **A mis padres Jesus y Rogelina**

Porque este y todos mis logros son por y para ustedes. Por permitirme emprender este viaje lejos de casa y sobre todo por su confianza y fe depositadas en mí, por ser los pilares de mi vida, mi mayor inspiración, mi motivación de cada día.

Mi gratitud hacia ustedes es imposible de expresar completamente.

¡Los amo infinitamente!

## **A mi hermana, Jazmin**

A mi persona favorita en este mundo, gracias por dejarme explicarte mi tesis y lo que hago aun cuando no entendías de que hablaba y me mirabas raro por ello, gracias por escucharme, por alentarme y depositar tu confianza en mí. Me siento muy orgullosa de ti.

¡Te amo demasiado flaquita!

## **A mis tíos, Roberto, Ricardo, Rogelio y Rodolfo**

Porque siempre me han acompañado en los momentos más importantes de mi vida, porque nunca han faltado sus palabras de ánimo y motivación.

¡Los quiero!

---

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

- Al Consejo Nacional de Ciencia, Humanidades y Tecnología (CONAHCyT) por el apoyo económico (No. de Becario 824608) que me otorgó durante el desarrollo de este proyecto.
  - Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por las facilidades prestadas durante el desarrollo de esta Tesis.
  - Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrados por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del eje IV. Modelo de investigación abierta y compartida. Objetivo 13. Formar recursos humanos que impacten positivamente el contexto social y científico como consecuencia de su accionar en una comunidad para lograr una educación desarrolladora de la transformación. Indicador establecido en el plan de desarrollo institucional 2021-2025.
  - Al laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y desarrollarme como profesionista.
  - Al Laboratorio de Biología Molecular y Genómica. DCQBA-UNISON. La Enterocueva, porque aquí fue donde aprendí a hacer PCR y confiar en el proceso. Gracias por abrirme las puertas y permitirme conocer personas magnificas que me acompañaron durante toda esta estancia.
-

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

### ➤ **A mi directora**

A la D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández. Por la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, por sus palabras de aliento, por la paciencia, experiencias en clase y en el laboratorio; por siempre creer en mí. Infinitas gracias por ello Dra.

### ➤ **A mi Codirector**

D.C Edwin Barrios Villa. Por ser el primero en creer en mí y apoyarme desde que todo esto comenzó. Por ser mi guía en todo momento. Por sus palabras de motivación, por la empatía y solidaridad que siempre ha estado dispuesto a brindarme. Por el gran equipo de trabajo y de amistad que hemos formado, estoy segura de que esto es el inicio de algo grandioso. ¡Nos vemos pronto en una carnita asada!

### ➤ **A mi comité tutorial y revisores**

**A la D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña.**

**A la D.C Rosa del Carmen Rocha Gracia.**

**A la D.C Cristina Lara Ochoa.**

**A la D.C Lucia Soto Urzúa.**

Por los consejos brindados fuera y dentro del aula, por las recomendaciones que me hicieron durante los avances del proyecto y mi estancia en la maestría. Gracias.

---

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

**A mi familia** Por su apoyo y fe incondicional en mí durante toda mi vida. Ustedes son mi más grande motivación, mis logros son de ustedes. Los amo con mi vida.

### **A mis mejores amigas**

**Fernanda**, bae. Me has acompañado durante 12 largos años, has estado presente en mis diferentes etapas de vida y nunca me has soltado de la mano, gracias por tus palabras de motivación, por hacerme creer en mí, porque, aunque nos dediquemos a áreas totalmente distintas nunca falta el “¿Qué te toca hacer hoy?” “A ver explícamelo”. Te amo incondicionalmente amiga.

A **Lillian**. Mi química favorita, porque este viaje enfocado en la investigación lo iniciamos juntas, gracias por comprenderme y apoyarme en todo momento, porque nunca falten nuestras conversaciones de mil temas a la vez, nuestras dates en cafecitos y nuestras palabras de motivación, gracias por tu paciencia y lealtad. Gracias por alentarme en la distancia aun cuando yo veía todo perdido. Te amo por siempre amiga, nunca dudes de lo orgullosa que estoy de ti.

A **Nikita (Shikis) y Perlita**, por los cafecitos, experiencias vividas y frases de aliento en todo momento, por creer en mí, por distraerme cuando lo necesitaba. Infinitas gracias, las amo.

**A mi mejor amigo** Roberto, solecito. Gracias por tus frases, mensajes y llamadas de motivación, por acompañarme en este proceso, porque a pesar de todo siempre puedo contar contigo, gracias por estos 10 años de amistad donde en cada etapa de mi vida has portado algo bueno en mí. Gracias por hacerme ver que no todo es tan difícil como mi cabecita me hace pensar. Nunca dudes de lo mucho que te adoro.

**A mis quimiquitos, los reales** Dieguito, Lucilu, Adi, Diana, Rodri, Charlie, Esme e Ivan. Porque sus palabras de motivación nunca faltaron a pesar de la distancia, por lo preocupados que estaban de saber cuándo iba a regresar, por esas salidas a bailar y los sushis para chismear cuando regresaba al ranchito.

¡Millones de gracias, amigos! Los amo.

**A mis amigos y compañeros de LBME** Roberto, Mon, Liz, Akio, Gely, Lety, Majo, Lucero, Sam e Irina. Gracias por acompañarme durante esta estancia en Puebla, les aseguro con la mano en el corazón que no hubiera sobrevivido sin su apoyo. Gracias por los momentos que compartimos juntos, por esas salidas a comer que duraban horas, las salidas a bailar y las cantadas en el karaoke. Por el apoyo en todo momento, tanto personal como en el laboratorio. Los voy a extrañar demasiado, estoy segura de que cada uno de ustedes llegara muy lejos, nos vemos pronto. Los adoro niños.

---

**Roberto, comaye** Agradecimiento especial a ti, por ser mi amigo y compañero en esas frustradas PCR de los patotipos, eres una excelente persona y mereces todo lo bonito de esta vida, no dudo de que llegarás a ser un excelente docente e investigador. Te extrañare mucho, te quiero demasiado. ¡AJUA!

**A Mon** Muchas gracias por compartirme tu conocimiento durante esta estancia en la maestría y brindarme tu amistad. Eres una excelente docente, pero sobre todo una magnífica persona nunca olvides eso. Gracias también por enseñarme los tacos del tío Coquis y cuáles eran las conchas de sabor a chocolate más ricas. Hiciste que mi vida aquí durante dos años se sintiera segura. Te extrañare. ¡Te quiero Mon! Mil gracias infinitas también a Giss. Son bienvenidas a mi ranchito cuando gusten.

**A Vivi, mi roomie** Gracias por tu amistad, por los chismecitos y por acompañarme para adaptarnos a vivir solas en un lugar nuevo. Yo sigo firme en que ya te daría hasta el título de doctora, porque tu dedicación y esfuerzo me motivaron en todo momento. Gracias, amiga, te quiero.

**A mis compañeras y amigas de clase** Sofi, Rous, Lore, Nina. Por acompañarme durante este proceso, por las pláticas fuera y dentro de clase, las palabras de motivación, las salidas a comer y los cafecitos de distracción, las llevaré en mi corazón siempre. ¡Gracias, les deseo todo el éxito del mundo colegas!



**Y, por último, pero no menos importante a mis mascotas,** Bubu, Bernie, Bruno y Gilbert, por quedarse despiertos y acompañarme a estudiar, por su increíble lealtad y amor incondicional.

Y en especial me tomare el tiempo de agradecerme a mí, porque a pesar de que hubo muchos momentos donde me quería rendir y tomar un vuelo de regreso a mi hogar, me mantuve firme y pensar en cada una de las personas que estaba dispuesta a apoyarme me motivo a concluir esta etapa.

**¡LOS LLEVO EN MI CORAZÓN!**

*“La virtud de la prosperidad es la templanza, la virtud de la adversidad es la fortaleza”*

*-Francis Bacon*

---

# ÍNDICE

	Página
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>II</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>III</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>V</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Generalidades.....	1
1.2 Patotipos diarreógenicos (DEC).....	1
1.3 Patotipos extraintestinales (ExPEC).....	4
1.4 Factores de virulencia asociados a UPEC.....	6
1.5 Patotipos híbridos.....	7
1.6 Islas de Patogenicidad (PAI`s).....	8
1.7 Resistencia antibiótica a $\beta$ -lactámicos.....	9
1.7.1 Resistencia a quinolonas y aminoglucósidos.....	11
1.8 Relación filogenética.....	12
1.9 Elementos Genéticos Móviles (EGMs): Plásmidos.....	13
1.9.1 Elementos plasmídicos asociados a la conjugación.....	14
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>16</b>
2.1 Caracterización en base al patotipo de <i>E. coli</i> .....	16
2.2 Genotipo y fenotipo de resistencia antibiótica de <i>E. coli</i> .....	19
2.3 Perfil plasmídico en cepas de <i>E. coli</i> .....	20
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>22</b>
<b>6. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO</b> .....	<b>23</b>
6.1 Esquema de secuenciación.....	24
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
7.1 Material biológico.....	25
7.2 Extracción de ADN genómico.....	30
7.3 Condiciones de la mezcla de reacción de PCR.....	30
7.4 Amplificación de genes de virulencia asociados a UPEC por PCR.....	31
7.5 Determinación de Islas de Patogenicidad (PAI`s).....	32
7.6 Identificación de patotipos DEC.....	33
7.7 Identificación de genotipo de resistencia.....	33
7.8 Secuenciación de cepas de interés.....	35

---

7.8.1	Análisis bioinformático y genómica comparativa.....	35
7.9	Relación filogenética mediante ERIC-PCR.....	36
7.10	Determinación de perfil plasmídico.....	37
7.11	Caracterización plasmídica.....	38
7.11.1	Determinación de gen <i>traT</i> .....	38
7.11.2	Búsqueda de relaxasas (familia MOB).....	38
7.11.3	Identificación de Sistemas de Adicción Plasmídicos (SAP) .....	40
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
8.1	Población estudiada.....	42
8.2	Determinación de patotipos híbridos patógenos.....	42
8.3	Determinación de resistotipo.....	50
8.4	Secuenciación y análisis de cepas de interés.....	57
8.5	Relación filogenética mediante ERIC-PCR.....	65
8.6	Perfil y caracterización plasmídica parcial.....	68
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>11.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>94</b>
<b>12.</b>	<b>APORTACIONES.....</b>	<b>95</b>
<b>13.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>96</b>
<b>14.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>108</b>

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Número de figura	TÍTULO	Página
Figura 1.	Sitios anatómicos del humano susceptibles de colonización por los diferentes patotipos de <i>Escherichia coli</i> .	3
Figura 2.	Modelos de patogenicidad de 6 categorías del patotipo diarreogénico de <i>E. coli</i>	4
Figura 3.	Mecanismo de patogenicidad de <i>Escherichia coli</i> uropatógena (UPEC).	5
Figura 4.	Factores de virulencia asociados a la patogenicidad de UPEC.	7
Figura 5.	Principales Islas de Patogenicidad (PAIs) descritas en <i>E. coli</i> extraintestinal.	9
Figura 6	Mecanismos de acción y resistencia de los principales antibióticos utilizados en la clínica contra enfermedades causadas por <i>E. coli</i> .	10
Figura 7.	Mecanismos de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos.	12
Figura 8.	Diferencias en los componentes de los plásmidos conjugativos y movilizables.	14
Figura 9.	Patotipos DEC en muestras de portadores.	26
Figura 10.	Porcentaje de resistencia a antibióticos de las 80 cepas de estudio.	28
Figura 11.	Determinación de genes de virulencia asociados a UPEC en las cepas de portadores.	43
Figura 12.	Gráfica con la prevalencia de genes asociados a UPEC en cepas de portadores.	44
Figura 13.	Gráfica con la prevalencia del set completo de genes asociados a UPEC en 19 cepas de portadores	44
Figura 14.	Prevalencia de PAIs en las cepas de estudio.	45
Figura 15.	Determinación de genes de virulencia asociados a patotipos DEC en cepas clínicas (UPEC).	48
Figura 16.	Patotipos patógenos-híbridos encontrados en las cepas de estudio	50
Figura 17.	Prevalencia de genes BLEE en las cepas de estudio.	51
Figura 18.	Porcentaje de genes NO-BLEE encontrados en las cepas de estudio.	52
Figura 19.	Características del genoma secuenciado de la cepa DEC-25.2.	60
Figura 20.	Características del genoma secuenciado de la cepa DEC-36.3.	61
Figura 21.	Características del genoma secuenciado de la cepa DEC-36.4.	62
Figura 22.	Árbol filogenético UPGMA basado en SNPs. Representación gráfica de los genomas secuenciados en comparación con los genomas de referencia de cepas de <i>E. coli</i> .	64

Figura 23.	Fotografía de los geles representativos obtenidos de los productos de ERIC-PCR.	65
Figura 24.	Dendograma construido mediante los resultados de ERIC-PCR.	66
Figura 25.	Dendograma construido base al perfil de bandas de ERIC-PCR.	67
Figura 26.	Perfil plasmídico de <i>E. coli</i> de origen fecal y urinario. Gel de agarosa al 1.2% representativo de la extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina de diferentes cepas de <i>E. coli</i> .	68
Figura 27.	Bandas plasmídicas en <i>E. coli</i> de origen fecal.	69
Figura 28.	Número de bandas plasmídicas en cepas de <i>E. coli</i> de origen fecal.	69
Figura 29.	Bandas plasmídicas por cepa en las muestras clínicas.	70
Figura 30.	Número de bandas plasmídicas por cepa en las muestras de origen clínicas.	70
Figura 31.	Determinación del gen <i>traT</i> en <i>E. coli</i> de origen fecal y urinario.	71
Figura 32.	Determinación de familias de relaxasas en <i>E. coli</i> con plásmidos de origen fecal y urinario.	72
Figura 33.	Gráfica con la prevalencia de familias de relaxasas encontradas en las bandas plasmídicas de las cepas de estudio.	72
Figura 34.	Porcentaje de sistemas SAP encontrados en las cepas de <i>E. coli</i> de origen fecal (portadores) y urinario (clínicas).	73

## ÍNDICE DE TABLA

Número de tabla	TÍTULO	Página
Tabla 1.	Características generales del cepario de portadores.	25
Tabla 2.	Características de los portadores.	26
Tabla 3.	Características generales del cepario de origen clínico.	27
Tabla 4.	Cepas utilizadas en este estudio.	29
Tabla 5.	Componentes generales de la PCR utilizadas en este estudio.	31
Tabla 6.	Factores de virulencia asociados a UPEC buscados en las PCR's múltiples.	31
Tabla 7.	Oligonucleótidos utilizados en la búsqueda de Islas de Patogenicidad (PAIs).	32
Tabla 8.	Descripción de las PCR utilizadas en la búsqueda de patotipos DEC.	33

Tabla 9.	Oligonucleótidos utilizados en la búsqueda de genes de resistencia.	34
Tabla 10.	Oligonucleótidos utilizados en la realización de ERIC-PCR.	37
Tabla 11.	Oligonucleótidos utilizados en la búsqueda de gen <i>traT</i> .	38
Tabla 12.	Oligonucleótidos utilizados en la búsqueda de las diferentes familias de relaxasas.	38
Tabla 13.	Características de los iniciadores y condiciones de PCR usados para la determinación de SAP.	40
Tabla 14.	Características de 19 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de portadores (previamente DEC), que son patotipos patógeno-híbridos.	46
Tabla 15.	Características de 13 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de origen clínico previamente reportadas como UPEC que son patotipos patógeno-híbridos.	49
Tabla 16.	Características relacionadas con el filogrupo y perfil genotípico de resistencia a los antibióticos de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de heces de portadores.	53
Tabla 17.	Características relacionadas con el filogrupo y perfil genotípico de resistencia a los antibióticos de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de orina de pacientes con ITU (clínicas).	55
Tabla 18.	Características generales del genoma de las cepas de portadores secuenciadas.	57
Tabla 19.	Genes de resistencia, virulencia y EGMs encontrados en los genomas de las cepas de <i>E. coli</i> secuenciadas, aisladas de heces de portadores a través de las herramientas mostradas en CGE (Center for Genomic Epidemiology) y CARD.	62
Tabla 20.	Características de las bandas plasmídicas encontradas en las cepas de estudio de portadores.	74
Tabla 21.	Características de las bandas plasmídicas encontradas en las cepas de muestras clínicas.	75

## RESUMEN

*E. coli*, bacilo Gram negativo, considerado como comensal del tracto gastrointestinal de humanos y de animales. Sin embargo, varios clones de la bacteria altamente adaptados han adquirido factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos, codificados y diseminados por elementos genéticos móviles (principalmente por plásmidos) que le confieren la capacidad de causar enfermedades. El patotipo diarreogénico (DEC) causa enfermedad intestinal y el patotipo extraintestinal, puede causar enfermedad en tracto urinario o sepsis. *E. coli* uropatógena (UPEC) pertenece a este último patotipo. En el presente estudio se trabajó con 80 cepas de *E. coli* aisladas de diferentes orígenes. 40 cepas aisladas de heces de portadores (19 caracterizadas como patotipos DEC) y 40 muestras clínicas aisladas de orina de mujeres que cursaban con ITU. 23 cepas fueron identificadas como patotipos híbridos (UPEC-DEC) (38.9%), siendo el más predominante aEPEC/UPEC (26%) aislados de portadores y UPEC/EAEC (26%) aislados de muestras clínicas. Del mismo modo en la búsqueda de genes de resistencia que codifican BLEE, el más predominante en cepas clínicas fue *bla*<sub>TEM</sub> (90%), seguido de *bla*<sub>CTXM-1-8</sub> (57%) y en cepas de portadores, *bla*<sub>CTXM-1</sub> (100%). Los genes no-BLEE asociados a quinolonas y aminoglucósidos se encontraron en 38 cepas de portadores y 34 cepas clínicas. Los más predominantes fueron para ambos ceparios *oqx*A con 44% y 56%, seguido de *qnr*B, con 28% y 44%, para portadores y clínicas respectivamente. El gen *aac* (6')-Ib-cr se encontró en el 100% de las cepas de portadores y en menor porcentaje en las muestras clínicas (6%). Respecto a los resultados obtenidos de la secuenciación de 3 cepas aisladas de portadores las cuales inicialmente se identificaron como patotipos DEC, se encontró que el genoma DEC-25.2 se clasificó como patógeno-híbrido al presentar genes de UPEC y poseer 99% de identidad en Islas Genómicas (IG) de ExPEC, además se agrupó filogenéticamente en clados cercanos al patotipo APEC. En cambio, los genomas DEC-36.3 y DEC-36.4 aislados del mismo portador son considerados como heteropatógenos-híbridos, al poseer 99% de identidad con genomas identificados como ETEC (patotipo DEC) y agruparse filogenéticamente en clados cercanos a patotipos DEC. El análisis del perfil de patotipos híbridos se logró sustentar mediante la técnica de ERIC-PCR, donde se presentaron 16 clados y permitió la agrupación de la mayoría las cepas clasificadas como híbridas dentro de los clados 4, 7, 12 y 16, revelando de esta manera la relación filogenética entre cepas DEC y ExPEC. Se realizó la caracterización plasmídica; 36 (90%) de las 40 cepas de portadores presentaron bandas plasmídicas (tamaños aproximados de 1.5 kb a 95 kb) con un perfil de bandas de 1 a 9 por cepa, el gen *tra*T fue encontrado en 29 cepas correspondiente al 80% y las familias de relaxasas más predominantes fueron las que se relacionan con plásmidos conjugativos MOB P12 (94%), MOB P13 (83%), MOB F12(72%) y en menor porcentaje plásmidos movilizables (MOB Qu, 72%). El perfil de bandas plasmídicas en las muestras clínicas fue el 85% (34 de 40), con tamaños aproximados de 1.5 kb a 92 kb y de 1 a 9 bandas por cepa; el gen *tra*T estuvo presente en el 58% (n=20) y las familias MOB más predominantes fueron MOB P12 (100%), MOB P13 (67%) y MOB Qu (55%). Los SAP más frecuentes encontrados para ambos ceparios fueron *ccd*AB (77% y 47%), *pem*KI (75% y 29%), *pnd*AC (75% y 38%) y *vag*CD (55% y 35%) para portadores y clínicas respectivamente, siendo estos los principales sistemas reportados en *E. coli*, implicados en la contribución a la virulencia, resistencia antibiótica y condiciones de estrés.

**Palabras clave:** *E. coli*, patotipos, resistencia, relación filogenética, plásmidos

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, bacteria comensal y anaerobia facultativa que sobrevive cuando se libera al medio ambiente y puede propagarse a nuevos huéspedes. Varios clones de *E. coli* altamente adaptados han adquirido factores de virulencia específicos, que les confieren una mayor capacidad de adaptación a nuevos nichos y les permiten causar un amplio espectro de enfermedades, e infecciones intestinales y también extraintestinales, son conocidos como patotipos; cada uno posee factores de virulencia asociados a la patogenia, así como también a manifestaciones clínicas, epidemiología, sintomatología y tratamiento específicas de cada patotipo (**figura 1**) (Erjavec, 2019; Águila Sánchez *et al.*, 2020).

## 1.2 Patotipos diarreogénicos (DEC)

Las cepas diarreogénicas de *E. coli* producen diarrea frecuentemente en todo el mundo, estas cepas se clasifican con base en su interacción con el enterocito, su epidemiología, su serología y sus propiedades de virulencia. Existen 6 categorías de patotipos DEC:

***E. coli* enteropatógena (EPEC)** se adhiere a las células de la mucosa del intestino delgado y su patogénesis depende del pili formador de mechones (BFP) codificada por el plásmido EAF y de la isla de patogenicidad cromosómica llamada locus de adherencia y destrucción del enterocito (locus LEE) (**figura 2**) (Carroll, 2016). Las cepas de EPEC presentan una variante conocida como *E. coli* enteropatógena atípica (aEPEC) debido a la ausencia del plásmido EAF (Farfán-García, *et al.*, 2016).

***E. coli* enterotoxigénica (ETEC)**, es causante de la conocida “diarrea del viajero”, sus factores de virulencia característicos son adhesinas heterogéneas también llamadas factores de colonización (CF) (Bennett *et al.*, 2020). De igual manera se caracteriza por la producción de enterotoxinas LT (termolábil), ST (termo estable)

próximas al intestino delgado, siendo las causantes de una enfermedad más grave. Los genes que codifican ST, LT y CF se encuentran en plásmidos. Un solo plásmido puede transportar los tres grupos de genes (**Ray & Ryan 2010**).

***E. coli* enterohemorrágica (EHEC)**, produce variantes de la toxina Shiga (Stx). Son las principales responsables de los casos graves de infección transmitida por alimentos (**Pokharel et al., 2023**). Presenta tropismo tisular por el colon más que por el intestino delgado, la interacción de EHEC con los enterocitos es la misma que para EPEC, con excepción de que no forman microcolonias localizadas en la mucosa y posee otras fimbrias y proteínas de superficie con características adhesivas específicas como la fimbria polar larga 1 y 2 (LpfA1 y Lpfa2). EHEC es responsable de una diarrea sanguinolenta y es el principal agente etiológico del síndrome hemolítico urémico (SHU), produciendo anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal (**figura 2**) (**Ray & Ryan 2010; Farfán-García, et al., 2016**).

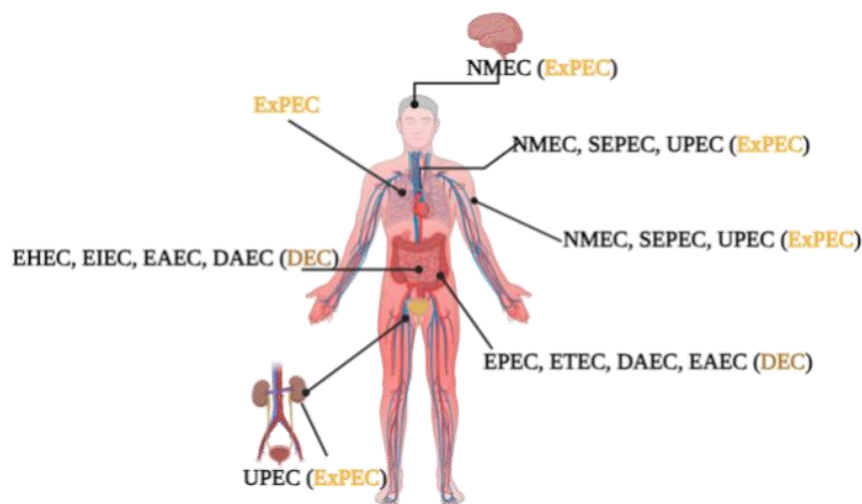
***E. coli* enteroagregativa (EAEC)**, se asocia con diarrea acuosa prolongada (de más de 14 días), en ocasiones con sangre y moco, se adhiere fuertemente a la mucosa intestinal del intestino delgado y grueso, pero no se presentan las lesiones de adherencia y destrucción (A/E) clásicas de EPEC y EHEC. La patogenia de la diarrea incluye la formación de biopelícula bacteriana en la superficie intestinal (**Ray & Ryan 2010**). Posee el plásmido de virulencia pAA que contiene al gen *aggR*, un regulador transcripcional de los genes de virulencia implicados en la biogénesis de la fimbria de adherencia agregativa, que se considera un factor que define a EAEC típica, por la formación de microcolonias típicas en forma de ladrillos apilados (**figura 2**), sin embargo existe una clasificación en la clínica para la identificación de EAEC atípicas (aEAEC) mediante la búsqueda del gen *aaIG* que se encuentra en cromosoma, formando parte de un operón que codifica para el sistema de secreción tipo 6 (**Geurtsen et al., 2022; Morin et al., 2013; Días et al., 2020**).

Las cepas de ***E. coli* adherente difusa (DAEC)**, se han asociado más a procesos diarreicos de tipo agudo y persistente en niños más que en adultos. Los adultos, al igual que los niños, pueden ser portadores asintomáticos. Se conoce poco de los

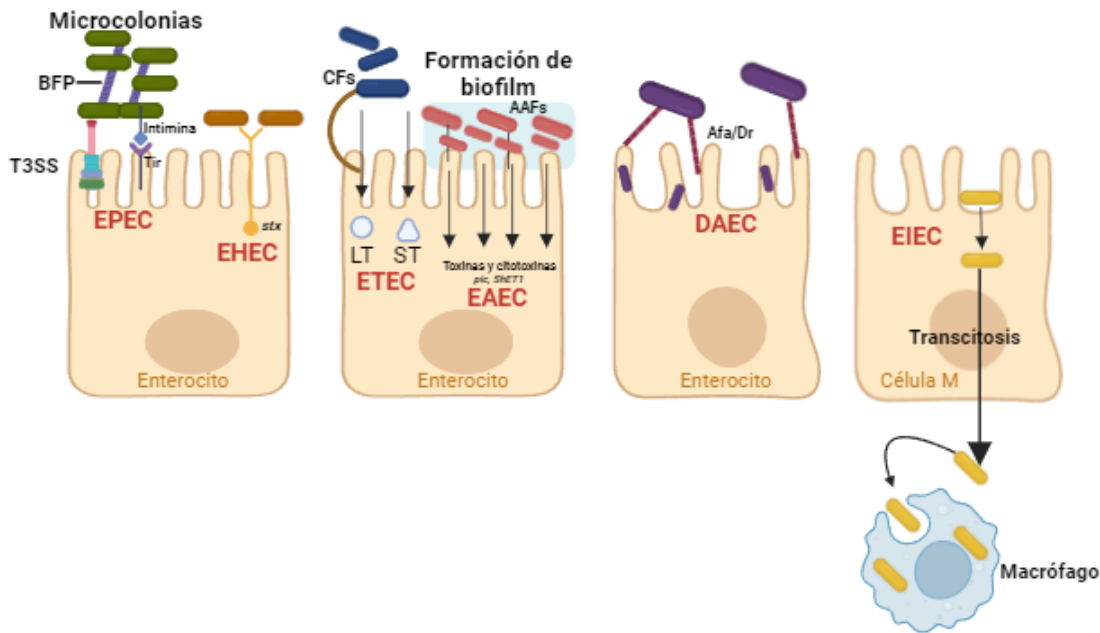
mecanismos de patogenicidad de DAEC, pero dentro de las principales características observadas en la patogénesis, está la unión mediante adhesinas a la mucosa intestinal y forman un patrón homogéneo de adherencia difusa (bacterias que se adhieren de manera homogénea a todas las células eucariotas) (**Farfán-García, et al., 2016**) (**figura 2**).

***E. coli* enteroinvasiva (EIEC)**, evade la respuesta inmune entrando fácilmente a las células epiteliales del colon por medio de adhesinas, moviéndose lateralmente para invadir otras células y los síntomas característicos en personas infectadas son diarrea acuosa, con sangre, moco y dolor abdominal (**figura 2**). Posee el plásmido de virulencia pINV que codifica para el Sistema de Secreción Tipo 3 (T3SS) y los antígenos de invasión de plásmidos (Ipa: *invasion plasmid antigens*) IpaA, IpaB, IpaC, IpaD, entre otros (**Farfán-García, et al., 2016**).

***E. coli* adherente invasiva (AIEC)**, patotipo con diversidad clonal que se agrupa genéticamente con cepas de *E. coli* extraintestinal, sin embargo, también es capaz penetrar la capa de mucina, adherirse e invadir las células epiteliales intestinales (IEC), translocarse al epitelio intestinal y colonizar macrófagos. Esto mediante la larga fimbria polar que media la adhesión de las AIEC a las placas de Peyer; los pili tipo I, que se unen a la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM6) mediante su adhesina FimH y la proteína AIEC IbeA que media la invasión de las células Caco-2 y M (**Barrios-Villa et al., 2020**).



**Figura 1. Sitios anatómicos del humano susceptibles de colonización por los diferentes patotipos de *Escherichia coli*.** (Modificado de Geurtsen et al., 2022).

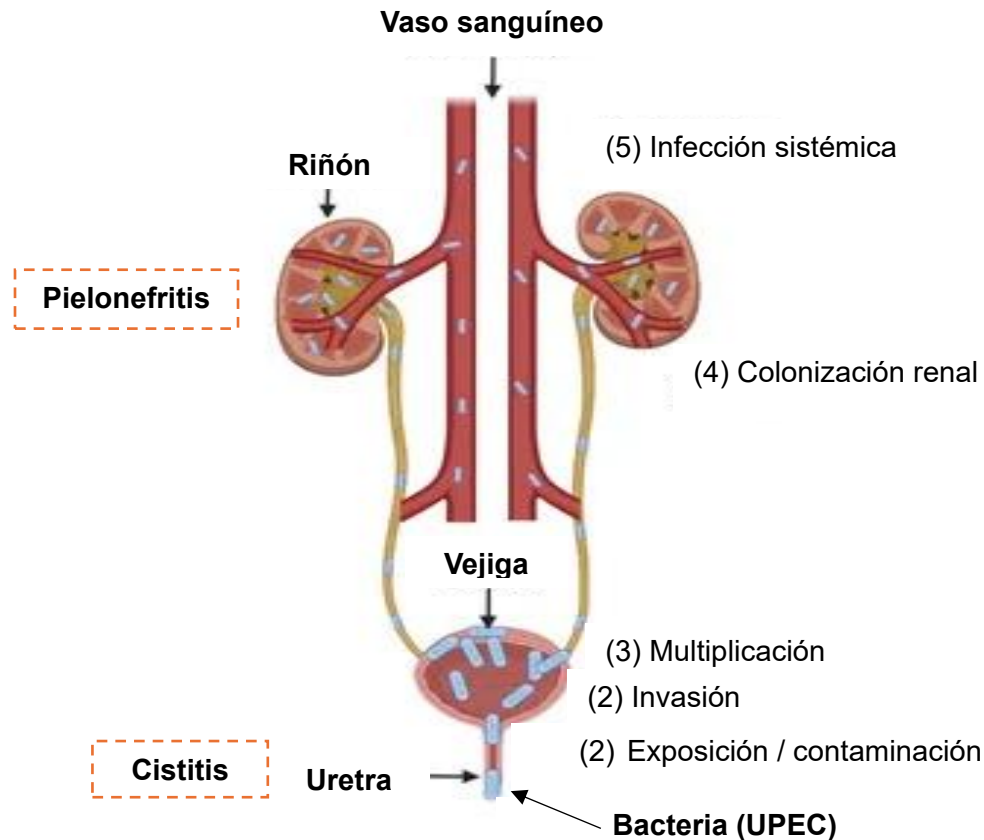


**Figura 2. Modelos de patogenicidad de las 6 categorías del patotipo diarreogénico de *E. coli*.** **EPEC:** Adherencia mediada por el pilus formador de mechones (BFP), que a su vez une a las bacterias formando microcolonias, el Sistema de Secreción tipo 3 (T3SS) que inyecta proteínas a la célula. La unión Tir-intimina permite la formación de las lesiones de adhesión y borrado (A/E). **EHEC:** La interacción con el enterocito esta mediada por la intimina y el T3SS y se caracteriza por la producción de la variante de la toxina Shiga (*Stx*). **ETEC:** Posee estructuras en su superficie llamadas factores de colonización que contribuyen a la adherencia; daño celular mediado por las toxinas, ST (toxina entero estable) y LT (toxina termo lábil). **EAEC:** Utiliza para la adhesión las fimbrias AAF (fimbrias de adhesión agregativa), para el daño celular utiliza la secreción de toxinas como *pic* (protease involved in intestinal colonization) en la producción de moco que atrapa las bacterias auto aglutinándose en el epitelio intestinal. **DAEC:** Expresan adhesinas afimbriales (Afa) y adhesinas fimbriales (Dr). **EIEC:** Mediante transcitosis atraviesa las células M, principales características de la patogenicidad: adhesión epitelial, supervivencia dentro de los macrófagos y la formación de biopelículas. (Elaborado en BioRender.com).

### 1.3 Patotipo extraintestinal (ExPEC)

Las infecciones extraintestinales, como el nombre lo indica, provocan enfermedad en sitios fuera del intestino, este patotipo incluye a *E. coli* uropatógena (UPEC), y *E. coli* asociada a meningitis neonatal (NMEC); Notablemente *E. coli* también es el agente más frecuentemente causante de sepsis y bacteriemia (SEPEC) y es la bacteria más comúnmente identificada en infecciones de piel y tejidos blandos ocupando un tercer lugar dentro de los agentes etiológicos de este tipo de infecciones (figura 1) (Geurtsen *et al.*, 2022). Las infecciones del tracto urinario

(ITU), son causadas principalmente por cepas UPEC y éstas suelen diferir de otras cepas de *E. coli* que integran a la microbiota intestinal en su capacidad de adherencia a células del epitelio vaginal y urinario (Torres & Mattera, 2006) (figura 3). Por lo general estos microorganismos producen una gran variedad de factores de virulencia.



**Figura 3. Mecanismo de patogenicidad de *Escherichia coli* uropatógena (UPEC).** (1) Las bacterias colonizan la uretra, ascendiendo a la vejiga provocando cistitis y en ocasiones a los riñones provocando pielonefritis (4). Las bacterias se adhieren a la superficie de la vejiga mediante fimbrias tipo 1 que a su vez también permiten la invasión (2), una vez adheridas continúan con su replicación (3) en el citoplasma celular. Cuando las bacterias móviles ascienden a riñones, lo colonizan (4) y existe un mayor riesgo de septicemia (5). (Modificado de Pokharel *et al.*, 2023).

#### 1.4 Factores de virulencia asociados a UPEC

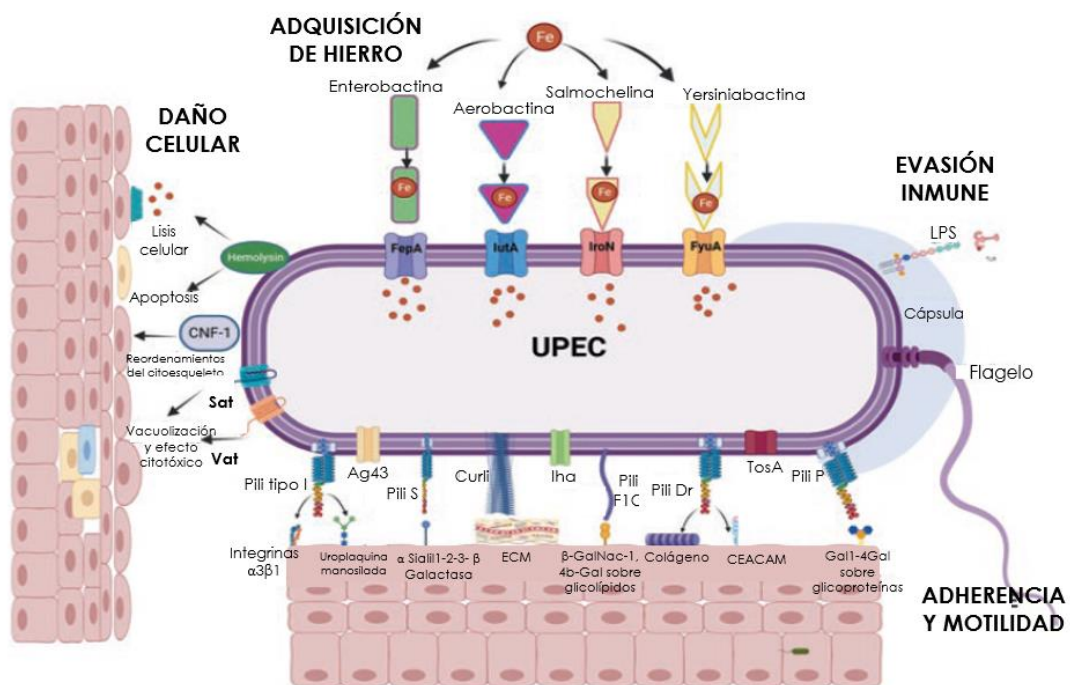
Las cepas de *E. coli* causantes de infección en vías urinarias por lo general ocupan un nicho en la microbiota intestinal del hospedero, cuando se produce una disbiosis en el organismo, estas bacterias migran de su reservorio y bajo las condiciones necesarias causan las enfermedades extraintestinales. UPEC cuenta con un arsenal de factores de virulencia principalmente implicados en los mecanismos de adhesión, evasión de la respuesta inmune, daño celular y sistemas de captación de hierro (**figura 4**).

Las **adhesinas fimbriales** son estructuras proteicas extracelulares en forma de pelo que permiten a la bacteria unirse al epitelio de la vejiga, siendo las más comunes la fimbria tipo 1 y la fimbria P o Pap. El producto del gen *fimH* de la fimbria tipo 1, es una lectina encargada de facilitar la unión a los receptores del hospedero y tiene especificidad por las estructuras que contienen D-manosa (**Whelan et al., 2023**). Las adhesinas PapG, forman parte de las fimbrias P, están asociadas con la inflamación en la vejiga y PapGII se relaciona con los casos de bacteriemia humana (**Sora et al., 2021**). Se han descrito una gran variedad de otras estructuras fimbriales y afimbriales que le permiten a UPEC adherirse a los epitelios vesical y renal como las fimbrias S, Dr, etc (**Barrios Villa et al., 2023**).

Del mismo modo el hierro es necesario en diversos procesos de patogénesis bacteriana; cuando la UPEC se encuentra en una zona con hierro limitado como el tracto urinario, secuestra al hierro mediante la expresión de **sideróforos**, estos son quelantes de hierro de moléculas pequeñas como la enterobactina, aerobactina, yersiniabactina y salmoquelina (**Terlizzi et al., 2017; Robinson et al., 2018**).

Ciertos genes están implicados en la **evasión de la respuesta inmune**, la presencia de los antígenos capsulares demostró ser un mecanismo clave utilizado por las bacterias para evadir la fagocitosis; el producto del gen *traT* es una proteína de membrana externa de plásmidos conjugativos que está implicada principalmente en la prevención del autoacoplamiento de células que portan plásmidos

conjugativos idénticos o estrechamente relacionados, sin embargo, también participa en otorgar a las bacterias protección contra la acción lítica del complemento (**Sukupolvi et al., 1990**). UPEC es capaz de sintetizar toxinas implicadas en el **daño celular** como el factor necrotizante citotóxico 1 codificada por el gen *cnf1*, la toxina autotransportadora secretada codificada por *sat*, la proteasa involucrada en la colonización codificada por *pic*, la toxina autotransportadora vacuolizante codificada por *vat* y la  $\alpha$ -hemolisina codificada por *hlyA* (**Sora et al., 2021**).



**Figura 4. Factores de virulencia asociados a la patogenicidad de UPEC.** Se destaca aquellos genes de virulencia asociados principalmente al daño celular (toxinas), adquisición de hierro (sideróforos), adhesión (adhesinas y fimbrias) y evasión de la respuesta inmune (Tomada y traducida de Barrios-Villa *et al.*, 2023).

### 1.5 Patotipos híbridos

**Santos et al.**, en **2020** adoptan dos términos para definir a este grupo; el término “heteropatógeno”, hace referencia a cepas de *E. coli* que poseen factores de virulencia característicos de dos o más patotipos DEC, por lo cual estrictamente son

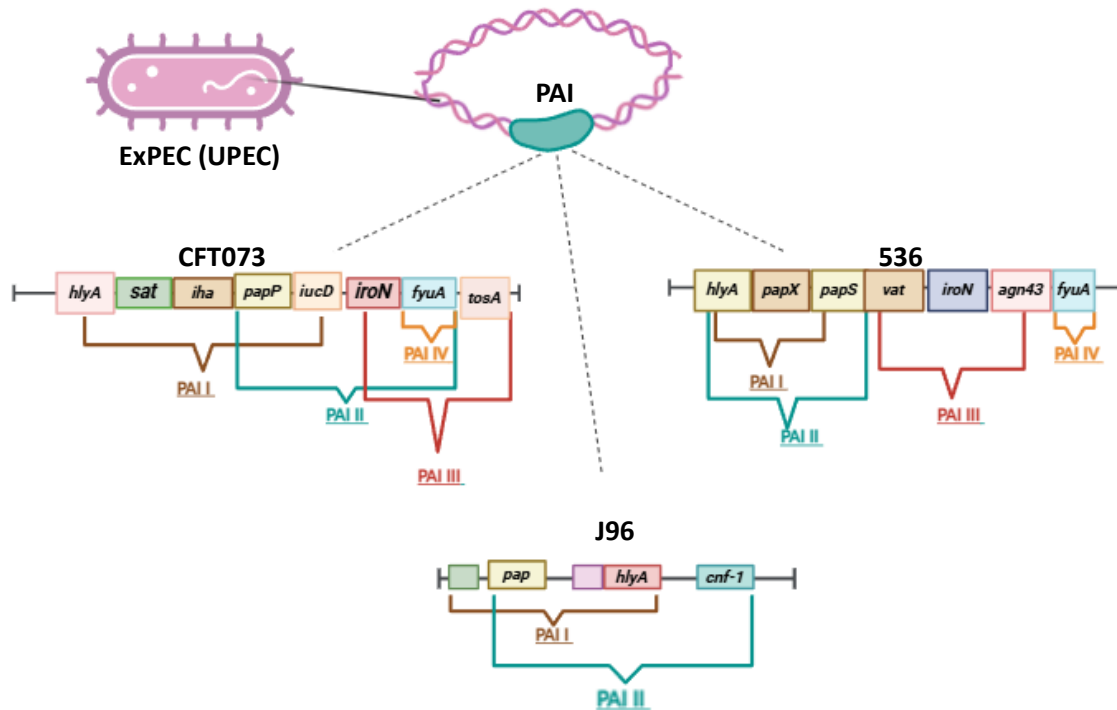
enteropatógenos y el término “patógeno híbrido” son cepas que albergan factores de virulencia que definen tanto a DEC como ExPEC, es decir que se aíslan de una infección extraintestinal, pero presentan factores de virulencia característicos de DEC. Al combinarse estos factores de virulencia en un hospedero, la enfermedad se puede agravar, lo cual dificulta el tratamiento y por ende la recuperación del paciente (**Santos et al., 2020**).

## 1.6 Islas de Patogenicidad (PAI's)

Varios factores de virulencia atribuidos a bacterias patógenas suelen estar codificados en Islas Genómicas de Patogenicidad (por sus siglas en inglés PAI). Es decir, están presentes en los genomas de una bacteria patógena pero ausentes en los genomas de un representante no patógeno de la misma especie o de una especie estrechamente relacionada (**Schmidt & Hensel, 2004**). Por lo cual, su importancia radica en que su presencia puede ayudar a estimar el potencial patógeno de la cepa que lo porta (**Sabaté et al., 2006**). El término de PAI fue acuñado por Hacker *et al.*, que describe dos grandes regiones inestables encontradas en el cromosoma de *E. coli* uropatógena (UPEC) (**Hacker et al., 2000**). Las PAI son elementos genéticos integrativos de gran tamaño, aproximadamente >10 kb, no replicativas e incapaces de automovilizarse (**Desvaux et al., 2020**). Frecuentemente difieren del genoma central en su composición de bases, así como también en el contenido promedio de G+C (Guanina + Citosina), suelen estar insertadas adyacentes a genes de ARNt (Ácido ribonucleico de transferencia) y flanqueadas por secuencias repetidas directas cortas, además usualmente poseen secuencias de inserción, integrasas, genes de fagos y transposasas (**Gal-Mor & Finlay, 2006; Schmidt & Hensel, 2004**). Algunas PAI's son regiones inestables y pueden desaparecer de manera espontánea del cromosoma y se sugiere que evolucionaron a partir de elementos genéticos móviles mediante la transferencia genética horizontal (**Dobrindt, 2002**).

Se ha descrito la presencia de PAI's en las cepas de UPEC prototipo 536, J96, CFT073 y UTI89. En la cepa CFT073 se han descrito 13 PAI's, y codifican para

genes relacionados a los sistemas de captación de hierro, operón del pili tipo P y un operón de  $\alpha$ -hemolisina. En la UPEC 536 se han descrito PAI's con genes de virulencia como el sideróforo yersiniabactina en la PAI IV<sub>536</sub>, la cepa de UPEC J96 posee el operón *pap* y *hly*, así como también los genes que codifican para el factor de necrosis citotóxica (*cnf-1*) (Desvaux *et al.*, 2020) (figura 5).

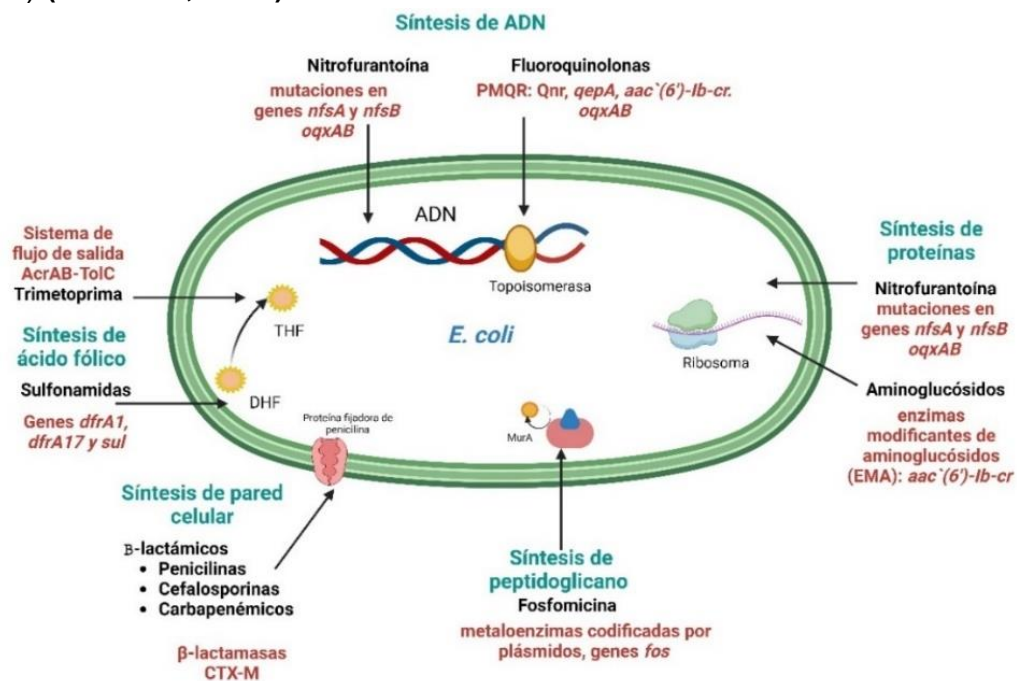


**Figura 5. Principales Islas de Patogenicidad (PAIs) descritas en *E. coli* extraintestinal.** Representación gráfica de genes de virulencia que se encuentran en las PAI de genomas de *E. coli* uropatógena (UPEC). ***hlyA***:  $\alpha$ -hemolisina; ***fyuA***: yersiniabactina; ***iha***: receptor de adhesina/enterobactina homólogo de *irgA*; ***papP***: pilus P; ***sat***: toxina secretada por autotransportador; ***iroN***: receptor de salmoquelina; ***vat***: toxicidad por autotransportador vacuolante; ***papS***: pili S; ***papX***: fimbria P; ***tosA***: adhesina no fimbrial; ***agn43***: antígeno 43; ***cnf-1***: factor necrotizante citotóxico (Adaptado de Desvaux *et al.*, 2020 y elaborado en BioRender.com).

### 1.7 Resistencia antibiótica a $\beta$ -lactámicos

La multiresistencia a los antibióticos expresada por los distintos géneros bacterianos ha sido calificada por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como “*un problema sanitario urgente de dimensión mundial*”; dentro de los microorganismos relevantes, *E. coli* como miembro de las enterobacterias, se ha clasificado como un

patógeno de prioridad crítica, debido a su resistencia a cefalosporinas de tercera generación y a carbapenémicos, ya que tiene el potencial de producir  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y carbapenemasas, las cuales son enzimas capaces de hidrolizar a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (WHO, 2024). En esta categoría de antibióticos se incluye a las penicilinas, cefalosporinas de espectro extendido (como cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima o cefepima), carbapenémicos (ertapenem, imipenem y meropenem) y monobactámicos (aztreonam) (figura 6) (Mosquito *et al.*, 2011). Las enzimas BLEE del tipo CTX-M son las más ampliamente distribuidas y dominantes a nivel mundial, confieren resistencia a cefotaxima y ceftriaxona y su presencia en las cepas bacterianas se asocia con la coresistencia a los antibióticos de las familias de las fluoroquinolonas y aminoglucósidos. CTX-M15 y CTX-M14 son las variantes que se aíslan con mayor frecuencia a nivel mundial (Zeynudin *et al.*, 2018; Cantón *et al.*, 2012). Estos genes de resistencia frecuentemente son albergados en elementos genéticos móviles como los plásmidos (véase más adelante) (Carattoli, 2009).



**Figura 6. Mecanismo de acción y de resistencia de los principales antibióticos utilizados en la clínica contra enfermedades causadas por *E. coli*.** Las diferentes familias de antibióticos aparecen en negro. En azul el mecanismo de acción de cada familia de antibióticos. En color rojo se muestran los principales mecanismos de resistencia. **PMQR:** Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (Modificado de Whelan *et al.*, 2023).

### 1.7.1 Resistencia a quinolonas y aminoglucósidos

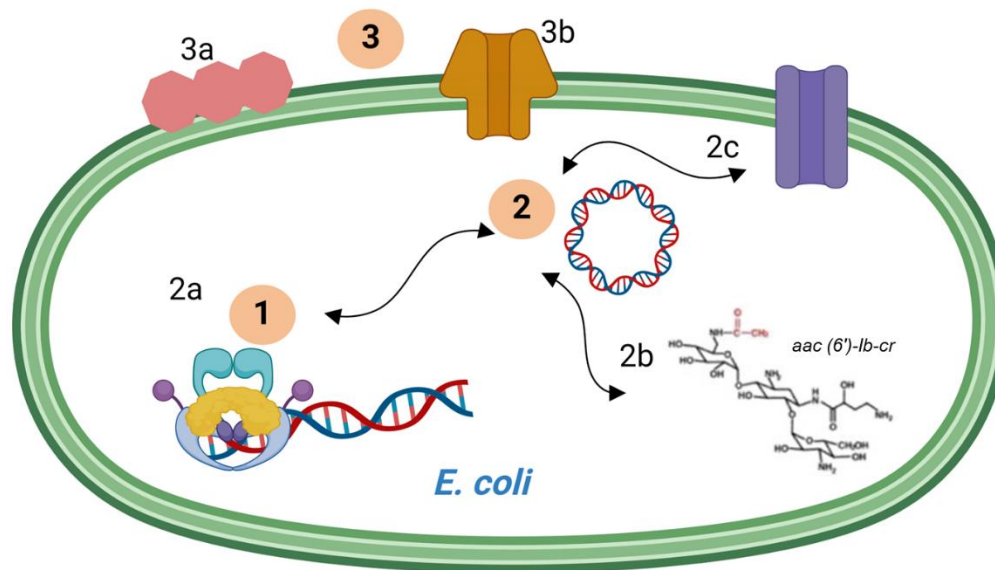
Las quinolonas son antibióticos de amplio espectro que se utilizan en el tratamiento contra diversas infecciones bacterianas, son considerados bactericidas ya que matan directamente a la bacteria, su sitio diana son la topoisomerasa IV y la ADN girasa implicadas en la síntesis de ADN bacteriano (**Whelan et al., 2023; Mosquito et al., 2011**). Por otro lado, la familia de antibióticos aminoglucósidos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas, principalmente se unen al sitio A del ARN ribosomal 16S del ribosoma 30S, también son considerados de amplio espectro, sin embargo, presentan mayor actividad bactericida contra bacilos Gram negativos (**Krause et al., 2016**).

En la clínica comúnmente la terapia que se administra es combinada con un antibiótico  $\beta$ -lactámico y un aminoglucósido, esto debido a que al momento de inhibir el crecimiento de la pared celular por parte de los  $\beta$ -lactámicos favorece la entrada de los aminoglucósidos al citoplasma bacteriano donde interfieren en la síntesis de proteínas, lo cual podría dar lugar a un tratamiento más efectivo para los pacientes (sinergismo) (**Ramos et al., 2016**).

Sin embargo, las bacterias presentan distintos mecanismos de resistencia (**figura 7**); la resistencia a quinolonas está mediada por plásmidos (PMQR), en los que se albergan genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* y *qnrD*) estas protegen a la ADN girasa y la topoisomerasa IV de la inhibición por quinolonas. Otro mecanismo conocido son los sistemas membranales de expulsión tales como QepA que confieren resistencia a quinolonas hidrofílicas como ciprofloxacina y norfloxacina, y la bomba de eflujo *oqxAB*, que contribuye a la expulsión de ácido nalidixico y ciprofloxacina (**Eftekhari et al., 2015; Chávez-Jacobo et al., 2015**).

De igual forma, existe una alta prevalencia de Enzimas Modificadoras de Aminoglucósidos (EMA), estas catalizan la modificación covalente de grupos funcionales que se encuentran en el antibiótico, las más comunes son las de tipo (Aac) conocidas como acetiltransferasas. Donde Aac-(6')-Ib-cr, es la más

prevalente, esta acetila algunas quinolonas reduciendo su efectividad y del mismo modo frente a aminoglucósidos como kanamicina, tobramicina y amikacina (Chávez-Jacobo *et al.*, 2015; Mella *et al.*, 2004).



**Figura 7. Mecanismos de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos.** (1) Resistencia mediada por mutaciones en los genes de las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV. (2) Resistencia mediada por genes plasmídicos: (2a) Proteínas Qnr (en amarillo); (2b) La enzima Aac-(6')-Ib-cr, que acetila algunas quinolonas reduciendo su efectividad; (2c) Sistemas membranales de expulsión; (3) Resistencia mediada por genes cromosómicos: (3a) Disminución de la expresión de porinas, que limita el ingreso del antibiótico; (3b) Sistemas de expulsión (Modificado de Chávez-Jacobo *et al.*, 2015).

### 1.8 Relación filogenética

Con el fin de establecer relaciones filogenéticas entre genomas bacterianos se emplean distintas metodologías como RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) y ERIC-PCR (Enterobacterial repetitive Intergenic Consensus). La ERIC-PCR, consiste en la amplificación de secuencias repetitivas cortas que se encuentran dentro de regiones transcritas, donde el número de copias varía entre especies, son palíndromos imperfectos de 127 pb y las secuencias están altamente

conservadas al nivel de la secuencia de nucleótidos, pero sus localizaciones cromosómicas difieren entre las especies con base en eventos evolutivos por lo que se considera un importante marcador de evolución (**Félix-Murray, 2021; Otokunefor et al., 2020**).

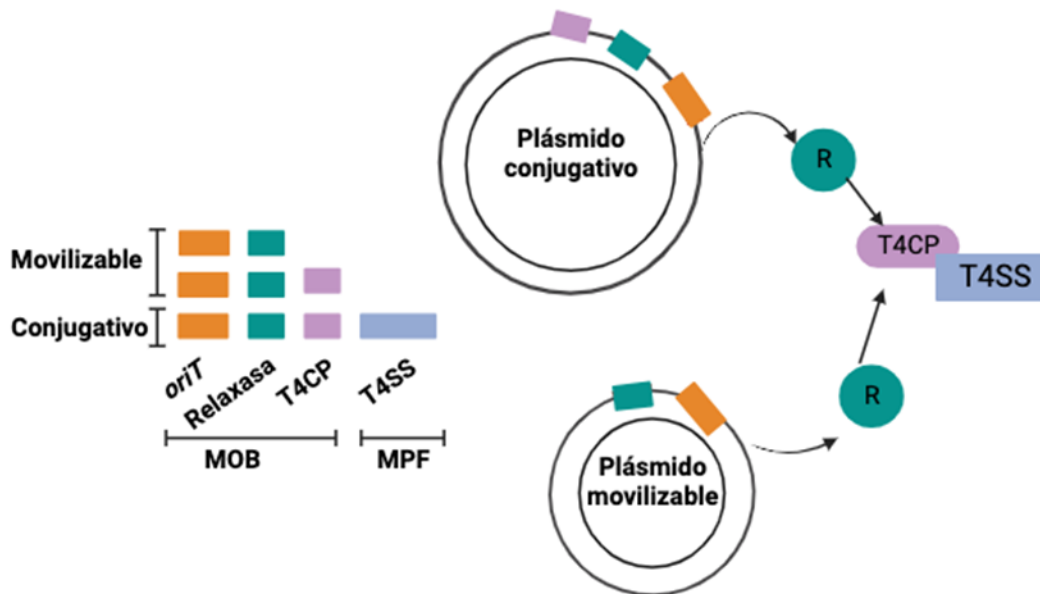
La metodología empleada consiste en una PCR convencional, utilizando un par de oligonucleótidos que hibridan en estas secuencias repetitivas (**Movahedi et al., 2021**). Por lo que, los microorganismos que se encuentren más estrechamente relacionados poseerán distribuciones de segmentos similares (**Wilson & Sharp, 2006**).

### **1.9 Elementos Genéticos Móviles (EGMs): Plásmidos**

Los EGM's bacterianos proporcionan papeles importantes en la evolución y en la dispersión de genes de resistencia a antibióticos y de virulencia; dentro de este grupo de elementos se encuentran transposones, integrones, fagos y plásmidos. Estos últimos son elementos extra cromosómicos habitualmente de forma circular covalentemente cerrados, aunque en ciertas bacterias se encuentran en forma lineal. Los plásmidos son capaces de replicarse de manera autónoma, es decir, independientemente del ADN cromosomal y en una cepa pueden existir varios tipos de plásmido o varias copias del mismo plásmido, estos a su vez se pueden clasificar en conjugativos, móviles y no móviles con base en su capacidad de transferencia (**Shintani et al., 2015**).

Los plásmidos conjugativos suelen ser de gran tamaño (>25 kb), con bajo número de copias y para ser considerados como tal deben de poseer distintas características: un origen de transferencia (*oriT*), una relaxasa (R), una proteína de acoplamiento de tipo IV (T4CP) y un sistema de secreción tipo IV (T4SS), proporcionando toda la maquinaria necesaria para transferir el material genético a otra célula bacteriana (**de Toro et al., 2015; Coluzzi et al., 2022**). En cambio, los plásmidos móviles se caracterizan por ser relativamente pequeños (<20 kb), con un número de copias alto debido a que no albergan un sistema completo de

transferencia, se limitan a componentes relaxosomales *oriT*, un gen de la relaxasa y utilizan el sistema MPF de un plásmido conjugativo (**figura 8**) (Smillie *et al.*, 2010; de Toro *et al.*, 2015). Por otra parte, los plásmidos no móviles presentan tamaños aproximados de 4-40 kb y se piensa que son transferidos mediante los mecanismos de transformación o transducción (bacteriófagos) (de Toro *et al.*, 2015).



**Figura 8. Diferencias en los Componentes de los plásmidos conjugativos y movilizables.** MOB: Movilizable, MPF: Formación de Pares de Apareamiento, *oriT*: Origen de Transferencia, R: Relaxasa, T4CP: Proteína de acoplamiento tipo 4 y T4SS: Sistema de Secreción Tipo 4 (Ortega-Enríquez *et al.*, 2024).

### 1.9.1 Elementos plasmídicos asociados a la conjugación

Para transferir el material genético de un plásmido que se encuentra en una célula donadora a una receptora en el inicio del mecanismo de conjugación requiere de la expresión de genes de transferencia (*tra*) en los plásmidos, dichos genes se encuentran en un operón continuo de 40 kb aproximadamente, donde se codifican proteínas que son útiles para la propagación del plásmido, cada gen del operón codifica un producto proteico diferente, tales como los factores involucrados en la elaboración del pilus conjugativo, así como del T4SS necesario para la formación

del par de apareamiento y los componentes del relaxosoma para el procesamiento del plásmido previo a que se dé la transferencia (**Frankel et al., 2023; Virolle et al., 2020**).

Junto con los genes *tra*, la relaxasa (R) es otro componente de los plásmidos conjugativos y movilizables. Consiste en una proteína multidominio que se divide en 6 familias MOB: MOBF, MOBP, MOBH, MOBQ, MOBV y MOBC según relaciones evolutivas entre las secuencias de las distintas relaxasas y los plásmidos transmisibles, lo que permite clasificar con base en su origen (**Alvarado et al., 2012; Rozwandowicz et al., 2018**).

Otra característica para describir a los plásmidos es mediante la búsqueda de los sistemas de adición plasmídicos (SAP), estos ayudan al mantenimiento del plásmido en la célula, los más frecuentes en *E. coli* son los sistemas de tipo II toxina-antitoxina (TA). Estos sistemas están codificados por un operón que comprende dos genes pequeños que se superponen o están separados por unas pocas bases y cada toxina con su antitoxina cognada forman un complejo proteína-proteína estable para neutralizar su toxicidad donde las toxinas son estables, mientras que las antitoxinas son menos estables; por lo tanto, las antitoxinas deben producirse constantemente para neutralizar las toxinas (**Qiu et al., 2022**).

Si el plásmido que lleva un módulo TA no se transmite a la célula hija, la antitoxina se degrada mientras que la toxina estable permanece y actúa sobre sus objetivos celulares para matar o inhibir el crecimiento de las células libres de plásmido (**Wu et al., 2020; Unterholzner et al., 2013**). Así mismo los TA codificados en plásmidos juegan un papel importante en medir la exclusión de plásmidos compatibles coexistentes, ya que se puede presentar el caso de plásmidos que contengan el mismo grupo de incompatibilidad evitando que persistan de manera estable en la misma célula (**Unterholzner et al., 2013**). Los sistemas TA más frecuentemente encontrados en *E. coli* son CcdAB, Hok-sok, ParDE, VagCD, PemKI y RelBE (**Fernández-García et al., 2016**).

## 2. ANTECEDENTES

Son considerados como antecedentes directos los siguientes estudios debido a que se reportan resultados semejantes o a discutir con lo reportado en la presente tesis.

### 2.1 Caracterización en base al patotipo de *E. coli*

**Sabaté et al., 2006** a partir de 50 muestras comensales de heces, se identifica que la PAI más prevalente fue PAI IV correspondiente a la cepa UPEC536 (38%), seguido de PAI I CFT073 (26%), PAI II CFT073 (14 %) y PAI II J96 (8 %).

**Yacarini-Martínez et al., 2019** trabajan con 106 cepas de *E. coli* aisladas por coprocultivo de muestras de diarrea de niños menores de 5 años procedentes de 9 establecimientos de salud de la región Lambayeque en Perú. Mediante una PCR multiplex se identifica que el 16.98 % de las cepas corresponden al patotipo DAEC (gen *daaD*), seguido de ETEC (gen *st*, 11.32%), EAEC (gen *aggR* 7.55%) y EPEC (gen *eaeA* 1.89%).

En nuestro grupo de trabajo del Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos (LBME), **Huelgas en 2020** a partir de 24 cepas aisladas de muestras de orina, detecta a las PAI ICFT073 + PAI IICFT073 (33%, n=8) y PAI ICFT073+ PAI IICFT073 + PAI IIJ96 (30%, n=7).

Del mismo modo, **Cortez de la Puente en el 2020** a partir de muestras de orina (51 cepas) detecta una mayor presencia de la PAI I CFT073 con un 39% (n=20), seguido de la PAI IICFT073 con un 33% (n=17) y se reporta que solo el 4% (n=2) fue positiva para la PAI IIJ96.

**Santoyo et al., 2020**, caracterizan 30 aislados de *E. coli* obtenidos de biota intestinal en niños sanos en Zacatecas, México, en función del grupo filogenético y de los factores de resistencia y virulencia que poseen como los sistemas de captación de hierro expresados frecuentemente en UPEC. Los aislados pertenecen principalmente al grupo filogenético A (43.3%) y la frecuencia de cada uno de los genes fue de *iroN* (receptor del sideróforo salmoquelina 76.6%), para *sitA*

(transportador de hierro-manganeso) y *feoB* (Proteína B transportadora de hierro ferroso 73.3%) respectivamente. Así como también se presenta una alta resistencia a la cefalotina (60%), seguida de kanamicina (26.6%) y el 23.3% tanto para la ampicilina, trimetoprima/sulfametoxazol y ácido nalidíxico.

**Millán et al., 2020**, estudian 17 cepas de UPEC aisladas de orina en Venezuela, los genes de virulencia más frecuentes fueron *fimH* (adhesina de la fimbria tipo 1) y *fyuA* (sideróforo yersiniabactina) con 82%, seguidos de *usp* (proteína específica uropatógena) (53%), *kpsMTII* (cápsula polisacárida específica del grupo II) (47%) y *papAH* (fimbria P) (18 %). Además, se realiza la búsqueda de una sola isla de patogenicidad, la PAI ICFT073 (isla de patogenicidad I) (41%). Filogrupo B2 (41%) fue el predominante.

**Ballesteros-Monrreal et al., 2021**, de los 40 aislamientos obtenidos de UPEC en Sonora, México, a partir de muestras de orina de mujeres, se investiga la prevalencia de 18 genes asociados a la patogénesis de UPEC (*fimH*, adhesina del pilus tipo 1; *sfaD/focC*, fimbrias S y *dra*; *papG-II*, alelo 2 de la adhesina del pilus tipo P; *papC*, chaperona del pilus tipo P; *fliCD*, flagelos; *sat*, toxina secretada por autotransportador; *kpsM*, cápsula; *hlyA*,  $\alpha$ -hemolisina; *traT*, proteína de resistencia sérica; *agn43*, antígeno 43; *vat*, toxicidad por autotransportador vacuolante; *cnf-1*, factor citotóxico necrotizante; *fyuA*, yersiniabactina; *iucD*, aerobactina; *iron*, receptor de salmoquelina; *iutA*, receptor de aerobactina; *feoB*, transportador de hierro ferroso; *iha*, receptor de adhesina/enterobactina homólogo de *irgA*). Obteniendo como resultados a los más prevalentes como *fimH* (100%), seguido de *feoB* (transportador de hierro férrico 98%) y *fliCD* (flagelo, 90%). La formación de biopelículas (100%) y la motilidad (98%). Los aislados clínicos muestran una alta resistencia a los antibióticos aminoglucósidos y  $\beta$ -lactámicos, la resistencia se dio principalmente hacia los antibióticos AMK (amikacina), GM (gentamicina), AMP (ampicilina), CFX (ceftazidima), CTX (cefotaxima), y AMC (amoxicilina/clavulanato).

En el estudio de **Nascimento et al., 2021** en Brasil a partir de 452 cepas UPEC, 9 se identifican como cepas híbridas, que se clasifican como UPEC/EAEC

(7/9) y UPEC/aEPEC (2/9). Una cepa UPEC/aEPEC es resistente a las cefalosporinas de tercera generación y porta el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Las cepas pertenecen a los filogrupos A (cinco), B1 (tres) y D (una) y solo las cepas UPEC/EAEC son hemolíticas (cinco cepas) y producen biopelícula.

**Tanabe et al., 2022** en Brasil a partir de 112 aislados UPEC, se identifican cinco patotipos híbridos (4,5%); UPEC/aEPEC (un aislado) y UPEC/EAEC (cuatro aislados) respectivamente. La mayor resistencia a los antibióticos se observa para ampicilina (46,4%) y trimetoprim/sulfametoxazol (34,8%), así como también el 9,8% de los aislados se identifican como productores de BLEE+ incluido un híbrido UPEC/EAEC.

**Méndez-Moreno et al., 2022**, aísla 90 cepas de *E. coli* a partir de heces de portadores sanos en Sonora México, se determina grupo filogenético y patotipos diarreogénicos mediante la búsqueda por PCR de determinantes asociados a patotipos diarreogénicos: gen *bfpA* para identificar EPEC, gen *eae* para EPEC/EHEC, *stx1* y *stx2* para EHEC/STEC, toxinas termolábiles (LT) y termoestables (ST) para ETEC, genes *daaE* y *afa/draBC* para DAEC, pCVD432 para EAEC e *ial* para identificar EIEC. Se obtiene un mayor porcentaje del filogrupo B2 (36.9%), seguido del filogrupo A (14.4%) y 47 aislamientos, fueron patotipos diarreogénicos, predominando EPEC (40), seguido del ETEC (3), además 3 patotipos híbridos (EPEC/ETEC, EPEC/DAEC y EPEC/ETEC/DAEC). Se observa un alto porcentaje de resistencia a aminoglucósidos (GM 100%) y/a sulfonamidas (TMP-SMT 100%). El 100% de las cepas fueron clasificadas como MDR.

**Llorente et al., 2023** en España recolectan muestras de pacientes con diarrea sin antecedentes de viajes recientes al extranjero (edades de 0 a 102 años). Se obtienen 1796 cepas de *E. coli*, donde los patotipos DEC más predominantes son aEPEC (3,3%, 235/1.769), EAEC (7,8%, 138/1.769), y STEC (3,6%, 63/1.769). La infección por DEC se encuentra en un número significativamente mayor de pacientes ≤5 años y las infecciones por EAEC y aEPEC se asocian especialmente con este grupo de edad.

## 2.2 Genotipo y fenotipo de resistencia antibiótica de *E. coli*

Con respecto a los genes de resistencia No-BLEE, en Chile **Elgorriaga-Islas et al., 2011** a partir de 100 cepas de *E. coli* aisladas de muestras clínicas de pacientes hospitalizados, la prevalencia del gen *aac(6)-Ib-cr* es del 74%.

En el estudio de **Cortés Cortés, en 2016** a partir de muestras fecales de 60 individuos clínicamente sanos de la ciudad de Puebla, México, todas las cepas son multirresistentes, donde en 11 de ellas se recupera *E. coli* CTX (1 cepa por persona, 18%); 6/11 de los aislados albergaron el gen que codifica para la BLEE CTX-M-15 (54%), también se identifican genes que brindan resistencia a quinolonas (*qnrB19* 9% 1/11) y aminoglucósidos (*aac(6')-Ib-cr* 45% 5 / 11).

**Guamán** en su estudio en Ecuador del **2020**, a partir de 319 muestras de orina, se obtienen 59 aislados de *E. coli* donde la mayoría de las cepas son aisladas de muestras procedentes de pacientes femeninas (n=56, 96%), y el mayor número de casos estuvo en pacientes con rango de edad entre 21 a 40 años. Se detecta resistencia del 51.7% a Ampicilina; Cefazolina y Cefoxitina (16.7%), Gentamicina y Tobramicina (6.7%); Ciprofloxacino (31.7%); Levofloxacino (25%) y 56.7% a Trimetoprim/Sulfametoxazol.

**Gallegos-Miranda et al., 2020** en Hermosillo, Sonora a partir de 198 aislados BLEE+ de *E. coli*, donde 162 muestras correspondían a origen de orina. Las variantes BLEE más prevalentes son CTX-M-1 (88%) y CTX-M-9 (5%). El gen *aac(6')-Ib-cr* se identifica en el 62%, mientras que los genes *qnrB* y *qnrS* se detectan en el 49% de los aislados.

En el estudio de **Mira Bleda, 2022** llevado a cabo en España, se incluyen un total de 404 pacientes con el diagnóstico de pielonefritis aguda, 52 varones (12,9%) y 352 mujeres (87,1%), la resistencia de *E. coli* a quinolonas fue del 18,8% y del 7,4% a cefalosporinas. Dentro de los factores de riesgo, destacan el sexo masculino para la resistencia a quinolonas y la cirugía urinaria en las cefalosporinas.

### 2.3 Perfil plasmídico en cepas de *E. coli*

Del mismo modo en el grupo de trabajo del LBME, en lo que respecta al perfil plasmídico, en el estudio de **Ixtapan-Tejero en el 2018** a partir de 51 cepas UPEC, 23 (45%) observa una amplia distribución de bandas plasmídicas, el mayor tamaño oscilaba alrededor de 10.5 kb mientras que los plásmidos de menor tamaño rondaban los 0.25 kb. El gen *traT* se encuentra en un 48% y la familia MOB12 en el 34.7% de las cepas (n=8).

En el estudio de **Cortez de la Puente, 2020**; A partir de 51 cepas de pacientes femeninos que cursan con ITU, donde el filogrupo B2 es el más predominante se realiza la búsqueda de *mobQ* y *traT* genes asociados a plásmidos conjugativos; donde la prevalencia de los genes es: *traT* (n=27), MOBQ11 (n=1), MOBQ12 (n=6) y MOBQu (n=4).

**Barrios-Villa et al., 2018** en 4 cepas de *E. coli* de heces de portadores pertenecientes al filogrupo B2, MDR, observan plásmidos que albergan grupos de incompatibilidad IncK y del complejo IncF. Las relaxasas presentes son MOB-F11 (100%), seguido de MOBQ12, MOBQ11, MOBP51 Y MOBC12.

**Pedroza Viveros, 2022**; 55 cepas de UPEC, 35 presentan bandas plasmídicas, donde el tamaño aproximado de las bandas plasmídicas visualizadas osciló entre 3.5 kb, principalmente 3-3.5 kb (25%). El gen *traT* se encuentra en 30 plásmidos. La relaxasa MOB12 es la más reportada (29.09%), seguida de la sub-familia MOBQu (5.45%).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La bacteria *E. coli* puede colonizar el tracto gastrointestinal tanto de humanos como de animales sin causar daño. Pero algunas cepas presentan factores de virulencia asociados a la patogenicidad (intestinal por los patotipos diarreogénicos o extraintestinal principalmente por la *E. coli* uropatógena causante de infección urinaria).

El problema surge cuando factores de virulencia de diferentes patotipos son adquiridos y mantenidos en el genoma de *E. coli* presentes en diferentes hábitats, generando patotipos híbridos patógenos que pueden causar una enfermedad más grave, ampliando sus lugares de colonización, junto con otras características adaptativas como la presencia de plásmidos conjugativos.

La transferencia genética horizontal en bacterias les proporciona a los microorganismos una mayor variabilidad genética, contribuyendo a su evolución. El proceso de conjugación bacteriana es el más estudiado y los plásmidos juegan un papel importante, al ser elementos genéticos potencialmente móviles que facilitan la propagación de genes de virulencia y/o resistencia de una cepa patógena a una cepa comensal.

Hay pocos estudios sobre genomas de *E. coli* aisladas de portadores por lo que la secuenciación permitirá conocer las características genómicas de dichas cepas y determinar su patotipo y potencial para causar enfermedad.

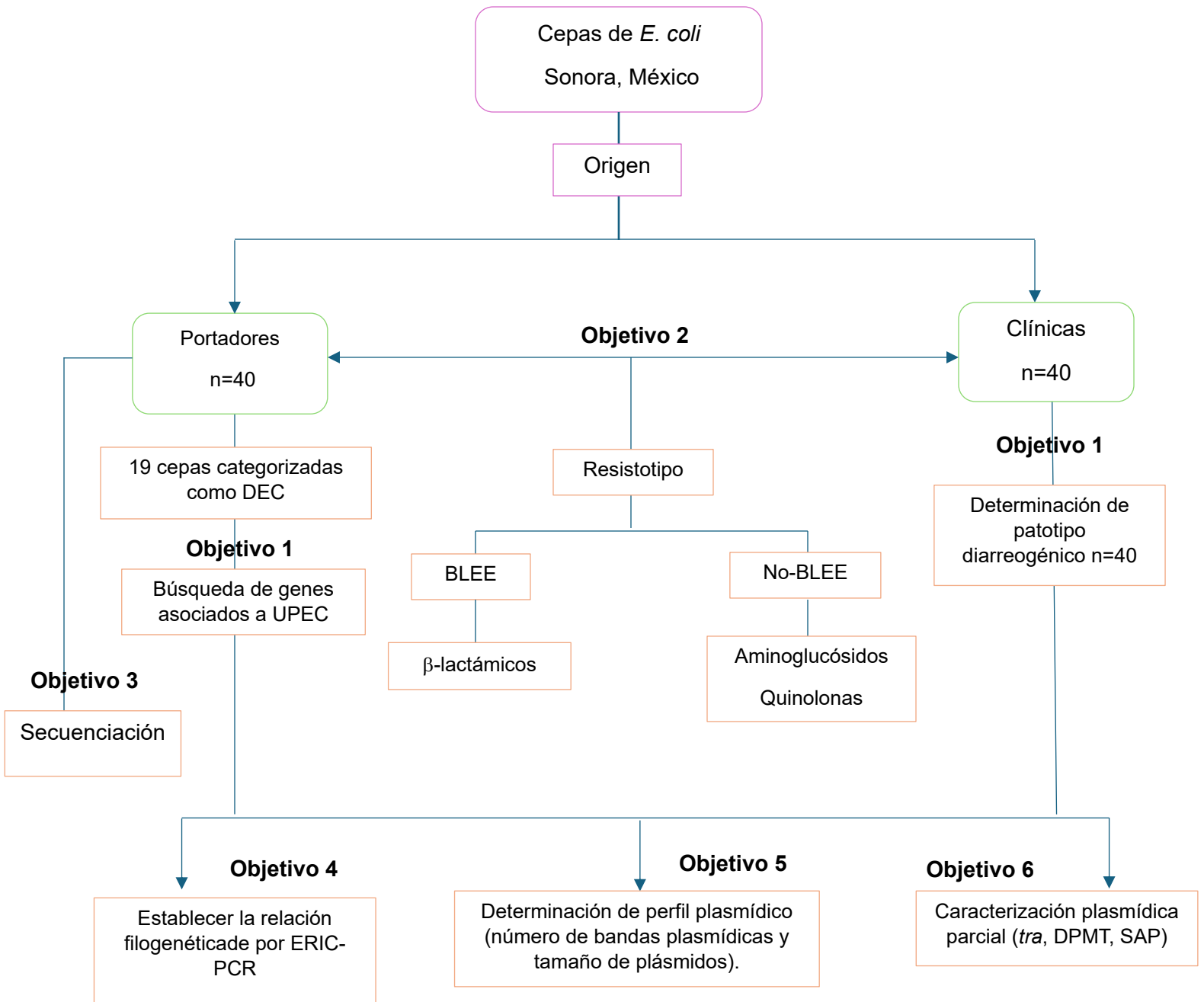
#### 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar los patotipos y las características asociadas a virulencia y resistencia en una colección de cepas de *Escherichia coli* de diferentes orígenes y analizar las características genómicas de *E. coli* aislada de portadores.

#### 5. OBJETIVOS PARTICULARES

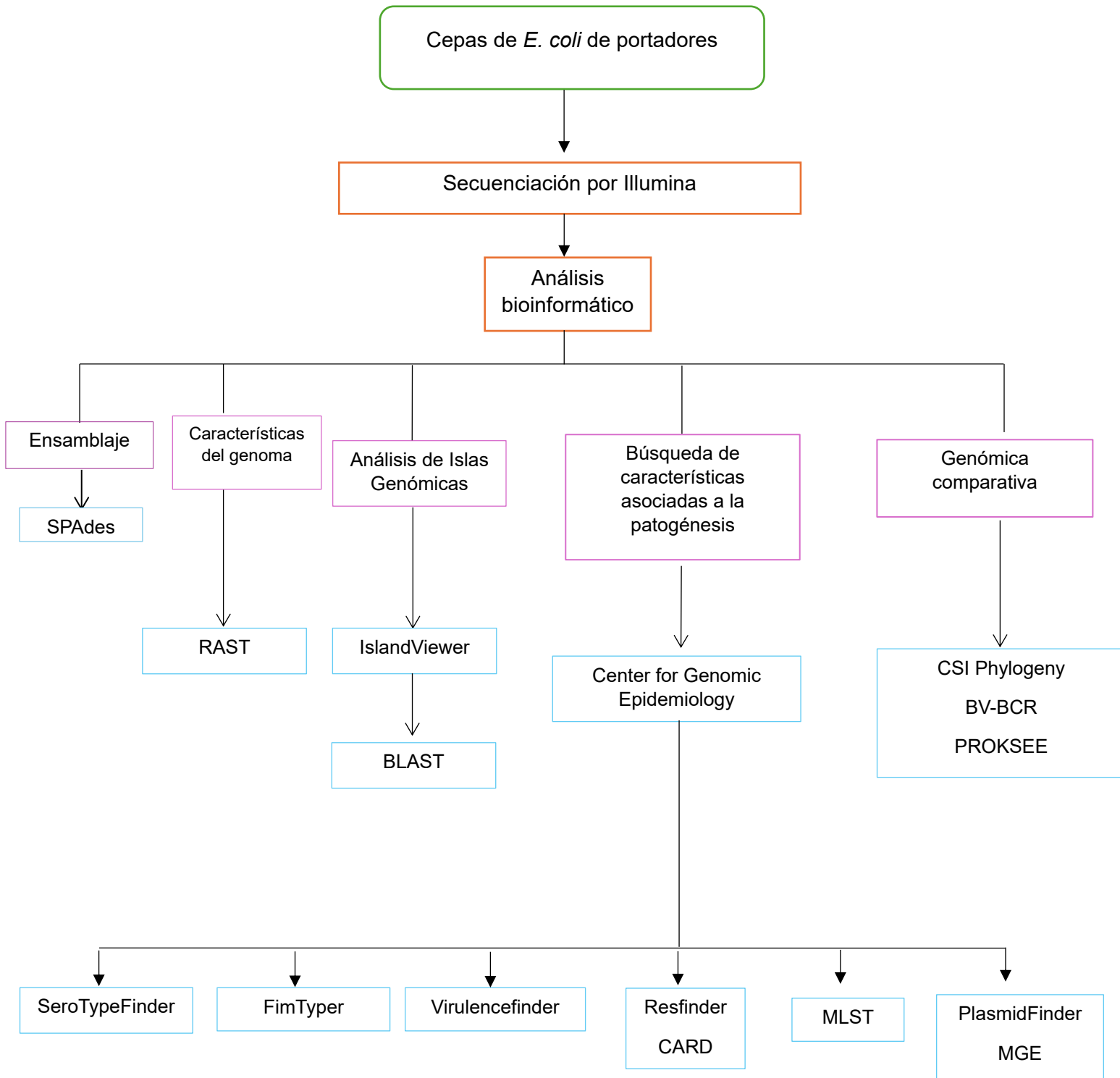
1. Clasificar las cepas de *E. coli* con base en los genes asociados a los patotipos híbridos.
2. Identificar el genotipo de resistencia BLEE y No-BLEE.
3. Selección y secuenciación para análisis genómico y bioinformático en cepas de portadores.
4. Establecer la relación filogenética mediante ERIC-PCR.
5. Determinar el perfil plasmídico.
6. Caracterizar parcialmente los plásmidos.

## 6. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



DMPT: Degenerate Primer MOB Typing (Tipificación MOB con oligonucleótidos Degenerados). SAP: Sistemas de Adición plasmídica.

### 6.1 Esquema de secuenciación



## 7. MATERIAL Y METÓDOS

Se estudiaron 80 cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes orígenes: 40 cepas de heces de portadores humanos y 40 cepas de orina de pacientes con diagnóstico de ITU. Las muestras fueron recolectadas y parcialmente caracterizadas en los proyectos de tesis de Méndez Moreno Evelyn y Ballesteros Monrreal Manuel (Méndez Moreno, 2022, Ballesteros-Monrreal, 2021). Estas cepas se encuentran almacenadas en criopreservación a -70° C.

### 7.1 Material biológico

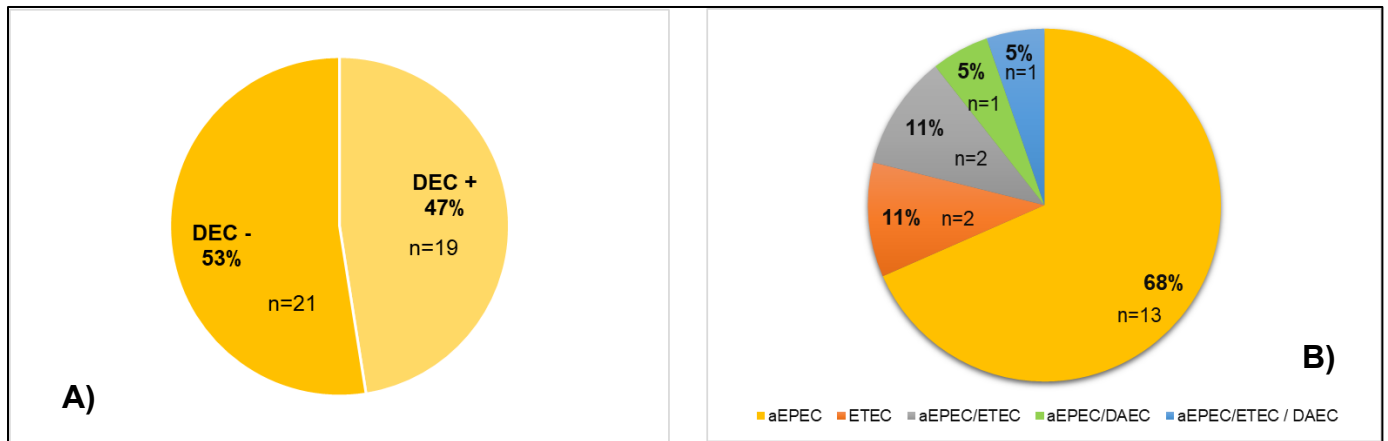
Se trabajó con un cepario previamente caracterizado por Méndez-Moreno *et al.*, 2022 (ver antecedentes), tabla 1. Las muestras de heces se tomaron de aquellos voluntarios (tabla 2) que no presentaban signos y síntomas característicos de una enfermedad por *E. coli*, tales como fiebre, diarrea, dolor abdominal, sensación de plenitud gástrica y flatulencias. En el anexo 1 se muestra el formato que se utilizó. Se seleccionaron las 40 cepas con base en las características de virulencia y resistencia que en el inicio del estudio presentaban, tales como producción de biopelícula, genes asociados a patotipos DEC y genes de resistencia a β-lactámicos. Además, a las 12 cepas que presentaron resistencia a Cefotaxima (CTX) se les amplificó los genes *bla<sub>CTX-M</sub>* (*bla<sub>CTX-M1</sub>* & 8 (grupo 1), *bla<sub>CTX-M2</sub>* y *bla<sub>CTX-M9</sub>*), *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>SHV</sub>*, de los cuales arrojaron la presencia de los genes *bla<sub>CTX-M1</sub>* y *bla<sub>CTX-M2</sub>* (tabla 1).

**Tabla 1.** Características generales del cepario de portadores.

Cepario	Muestra	MDR	Grupo filogenético (n, %)	Presencia de BLEE (n, %)		Biopelícula
				CTX-M1	CTX-M2	
40 cepas aisladas de mujeres (n=27) y hombres (n=13) de 18 a 80 años	Heces	100 %	B2 (17, 42.5%) A (9, 22.5%) F (4, 10%) B1 (3, 7.5%) C (1, 2.5%) Desconocido (6, 15 %)	CTX-M1	(7, 58%)	100%
				CTX-M2	(2, 16%)	

n. número. MDR. Multidrogresistencia. Méndez-Moreno *et al.*, 2022.

En la **figura 9** se muestra el porcentaje de patotipos diarreogénicos en las cepas aisladas de heces de portadores.



**Figura 9. Patotipos DEC en muestras de portadores. A)** Porcentaje de cepas de portadores con características de patotipos diarreogénicos (DEC), 47% (n=19). **B)** De las 19 cepas con características de patotipos DEC, el porcentaje más prevalente fue para aEPEC (68%, n=13) (Méndez-Moreno *et al.*, 2022).

**Tabla 2.** Características de los portadores.

ID cepa	Sexo	Edad (años)
DEC-5.2	Mujer	56
DEC-6.4	Mujer	66
DEC-6.6		
DEC-7	Mujer	60
DEC-9.1	Hombre	60
DEC-9.2		
DEC-9.3		
DEC-9.4		
DEC-10.3	Mujer	64
DEC-12	Mujer	70
DEC-12.1		
DEC-12.2		
DEC-12.3		
DEC-12.4	Mujer	34
DEC-13.4		
DEC-17	Hombre	63
DEC-17.4		
DEC-18.2	Mujer	61
DEC-25	Hombre	60

DEC-25.1		
DEC-25.2		
DEC-25.3		
DEC-27.4	Mujer	60
DEC-31.3	Mujer	55
DEC-35	Mujer	61
DEC-35.1		
DEC-36.1		
DEC-36.3	Mujer	73
DEC-36.4		
DEC-37.1		
DEC-37.2	Hombre	43
DEC-37.4		
DEC-40.3	Mujer	55
DEC-41.3	Mujer	57
DEC-44.2	Mujer	60
DEC-44.5		
DEC-45.2	Mujer	38
DEC-45.5		
DEC-50.1	Mujer	22
DEC-50.2		

Méndez-Moreno *et al.*, 2022.

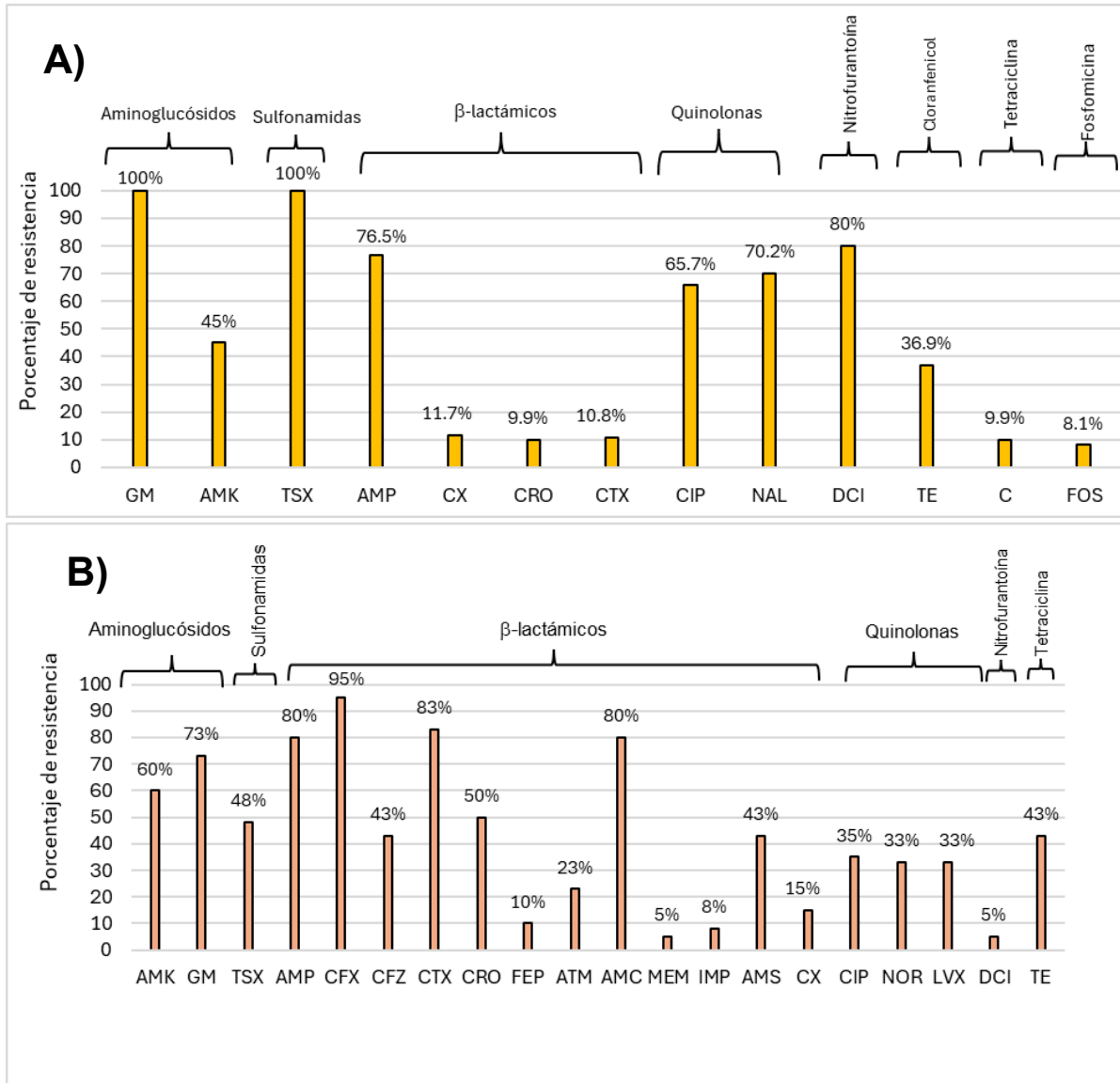
Las 40 cepas restantes del presente estudio fueron previamente caracterizadas por **Ballesteros-Monrreal, 2021**, las cuales fueron aisladas de orina de mujeres que cursaban con una ITU, (**sección antecedentes**), **tabla 3 (anexo 2)**.

**Tabla 3.** Características generales del cepario de origen clínico.

Cepario	Muestra	MDR	Grupo filogenético (n, %)	Biopelícula	Virulencia asociada a UPEC
40 cepas aisladas de mujeres adultas con ITU de 19-80 años.	Orina	100 %	B2 (11, 27.5%) B1 (10, 22.5%) E (6, 15%) C (3, 7.5%) Desconocido (10, 22.5%)	100%	<i>fimH</i> (100%) <i>feoB</i> (97.5%) <i>fliCD</i> (90%) <i>sfaD / focC</i> (72.5%)

Ballesteros-Monrreal *et al.*, 2021. MDR. Multidrogresistencia. **fimH**: Adhesina fimbrial del pili tipo 1; **sfaD/focC**: Proteína fimbrial S subunidad menor/Fimbria F1C; **fliCD**: Flagelina; **feoB**: Transportador de hierro ferroso.

Además, ambos ceparios (portadores y clínicas) presentan el siguiente perfil de susceptibilidad a antibióticos, en la **figura 10** se muestra los resultados obtenidos por **Méndez-Moreno et al., 2022** y **Ballesteros-Monrreal, 2021**.



**Figura 10. Porcentaje de resistencia a antibióticos de las 80 cepas de estudio. Panel A.** cepario de heces de portadores. **Panel B.** cepario de orina de paciente con ITU. MK : amikacina; GM : Gentamicina; CIP : Ciprofloxacina; NOR : norfloxacina; LVX : levofloxacina; TSX : cotrimoxazol; DCI : nitrofurantoina; AMP : ampicilina; CX : cefoxitina; CFX : Cefuroxima; CFZ : ceftazidima; CTX : cefotaxima; CRO : Ceftriaxona; FEP : Cefepima; ATM : aztreonam; AMC : amoxicilina/clavulanato; AMS : Ampicilina/Sulbactam; TE : tetraciclina; MEM : Meropenem; IMP : Imipenem; ETP : Ertapenem (Méndez-Moreno *et al.*, 2022 y Ballesteros-Monrreal, 2021).

**Tabla 4.** Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Características
<b>Cepas de estudio</b>	
<b>40 portadores</b>	Aisladas de heces de voluntarios sanos. 19 de ellas categorizadas como DEC.
<b>40 clínicas</b>	Aisladas de orina de mujeres que cursaban con una ITU, categorizadas como UPEC.
<b>Cepas control para virulencia asociada a UPEC</b>	
<b>CFT073 (UPEC)</b>	Genes <i>iucD</i> , <i>vat</i> , <i>sat</i> , <i>hlyA</i> , <i>papGII</i> , <i>fliC</i> , <i>fimH</i> , <i>fyuA</i> Control de PAIs
<b>0591</b>	Genes <i>sat</i> , <i>vat</i> , <i>papGIII</i>
<b>GAG1</b>	Genes <i>iucD</i> , <i>sat</i> , <i>hlyA</i> , <i>papA</i> , <i>fliC</i> , <i>fimH</i> , <i>cnf</i>
<b>ATCC25922</b> (aislada de un paciente con cistitis)	Búsqueda de PAIs (PAI I <sub>CFT073</sub> y PAI II <sub>CFT073</sub> ) y control en ERIC-PCR
<b>Cepas control para búsqueda de patotipos diarreogénicos</b>	
<b>EHEC EDL933</b>	Cepa tipo <i>E. coli</i> enterohemorrágica. Control positivo para variante toxina Shiga 1 y 2.
<b>ETEC CD79a</b>	Cepa Tipo <i>E. coli</i> enterotoxigénica. Control positivo para Toxina Termoestable (ST).
<b>ETEC LD102b</b>	Cepa Tipo <i>E. coli</i> enterotoxigénica. Control positivo para Toxina Termolábil (LT)
<b>EPEC E2348/69</b>	Cepa Tipo <i>E. coli</i> enteropatógena. Control positivo para <i>bfpA</i>
<b>EAEC042</b>	Cepa Tipo <i>E. coli</i> enteroagregativa. Control positivo para <i>aggR</i> y <i>aaiG</i>
<b>Cepas control para búsqueda de genes BLEE</b>	
<b>DEC-9.2</b>	Control positivo para CTX-M2. Cepa de la colección de portadores.
<b>DEC-9.3</b>	Control positivo para CTX-M1. Cepa de la colección de portadores.
<b>Cepas control para perfil plasmídico</b>	
<b>0581</b>	Control positivo para <i>traT</i> . Cepa de colección aislada de ITU procedente del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. PUEBLA

<b>EDL933 (EHEC)</b>	2 plásmidos: 92 kb y 2.1 kb
<b>EPEC E2348/69</b>	2 plásmidos: 97 kb y 6.1 kb
<b>CR135</b>	Control positivo para MOBQu. Cepa aislada de paciente ambulatorio cursando con ITU (laboratorio clínico particular en la Cd. De Puebla) Cortez de la Puente, 2020.

## 7.2 Extracción de ADN genómico

Se reactivaron las cepas criopreservadas en 3 ml de medio líquido Luria Bertani (LB) y se incubaron en agitación en el equipo Gyromax™ a 37°C, a 220 rpm de 18 a 24 horas (**pre-cultivo**). Posteriormente se inocularon 80 µl del precultivo en 5 ml de medio líquido LB, hasta obtener una DO<sub>260nm</sub> de 0.4 a 0.6, la medición se llevó a cabo mediante espectrofotometría (UV-VIS spectrophotometer 752). Del tubo de precultivo se obtuvieron paquetes celulares de 3 ml para ser usados en la extracción plasmídica y del tubo con DO de 0.4 a 0.5 se obtuvieron paquetes de 500 µl usados para la extracción de ADN genómico llevadas a cabo acorde a los protocolos establecidos en el manual Molecular Cloning (**Green & Sambrook, 2012**).

## 7.3 Condiciones de la mezcla de reacción de PCR's

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante las siguientes condiciones de reacción (**tabla 5**) a menos de que se indique lo contrario, fueron realizadas en el equipo Eppendorf 5331 Mastercycler gradient, posteriormente las muestras se corrieron a gel de agarosa al 1.2%, a 89 volts durante 1 hora y media, para posteriormente ser teñidos con Bromuro de Etidio (Bet) y fotodocumentarse (Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro) para el análisis de los resultados.

**Tabla 5.** Componentes generales de la PCR utilizadas en este estudio.

Componente	Concentración	Volumen	Concentración final
GoTaq® Green Máster Mix Promega	2X	5 µL	1x
Oligonucleótido forward	25 mM	0.3 µL	0.75 mM
Oligonucleótido reverse	25 mM	0.3 µL	0.75 mM
Agua libre de nucleasas	----	3.4 µL	----
ADN templado	----	1.0 µL	----
<b>Volumen final</b>			
<b>10 µL</b>			

**7.4 Amplificación de genes de virulencia asociados a UPEC por PCR**

Se trabajó mediante PCR multiplex diseñadas en el Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos (LBME) para amplificar los genes más frecuentes asociados a virulencia de UPEC (**tabla 6**). El ADN genómico bacteriano extraído se usó como templado, posteriormente se realizó una electroforesis al 1.2 % en gel de agarosa, a 89 volts, durante una hora y media.

**Tabla 6.** Factores de virulencia asociados a UPEC buscados en las PCR’s múltiples.

PCR	Gen	Mecanismo	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Referencia
PCRm1	<i>fimH</i>	Adhesina	210	57.7	Tesis maestría Cortez de la Puente, I., 2020.
	<i>fliC</i>	Adhesina y motilidad	304		
	<i>satA</i>	Daño celular	384		
	<i>iucD</i>	Captación de hierro	512		
PCRm2	<i>lha</i>	Captación de hierro /adhesina	150	61.4	
	<i>vatP</i>	Daño celular	226		
	<i>vatA</i>		230		
	<i>papGIII</i>	Adhesina	421		
	<i>papGII</i>		562		
	<i>papA</i>		641		
PCRm3	<i>satP</i>	Daño celular	880	61.4	

			1280		
	<i>hlyA</i>				
			3100	61.4	
PCR	<i>cnf</i>				
PCR	<i>traT</i>	Evasión de la respuesta inmune	739	58.2	Tesis Vázquez Sánchez, Maricela; 2017
PCR	<i>fyuA</i>	Captación de hierro	937	63	Modificado de Ballesteros-Monrreal <i>et al.</i> , 2021

*iucD*: aerobactina; *satA*: región autotransportadora de la toxina secretada; *fliC*: flagelina; *fimH*: adhesina fimbrial del pili tipo 1, *papGII*: adhesina fimbrial pili P; *papGIII*: adhesina fimbrial pili P; *vata*: región autotransportadora toxina vacuolizante; *vatP*: región peptidasa toxina vacuolizante; *iha*: adhesina homóloga IrgA/sideroforo, *hlyA*: alfa-hemolisina; *satP*: región peptidasa toxina autotransportadora; *papA*: pilina principal del pili P, *cnf*: factor necrotizante citotóxico; *traT*: proteína de resistencia sérica; *fyuA*: Transportador de yersiniabactina.

### 7.5 Determinación de Islas de Patogenicidad (PAIs)

Se realizó la búsqueda de PAIs previamente reportadas en genomas de UPEC, mediante dos PCR multiplex (Sabaté *et al.*, 2006) (tabla 7).

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en la búsqueda de Islas de Patogenicidad.

PCR	PAI <i>E. coli</i>	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm (°C)
PCRm A	PAI III <sub>536</sub>	F: CGGGCATGCATCAATTATCTTTG R: TGTGTAGATGCAGTCACTCCG	200	55
	PAI IV <sub>536</sub>	F: AAGGATTGCTGTTACCGGAC R: TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	300	
	PAI II <sub>CFT073</sub>	F: ATGGATGTTGTATCGCGC R: ACGAGCATGTGGATCTGC	400	
PCRm B	PAI I <sub>536</sub>	F: TAATGCCGGAGATTCATTGTC R: AGGATTTGTCTCAGGGCTTT	2300	55
	PAI II <sub>536</sub>	F: CATGTCCAAAGCTCGAGCC R: CTACGTCAGGCTGGCTTTG	1800	
	PAI I <sub>J96</sub>	F: TCGTGCTCAGGTCCGGAATTT R: TGGCATCCCACATTATCG	1000	

	PAI II <sub>J96</sub>	F:GGATCCATGAAAACATGGTTAATGGG R: GATATTTTTGTTGCCATTGGTTACC	930	55
	PAI I <sub>CFT073</sub>	F: GGACATCCTGTTACAGCGCGCA R: TCGCCACCAATCACAGCGAAC	400	

Las condiciones de las PCR consistieron en 94°C a 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C a 1 minuto, 72°C a 1 minuto y con una extensión final de 72°C a 10 minutos.

### 7.6 Identificación de patotipos DEC

Se realizó mediante 2 PCR multiplex, donde se identificaron los siguientes patotipos diarreogénicos (**tabla 8**).

**Tabla 8.** Descripción de las PCR utilizadas en la búsqueda de patotipos DEC.

PCR	Gen	Patotipo	Tamaño pb	Condiciones	Material genético	Referencia
1	<i>stx1A</i>	EHEC	286	95°C-5min. 1 ciclo <b>95°C 30 seg.</b> <b>59.7 °C 30 seg.</b> <b>72°C 1.1 min.</b> } <b>30 ciclos</b> 72°C 10 min. 1 ciclo 4°C ∞	ADN cromosómico	Vélez-García, 2024 Laboratorio Biología Molecular de Enteropatógenos
	<i>stx2A</i>		1130			
	<i>aaiG</i>	EAEC	808			Días <i>et al.</i> , 2020
2	<i>aggR</i>	EAEC	467	95°C-5min. 1 ciclo <b>95°C 30 seg.</b> <b>47.5 °C 30 seg.</b> <b>72°C 54 seg.</b> } <b>30 ciclos</b> 72°C 10 min. 1 ciclo 4°C ∞	ADN plasmídico	Arenas-Hdz Laboratorio Biología Molecular de Enteropatógenos
	<i>bfpA</i>	EPEC	879			
	<b>ST</b>	ETEC	147			
	<b>LT</b>		322			

**stx1**: variante de la toxina Shiga 1; **stx2**: variante de la toxina Shiga 2; **aaiG**: gen del operón codificador para el T6SS de EAEC; **aggR**: regulador transcripcional de EAEC; **bfpA**: pilus formador de bucles; **ST**: toxina termo estable; **LT**: toxina termo lábil; **EHEC**: *E. coli* enterohemorrágica; **EAEC**: *E. coli* enteroagregativa; **EPEC**: *E. coli* enteropatógena y **ETEC**: *E. coli* enterotoxigénica.

### 7.7 Identificación del genotipo de resistencia

Se realizó la búsqueda de los genes BLEE y NO-BLEE (de resistencia a fluoroquinolonas y aminoglucósidos) (**tabla 9**), siguiendo las condiciones de PCR marcadas en el apartado 7.3.

**Tabla 9.** Oligonucleótidos utilizados en la búsqueda de genes de resistencia.

Gen	Secuencia	Tamaño (pb)	Condiciones	Referencia
<i>aac-(6')-Ib-cr</i>	F:TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R:CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482	94°C 5min. 1 ciclo 94 °C 1 min. } 54°C 1 min. } 30 ciclos 72° 1 min. } 72°C 10 min. 1 ciclo 4°C ∞	Park <i>et al.</i> , 2006
<i>qepA</i>	F: GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG R:CAACTGXTTGAAGCCCGTAG	617	96°C 1min. 1 ciclo 96°C 1 min. } 60°C 1 min. } 30 ciclos 72° 1 min. } 72°C 5min. 1 ciclo 4°C ∞	Yamane <i>et al.</i> , 2007
<i>oqxA</i>	F: CTCGGCGCGATGATGCT R: CCACTCTTCACGGGAGACGA	392	94°C 5min. 1 ciclo 94°C 45 seg. } 45°C 30 seg. } 35 ciclos 72° 1 min. } 72°C 7min. 1 ciclo 4°C ∞	Hong <i>et al.</i> , 2009
<i>oqxB</i>	F:TTCTCCCCCGGCGGGAAGTAC R:CTCGGCCATTTGGCGCGTA	512	94°C 5min. 1 ciclo 94°C 45 seg. } 45°C 30 seg. } 35 ciclos 72° 1 min. } 72°C 7min. 1 ciclo 4°C ∞	
<i>qnrB</i>	F: GATCGTGAAAGCCAGAAAGG R:ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	594	94°C 1min. 1 ciclo 94 °C 45 seg. } 53°C 45 seg. } 32 ciclos 72° 1 min. } 72°C 5min. 1 ciclo 4°C ∞	Wang <i>et al.</i> , 2008
<b>CTXM-1y8</b>	F: TGTGCACYACCAAGTAARGYKATG R: TARRTSACCAAGAAYVAGCGGC	583 pb	94°C-1 min. 1 ciclo 94°C-2 min. } 55°C-40 seg. } 35 ciclos 72°C-1 min. } 72°C-10 min. 1 ciclo 4°C ∞	(Garza-González <i>et al.</i> , 2021)
<b>CTXM-9</b>	F: ATGGTGACAAAGAGAGTGCAA R: AATATCATTGGTGGTGCCGTA G	747 pb	94°C-1 min. 1 ciclo 94°C-2 min. } 55°C-40 seg. } 35 ciclos 72°C-1 min. } 72°C-10 min. 1 ciclo 4°C ∞	
<b>CTXM-15</b>	F: GCGGCCATGATAGGTACG R: AAAGTAAGTCACAATAACCAGCG	786 pb	94°C-1 min. 1 ciclo 94°C-2 min. } 55°C-40 seg. } 35 ciclos 72°C-1 min. } 72°C-10 min. 1 ciclo 4°C ∞	(Garza-González <i>et al.</i> , 2021)
<b>CTXM-2</b>	F: CGATGTGCAGTACCAGTAAGG R: CGATATCGTTGGTGGTGTC	540 pb	94°C-1 min. 1 ciclo 94°C-1 min. } 55°C-1 min. } 35 ciclos 72°C-2 min. } 72°C-1 min. 1 ciclo 4°C ∞	
<i>blaTEM</i>	F: CAACATTTTCGTGTGCGCCC R: GCTTAATCAGTGAGGCACC	844 pb	94°C-1 min. 1 ciclo 94°C-1 min. } 55°C-1 min. } 35 ciclos 72°C-2 min. } 72°C-1 min. 1 ciclo 4°C ∞	(Garza-González <i>et al.</i> , 2021)

La reacción de PCR se llevó a cabo a un volumen final de 10 µL de los cuales contenía 5 µL de GoTaq® Green Máster Mix Promega, 0.3 µL (25 mM) de cada oligonucleótido y 1 µL de ADN genómico.

## 7.8 Secuenciación de cepas de interés

Las 3 cepas de portadores fueron seleccionadas en base a las características mostradas mediante PCR, ya que presentaban factores de virulencia definidores de dos o más patotipos DEC (DEC-25.2 (aEPEC/ETEC), DEC-36.3 (aEPEC/ETEC/DAEC) y DEC-36.4 aEPEC/ETEC)). Se sembraron las 3 cepas en agar MacConkey durante 24 horas a una temperatura de 37 °C. Posteriormente se inoculó una colonia lactosa positiva en 5 ml de caldo LB y se incubó a 37 °C durante la noche. El ADN genómico se obtuvo utilizando el kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega, EE. UU.). Se determinó la pureza del DNA por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% y la concentración usando nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). La secuenciación se realizó en el centro Seqcenter de la ciudad de Pittsburgh, Pensilvania, donde se utilizó un secuenciador Illumina NovaSeq 6000 que produjo lecturas de extremos emparejados de 2×151 pb. Se utilizó FastQC (v0.11.9) para la evaluación de la calidad y Cutadapt (v4.4) para recortar y limpiar las lecturas sin procesar. El ensamblaje se realizó con SPAdes (v3.15.4). Se eliminaron veinticuatro contigs porque tenían menos de 200 pb de longitud (Ortega-Enríquez *et al.*, 2024).

### 7.8.1 Análisis bioinformático y genómica comparativa.

Las anotación de los genomas se analizaron en la plataforma **RAST** (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Aziz *et al.*, 2008). Las Islas Genómicas (IG) de los ensamblajes se determinaron con la herramienta **IslandViewer4** (Bertelli *et al.*, 2017), utilizando tres métodos independientes para la predicción de islas (IslandPick, IslandPath-DIMOB y SIGI-HMM). El genoma de *E. coli* ETEC H10407 se utilizó como cepa de control debido a que es el patotipo en común de los 3 aislados, además de que las características del genoma se encuentran reportadas en bases de datos, lo cual facilita el análisis al momento de comparar con las cepas problema del presente estudio. Después, las Islas Genómicas (IG) predichas se buscaron en **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) para determinar islas genómicas que se hubieran informado previamente. Se utilizó la herramienta en

línea **Proksee** para generar mapas circulares y comparar secuencias mediante la identidad nucleotídica media **Average Nucleotide Identity, ANI (Grant et al., 2023; Jain et al., 2018)**.

Se utilizaron diversos servicios del Centro de Epidemiología Genómica (CGE): **SeroTypeFinder (Joensen et al., 2015)** (para la predicción de serotipos); las variantes de *fimH* se determinaron mediante el cotejo de bases de datos en **FimTyper (Roer, et al., 2017)**. Así como la presencia de genes de resistencia a los antimicrobianos se analizó mediante **ResFinder (Bortolaia et al., 2020; Zankari et al., 2020; Camacho et al., 2009)** y la base de datos **CARD**, utilizando **RGI (Resistance Gene Identifier) (Alcock et al., 2023)**. Los genes de virulencia se buscaron en **VirulenceFinder (Camacho et al., 2009; Joensen et al., 2014; Malberg et al., 2020)**. Los Elementos Genéticos Móviles (EGMs) como los plásmidos y las Secuencias de Inserción (IS) se ejecutaron con el servicio **MGE** del CGE (**Johansson et al., 2021**) y **PlasmidFinder (Camacho et al., 2009; Carattoli et al., 2014)** respectivamente. La tipificación de secuencias de multi locus se completó con **MLST2.0 (Multilocus Sequence Typing) (Camacho et al., 2009; Larsen et al., 2012; Bartual et al., 2005; Griffiths et al., 2010; Lemee et al., 2004; Wirth et al., 2006; Jaureguy et al., 2008)**. Por último, para inferir la relación filogenética, se realizó con los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) con **CSI Phylogeny (v1.4)** utilizando la configuración predeterminada basada en inferir una filogenia basada en la alineación concatenada de los SNP de alta calidad (**Rolf et al., 2014**) y la plataforma iTOL (**Letunic et al., 2021**) para generar las imágenes. Se utilizaron diferentes genomas para inferir la relación filogenética, incluidos algunos pertenecientes a los patotipos DEC, así como ExPEC.

## 7.9 Relación filogenética mediante ERIC-PCR

Para establecer una relación clonal entre las cepas se realizó una ERIC-PCR (Regiones Consenso Intergénicas Repetitivas de las Enterobacterias), utilizando un par de cebadores específicos (**tabla 10**), el material genético utilizado fue ADN genómico. Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa al 1.5% y los

perfiles de bandas fueron capturados en un fotodocumentador (Analytik Jena, USA), posteriormente el patrón de bandeo se analizó con el programa GelJ (**Heras et al., 2015**), obteniéndose un formato Newick que permite representar árboles filogenéticos mediante un formato en texto plano y se establecieron los patrones de similitud entre los perfiles ERIC por el método de apareamiento por media aritmética sin ponderación (UPGMA, por sus siglas en inglés de unweighted pair group method using arithmetic averages) para la construcción de un dendograma usando el programa iTol (**Letunic et al., 2021**).

**Tabla 10.** Oligonucleótidos utilizados en la realización de ERIC-PCR.

Secuencia	Condiciones	Referencia
ERIC-1 F-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC ERIC-2 R- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	95°C 5min. 1 ciclo <b>95 °C 1 min.</b> <b>50°C 1 min.</b> <b>72° 8 min.</b> } <b>40 ciclos</b> 72°C 16 min. 1 ciclo 4°C ∞	Félix-Murray 2018

La reacción de PCR se llevó a cabo a un volumen final de 10 µL de los cuales contenía 5 µL de GoTaq® Green Máster Mix Promega, 0.3 µL (25 mM) de cada oligonucleótido y 1 µL de ADN genómico

### 7.10 Determinación de perfil plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó mediante lisis alcalina (**anexo 3**), basándose en la diferencia de tamaños entre el ADN cromosomal y los plásmidos, debido a que estos últimos al ser más pequeños se facilita su extracción que consiste en alcalinización con NaOH y detergente SDS con el fin de romper membranas y desnaturalizar proteínas y al ADN, posteriormente una neutralización con acetato de amonio para precipitar el ADN cromosomal, después de ciertas centrifugaciones y lavados con etanol, el ADN precipita debido a que es insoluble en este solvente (**Checa Rojas, 2020**). Una vez obtenido el ADN plasmídico se corrieron las muestras en 1% de agarosa y se estimó el número de bandas plasmídicas mediante el uso de cepas controles (ver Tabla 4) y marcadores de pesos moleculares (100 pb y 1 kb Gene Ruler, Thermo Fisher Scientific). En el **anexo 3 (página 114)** se explica a detalle la metodología utilizada.

### 7.11 Caracterización plasmídica

Para caracterizar parcialmente a los plásmidos encontrados en las cepas de estudio se utilizarón diferentes metodologías, que se describen a continuación.

#### 7.11.1 Determinación de gen *traT*

Para determinar los genes de movilidad genética *traT* se realizó PCR individual (**siguiendo lo marcado en el apartado 7.3**) y utilizando como material genético ADN plasmídico y los productos obtenidos fueron separados en geles de agarosa al 1%, a 89 volts durante 1 hora y media (**tabla 11**).

**Tabla 11.** Oligonucleótidos utilizados en la búsqueda de gen *traT*.

Gen	Secuencia	Condiciones	Tamaño (pb)	Referencia
<i>traT</i>	<i>traT</i> -F: TGATGATGGTTGCACTGGTCA <i>traT</i> -R: TCAGATCAGCCTCCTGACGA	95°C a 2 min. 1 ciclo 95°C a 30 seg. } 58.2°C a 1 min. } 30 ciclos 72°C a 45 seg. } 72°C 5 min. 1 ciclo	739	Vázquez Sánchez, Maricela; 2017

La reacción de PCR se llevó a cabo a un volumen final de 10 µL de los cuales contenía 5 µL de GoTaq® Green Máster Mix Promega, 0.5 µL (10 mM) de cada oligonucleótido y 1 µL de ADN plasmídico.

#### 7.11.2 Búsqueda de relaxasas (familia MOB)

Se realizó la búsqueda de las diferentes familias de relaxasas (**tabla 12**) reportadas previamente en la familia *Enterobacteriaceae* (**Alvarado et al., 2012**).

**Tabla 12.** Oligonucleótidos utilizados en la búsqueda de las diferentes familias de relaxasas.

Familia MOB	Secuencia	Tamaño (pb)	Condiciones
<b>MOB-F11</b>	F11-f: GCAGCGTATTACTTCTCTGCTGCCGAYGAYTAYTA F11-r: ACTTTTGGGCGCGGARAABTGSAGRTC	234	94°C 4 min. <b>1c.</b> (94°C 30 sec, 53°C 30 sec, 72°C 30 sec) <b>25c.</b> 72°C 10 min. <b>1c</b> Pausa
<b>MOB-F12</b>	F12-f: AGCGACGGCAATTATTACACCGACAAGGAYAAYTAYTA F12-r: ACTTTTGGGCGCGGARAABTGSAGRTC	234	94°C 4 min <b>1c.</b> (94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec) <b>25c.</b> 72°C 10 min. <b>1c</b> Pausa
<b>MOB-P11</b>	P11-f: CGTGCGAAGGGCGACAARACBTAYCA P11-r: AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTRTCNGTRTC	180	94°C 4 min <b>1c.</b> (94°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec) <b>25c.</b>

			72°C 10 min. <b>1c</b> Pausa
<b>MOB-P12</b>	P12-f: GCACACTATGCAAAAGATGATACTGAYCCYGT P1-r: AGCGATGTGGATGTGAAGTTRTCNGTRTC	189	94°C 4 min <b>1c.</b> (94°C 30 sec, 53.8°C 30 sec, 72°C 30 sec) <b>30c.</b> 72°C 10 min. <b>1c</b> Pausa
<b>MOB-P13</b>	P13-f: AACCCACGCTGCAARGAYCCVGT P1-r: AGCGATGTGGATGTGAAGTTRTCNGTRTC	180	94°C 4 min <b>1c.</b> (94°C 30 sec, 59°C 30 sec, 72°C 30 sec) <b>30c.</b> 72°C 10 min. <b>1c</b> Pausa
<b>MOB-P51</b>	P51-f: TACCACGCCCTATGCGAARAARTAYAC P5-r: CCCTTGTCTGGTGYTSNACCCA	167	94°C 4 min <b>1c.</b> (94°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 30 sec) <b>30c.</b> 72°C 10 min. <b>1c</b> Pausa
<b>MOB-Q11</b>	Q11-f: CAATCGTCCAAGGCGAARGCNGAYTA Q11-r: CGCTCGGAGATCATCAYTGYCAYTG	331	94°C 4 min <b>1c.</b> (94°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 30 sec) <b>30c.</b> 72°C 10 min. <b>1c</b> Pausa
<b>MOB-Q12</b>	Q12-f: CTGGAATACTGAACACGGNAAYATGCC Q12-r: ATCCTTGGTGTAGCACGTTTRAARWAYTG	341	94°C 4 min <b>1c.</b> (94°C 30 sec, 52°C 30 sec, 72°C 30 sec) <b>30c.</b> 72°C 10 min. <b>1c</b> Pausa
<b>MOB-Qu</b>	Qu-f: AGCGCCGTGCTGTCCGCBGCNTAYCG Qu-r: CTCCGCAGCCTCGRCSGCRTTCCA	179	94°C 4 min <b>1c.</b> (94°C 30 sec, 64°C 30 sec, 72°C 30 sec) <b>30c.</b> 72°C 10 min. <b>1c</b> Pausa
<b>MOB-H121</b>	H121-f: GCCAGCTTCCGAATCACAYCAYCAYCG H121-r: GTCGCTTGTGCGGCCACCGDATRAARTA	313	94°C 4 min <b>1c</b> (94°C 30 sec, 59°C 30 sec, 72°C 30 sec) <b>25c</b> 72°C 10 min. <b>1c</b> Pausa

La reacción de PCR se llevó a cabo a un volumen final de 10 µL de los cuales contenía 5 µL de GoTaq® Green Máster Mix Promega, 0.5 µL (10 mM) de cada oligonucleótido y 1 µL de ADN plasmídico.

### 7.11.3 Identificación de Sistemas de Adicción Plasmídicos (SAP)

Del mismo modo se realizó la búsqueda de los SAP principalmente reportados en *E. coli* mediante dos PCR multiplex y 4 PCR simples (tabla 13) (Mnif et al., 2010).

**Tabla 13.** Características de los iniciadores y condiciones de PCR, usados para la determinación de SAP.

Reacción	SAP	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm (°C)
1	<i>pemKI</i>	PemK-up: AACGAGAATGGCTGGATGC PemK-low: CCAACGACACCGCAAAGC	232	94°C 4 min. 1 ciclo 94 °C 30 seg. } 54 °C 30 seg. } 35 ciclos 72 °C 30 seg. } 72 °C 7 min. 1 ciclo 4°C ∞
	<i>hok-sok</i>	Hok-up: AGATAGCCCCGTAGTAAGTT Sok-low: GATTTTCGTGTCAGATAAGTG	203	
2	<i>ccdAB</i>	CcdA-up: AGGAAGGGATGGCTGAGGT CcdB-low: GGTAAAGTTCACGGGAGAC	230	94°C 4 min. 1 ciclo 94 °C 30 seg. } 54 °C 30 seg. } 35 ciclos 72 °C 30 seg. } 72 °C 7 min. 1 ciclo 4°C ∞
	<i>srnBC</i>	SrnB-up: ACTGATTGTAGCCTCTTCTTT SrnC-low: CACCCTGTATTTCCCCTGT	171	
3	<i>relBE</i>	RelE-up: AAAAACCCGATGGCGACAG RelE-low: TGATAGACCAGGCGAAAAC	370	94°C 4 min. 1 ciclo 94 °C 30 seg. } 57 °C 30 seg. } 35 ciclos 72 °C 30 seg. } 72 °C 7 min. 1 ciclo 4°C ∞
4	<i>parDE</i>	ParD-up: ACGGACCAGCAGCACCAG ParE-low: AGCCCTTGAGCCTGTCGG	534	94°C 4 min. 1 ciclo 94 °C 30 seg. } 58 °C 30 seg. } 30 ciclos 72 °C 45 seg. } 72 °C 7 min. 1 ciclo 4°C ∞

<p><b>5</b></p>	<p><b><i>pndAC</i></b></p>	<p>PndC-up: TCAATCAACCAGGGCTCT PndA-low: CCTCACCATCCAGACAAAA</p>	<p><b>140</b></p>	<p>94°C 4 min. 1 ciclo  <b>94 °C 30 seg.</b>  <b>52 °C 30 seg.</b>  <b>72 °C 20 seg.</b> } <b>35 ciclos</b>                  72 °C 7 min. 1 ciclo                  4°C ∞</p>
<p><b>6</b></p>	<p><b><i>vagCD</i></b></p>	<p>VagC-up: GGGACCTGGATTTTGATGG VagD-low: GAGCAGATGTTGGTGTGG</p>	<p><b>210</b></p>	<p>94°C 4 min. 1 ciclo  <b>94 °C 30 seg.</b>  <b>53 °C 30 seg.</b>  <b>72 °C 30 seg.</b> } <b>35 ciclos</b>                  72 °C 7 min. 1 ciclo                  4°C ∞</p>

La reacción de PCR se llevó a cabo a un volumen final de 10 µL de los cuales contenía 5 µL de GoTaq® Green Máster Mix Promega, 0.3 µL (25 mM) de cada oligonucleótido y 1 µL de ADN plasmídico.

## 8. RESULTADOS

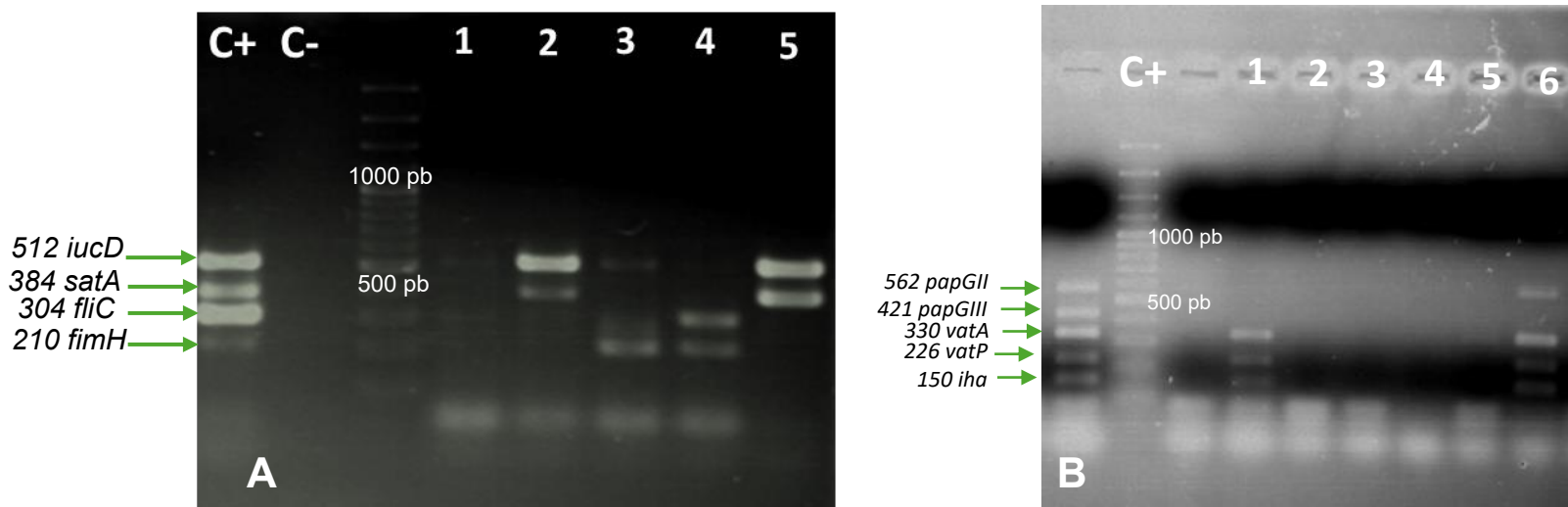
### 8.1 Población estudiada

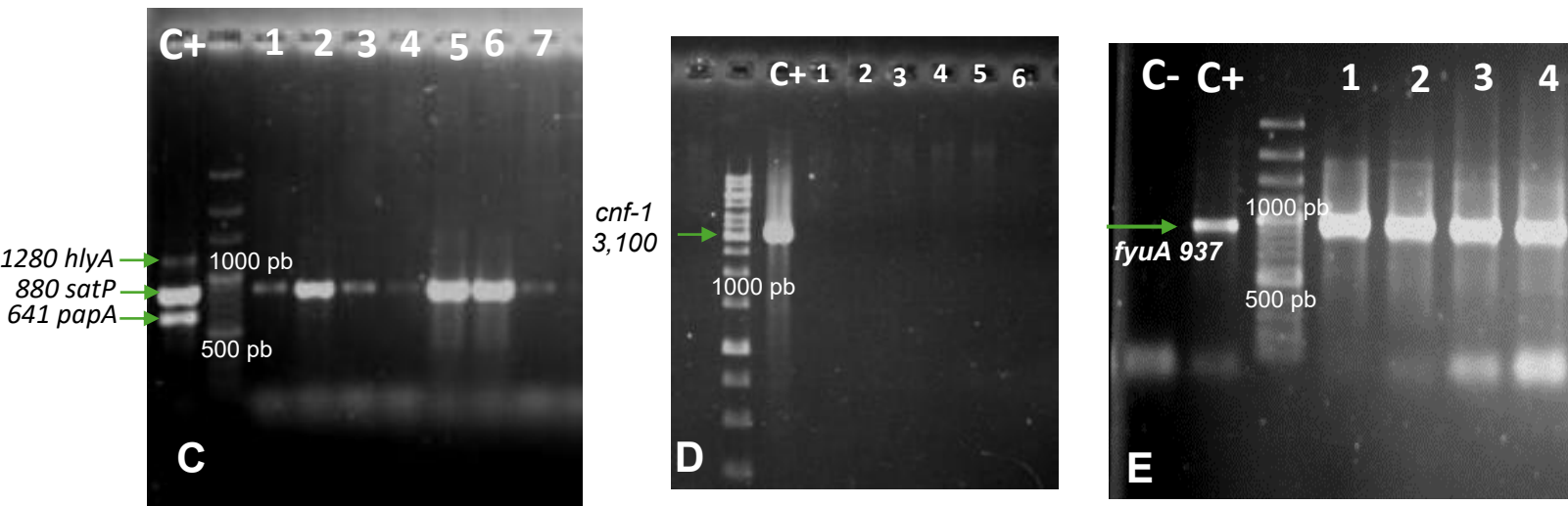
Se estudiaron 80 cepas de *E. coli* aisladas en Sonora, México obtenidas durante el periodo de 2020-2021 40 cepas de portadores y 40 cepas de muestras clínicas (ver sección de materiales y métodos).

### 8.2 Determinación de patotipos híbridos patógenos

Con el fin de clasificar a las cepas de *E. coli* aisladas de portadores y clínicas con base en su patotipo híbrido patógeno, se seleccionaron 59 cepas de las 80 para la búsqueda de patotipos híbridos. 19 de ellas fueron cepas de portadores que poseen características de patotipos DEC y el resto las 40 cepas clínicas con características de patotipo extraintestinal (UPEC).

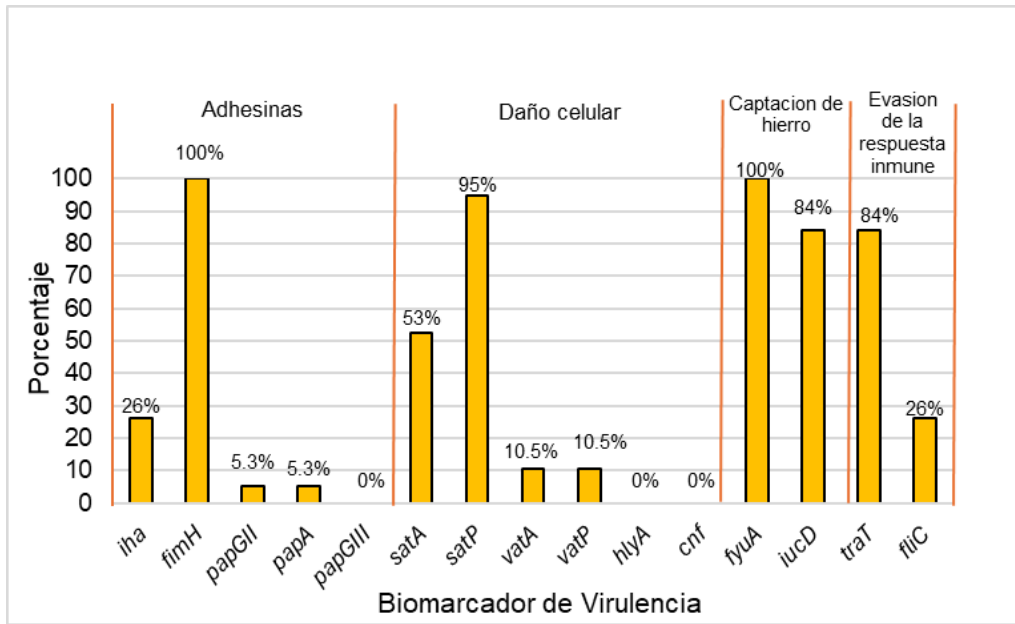
La búsqueda de los genes de virulencia asociados a UPEC, como aquellos implicados en la captación de hierro (*fyuA*, *iucD* e *iha*). Asociados al daño celular (*satAP*, *vatAP*, *cnf-1* y *hlyA*). Evasión de la respuesta inmune (*fliC* y *traT*) y genes asociados a adhesinas (*fimH*, *papA*, *papGII*, *papGIII* e *iha*) se realizó en 19 cepas aisladas de portadores mediante PCR multiplex y simple, donde los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.2% para observar el perfil de bandeo (Fig. 11).



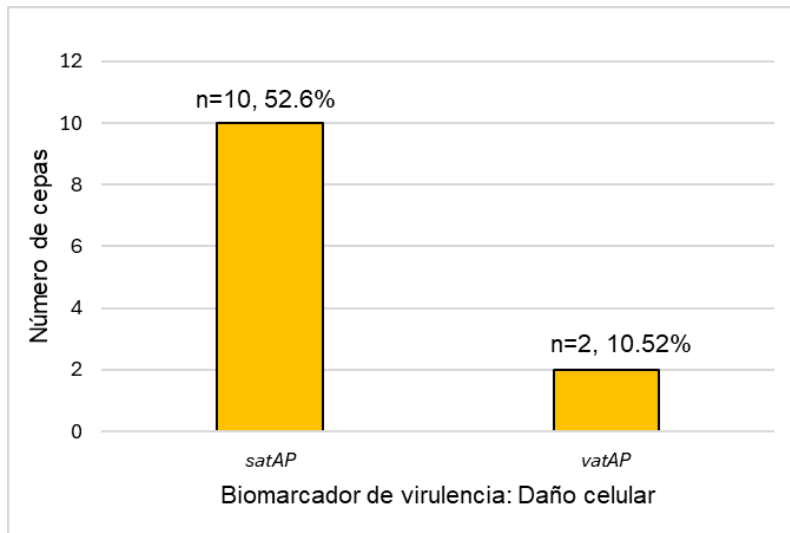


**Figura 11. Determinación de genes de virulencia asociados a UPEC.** Gel representativo al 1.2% de agarosa. **A) PCRM1:** Carriles: **1:** cepa DEC9.3; **2:** cepa DEC17; **3:** cepa DEC17.4; **4:** cepa DEC18.2; **5:** cepa DEC25.3. **B) PCRM2:** Carriles: **1:** cepa DEC9.3; **2:** cepa DEC17; **3:** cepa DEC17.4; **4:** cepa DEC18.2; **5:** cepa DEC25.1; **6:** cepa DEC25.2. **C) PCRM3:** Carriles: **1:** cepa DEC9.3; **2:** cepa DEC17; **3:** cepa DEC17.4; **4:** cepa DEC18.2; **5:** cepa DEC25.2; **6:** cepa DEC25.3; **7:** cepa DEC27.4. **D) *cnf-1*:** Carriles: cepa DEC9.3; **2:** cepa DEC17; **3:** cepa DEC17.4; **4:** cepa DEC18.2; **5:** cepa DEC25.2; **6:** cepa DEC25.3. **E)** Búsqueda de gen *fyuA*. Carriles: **1 cepa:** DEC9.3; **2 cepa:** DEC17; **3 cepa:** DEC17.4; **4 cepa:** DEC18.2. C+. Control positivo usado DNA de la cepa CFT073. PM: Marcador de Peso Molecular GeneRuler TM 100 pb y 1Kb Plus DNA Ladder.

Los genes más prevalentes asociados a una infección por UPEC fueron las adhesinas *fimH* (100%), los sistemas de captación de hierro, yersiniabactina (*fyuA* 100%) y aerobactina (*iucD*, 84%), así como genes implicados en la evasión de la respuesta inmune (*traT*, 84%) y genes implicados al daño celular como el componente de la toxina secretada por autotransportador (*satP* región peptidasa toxina autotransportadora, 95%) (**Fig. 12**). En la **figura 13**, se muestra la prevalencia de aquellas cepas que dieron positivas a los genes completos, es decir, 10 cepas de las 19 que se evaluaron obtuvieron ambas regiones de la toxina secretada por autotransportador (*sat*), la región de la peptidasa (*satP*) y la autotransportadora (*satA*). En cambio, de la toxina *vat* (vacuolizante), solo en 2 cepas de las 19 se observaron las dos regiones de la toxina *vatAP*.



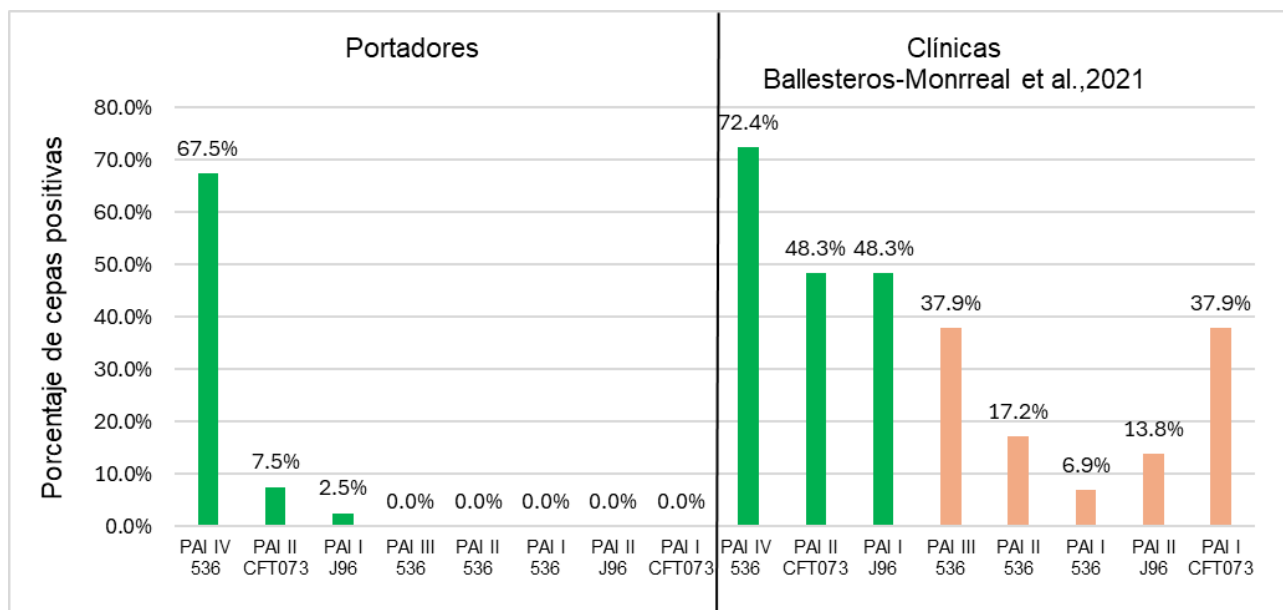
**Figura 12. Gráfica con la prevalencia de genes asociados a UPEC en 19 cepas de portadores.** *iucD*: aerobactina; *satA*: región autotransportadora de la toxina secretada; *fliC*: flagelina; *fimH*: adhesina fimbrial del pili tipo 1, *papGII*: adhesina fimbrial pili P; *papGIII*: adhesina fimbrial pili P; *vata*: región autotransportadora toxina vacuolizante; *vatP*: región peptidasa toxina vacuolizante; *iha*: adhesina homologa IrgA/sideroforo, *hlyA*: alfa-hemolisina; *satP*: región peptidasa toxina autotransportadora; *papA*: pilina principal del pili P, *cnf*: factor necrotizante citotóxico; *traT*: proteína de resistencia sérica; *fyuA*: Transportador de yersiniabactina.



**Figura 13. Gráfica con la prevalencia del set completo de genes asociados a UPEC en 19 cepas de portadores.** *satAP*: Toxina secretada por autotransportador; *vatAP*: toxina vacuolizante.

Como se ha mencionado con anterioridad las PAI albergan genes de virulencia y ayudan a inferir el potencial patógeno que una cepa puede llegar a presentar, por ello con el fin de obtener más características acerca de la clasificación de las cepas aisladas de portadores se realizó la búsqueda de Islas de Patogenicidad que han sido ya previamente reportadas en genomas de *E. coli* uropatógena. Obteniéndose que, de las 40 cepas estudiadas de portadores, 27 (67.5%) albergaban al menos una PAI, dentro de las cuales se detectaron tres: PAI IV<sub>536</sub>, PAI II<sub>CFT073</sub> y PAI I<sub>J96</sub>. Se observo una mayor detección de la PAI IV<sub>536</sub> (67.5%, n=27), seguida de PAI II<sub>CFT073</sub> (7.5%, n=3) y PAI I<sub>J96</sub> (2.5%, n=1). Así mismo, se detectaron cepas con más de una PAI, 3 cepas presentaron PAI IV<sub>536</sub> y PAI II<sub>CFT073</sub> (DEC 6.4, DEC 12.3 y DEC 13.4) y 1 cepa presento PAI IV<sub>536</sub>, PAI II<sub>CFT073</sub> y PAI I<sub>J96</sub> (DEC 13.4).

En la **figura 14** se hace una comparación con lo obtenido en el presente estudio caracterizando a las cepas de portadores y lo obtenido en las cepas clínicas previamente caracterizadas por Ballesteros-Monrreal, en el 2021.



**Figura 14. Prevalencia de PAIs en las cepas de estudio.** En color verde se muestran las PAIs encontradas en ambos ceparios: PAI IV<sub>536</sub>, PAI II<sub>CFT073</sub> y PAI I<sub>J96</sub> y en color rosa solo aquellos que se encontraron en las cepas clínicas (UPEC) caracterizadas por Ballesteros-Monrreal *et al.*, 2021.

En la **tabla 14** se muestran las características de las cepas de portadores a las cuales en este estudio se les detectaron genes de virulencia de UPEC por lo que se clasifican como patotipo patógeno-híbrido. Los genes más prevalentes asociados a una infección por UPEC fueron las adhesinas *fimH* (100%), los sistemas de captación de hierro, yersiniabactina (*fyuA* 100%) y aerobactina (*iucD*, 84%), así como genes implicados en la evasión de la respuesta inmune (*traT*, 84%) y genes implicados al daño celular como la toxina secretada por autotransportador (*satP*, 95%). Se consideran híbridas aquellas cepas que dieron positivas al menos a 1 gen de virulencia de cada categoría (adhesina, captación de hierro, daño celular y evasión inmune).

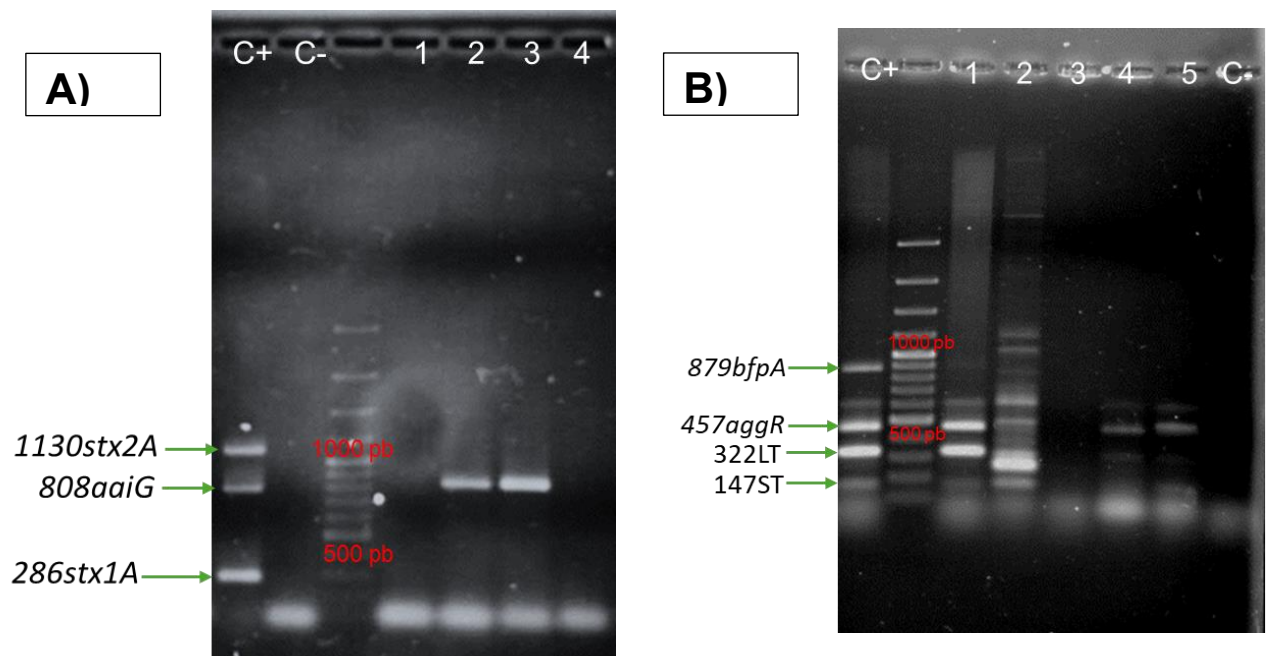
**Tabla 14.** Características de 19 cepas de *E. coli* aisladas de portadores (previamente DEC) que son patotipo patógeno-híbrido.

Cepa	Origen		Grupo filogenético	Patotipo DEC* (gen)	Genes de virulencia de UPEC (este estudio)				PAIs (este estudio)	Patotipo patógenos-híbridos
	Edad	Sexo			Adhesina	Captación de hierro	Daño celular	Evasión inmune		
9.3	60	H	A	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> )	<i>fimH</i>	<i>iucD</i> <i>fyuA</i>	<i>satAP</i>	-	PAI IV 536	X
17	63 H			aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> )	<i>fimH</i> , <i>iha</i>	<i>iucD</i> <i>fyuA</i> <i>iha</i>	<i>satAP</i> , <i>vatAP</i>	<i>traT</i>	PAI IV 536	aEPEC / UPEC
17.4			B2	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> )	<i>fimH</i>	<i>iucD</i> <i>fyuA</i>	<i>satP</i>	<i>traT</i>	PAI IV 536	X
18.2	61	M	B2	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> )	<i>fimH</i>	<i>iucD</i> <i>fyuA</i>	<i>satP</i>	<i>traT</i> , <i>fliC</i>	-	X
25.2	60 H		A	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> ) /ETEC (toxina LT)	<i>fimH</i> , <i>papA</i> , <i>iha</i>	<i>iucD</i> <i>fyuA</i> <i>iha</i>	<i>satAP</i> , <i>vatAP</i>	<i>traT</i>	PAI IV 536	aEPEC / ETEC / UPEC
25.3			B2	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> )	<i>fimH</i> , <i>papGII</i> <i>iha</i>	<i>iucD</i> <i>fyuA</i> <i>iha</i>	<i>satAP</i>	<i>traT</i>	PAI IV 536	aEPEC / UPEC
27.4	60	M	A	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> )	<i>fimH</i>	<i>iucD</i> <i>fyuA</i>	<i>satP</i>	<i>traT</i> , <i>fliC</i>	-	X

31.3	55	M	A	ETEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> )	<i>fimH</i>	<i>iucD</i> <i>fyuA</i>	<i>satP</i>	<i>traT</i>	PAI IV 536	X
35	61 M		B2	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> )	<i>fimH</i>	<i>iucD</i> <i>fyuA</i>	<i>satAP</i>	<i>traT</i>	PAI IV 536	aEPEC/UPEC
35.1			X	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> )	<i>fimH</i> ,	<i>iucD</i> <i>fyuA</i>	<i>satAP</i>	<i>traT</i>	PAI IV 536	aEPEC/UPEC
36.1	73 M		B2	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> ) /DAEC (adhesina <i>daaE</i> )	<i>fimH</i> , <i>iha</i>	<i>iucD</i> <i>fyuA</i> <i>iha</i>	<i>satP</i>	<i>traT</i>	PAI IV 536	aEPEC/DAEC/ UPEC
36.3			B2	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> ) /ETEC (toxina LT) / DAEC (adhesina <i>daaE</i> )	<i>fimH</i> , <i>iha</i>	<i>iucD</i> <i>fyuA</i> <i>iha</i>		<i>traT</i>	PAI IV 536	X
36.4			B2	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> ) /ETEC (toxina LT)	<i>fimH</i> , <i>iha</i>	<i>iucD</i> <i>fyuA</i> <i>iha</i>	<i>satP</i>	<i>traT</i>	PAI IV 536	X
37.1	43 H		F	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> )	<i>fimH</i>	<i>iucD</i> <i>fyuA</i>	<i>satAP</i>	<i>traT</i> , <i>fliC</i>	-	aEPEC/UPEC
37.2			B2	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> )	<i>fimH</i>	<i>iucD</i> <i>fyuA</i>	<i>satAP</i>	<i>traT</i> , <i>fliC</i>	PAI IV 536	aEPEC/UPEC
37.4			F	ETEC (toxina LT)	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>satAP</i>	<i>traT</i> , <i>fliC</i>	-	ETEC/UPEC
40.3	55	M	F	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> )	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>satP</i>	-	PAI IV 536	X
41.3	57	M	B1	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> )	<i>fimH</i>	<i>iucD</i> <i>fyuA</i>	<i>satAP</i>	-	PAI IV 536	X
44.2	40	M	B1	aEPEC ( <i>eae</i> , ausencia de <i>bfpA</i> )	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>satP</i>	<i>traT</i>	PAI IV 536	X

\*Méndez-Moreno *et al.*, 2022. **En color sombreado verde se muestran los patotipos patógenos-híbridos propuestos.** H: Hombre; M: Mujer. *iucD*: aerobactina; *satA*: región autotransportadora de la toxina secretada; *fliC*: flagelina; *fimH*: adhesina fimbrial del pili tipo 1; *papA*: pilina principal del pili P; *papGII*: adhesina fimbrial pili P; *vatA*: región autotransportadora toxina vacuolizante; *vatP*: región peptidasa toxina vacuolizante; *iha*: adhesina homóloga IrgA/sideróforo; *satP*: región peptidasa toxina autotransportadora; *fyuA*: Yersiniabactina; **aEPEC**: *E. coli* enteropatógena atípica; **ETEC**: *E. coli* enterotoxigénica; **DAEC**: *E. coli* adherente difusa; **UPEC**: *E. coli* uropatógena; **eae**: íntima; **bfpA**: pilus formador de mechones; **LT**: toxina termolábil; **daaE**: adhesina daaE; **PAI**. Isla de patogenicidad.

Por otra parte, a las 40 cepas UPEC aisladas de orina se les realizó la búsqueda de determinantes diarreogénicos específicos para cada patotipo: EAEC (*aggR* y *aaiG*), ETEC (toxinas LT y ST), EPEC (*bfpA*) y EHEC (toxinas *stx1* y *stx2*) (**figura 15**). En 14 de ellas (35%) se detectaron dichos genes por lo que se clasificaron como patotipos híbridos, los predominantes fueron UPEC/EAEC (42%, n=6/14) y UPEC/EAEC/ETEC (35%, n=5/14), seguido de 1 cepa positiva a UPEC/aEAEC/EPEC (7%), UPEC/ETEC (7%, n=1/14) y 1 cepa a UPEC / aEAEC (7%) (**tabla 15**).



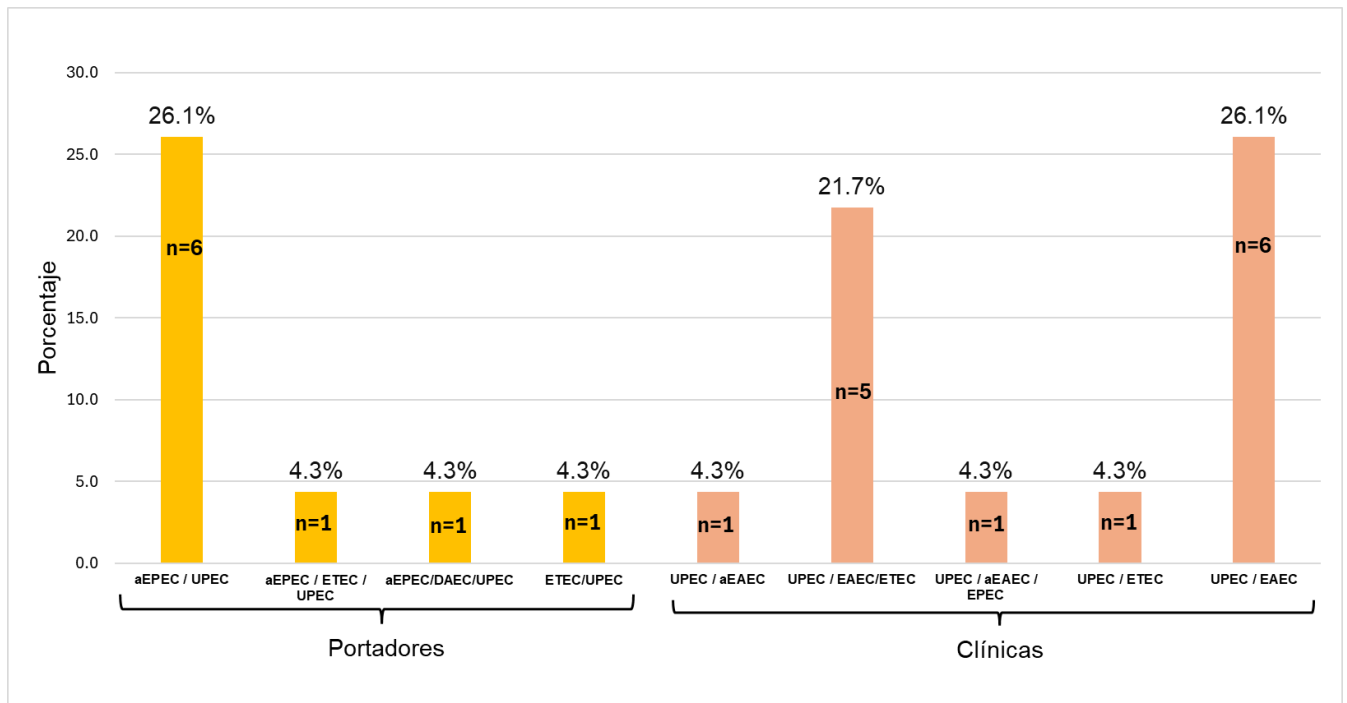
**Figura 15. Determinación de genes de virulencia asociados a patotipos DEC en cepas clínicas (UPEC).** Gel representativo al 1.2% de agarosa. **A) PCR de genes DEC cromosómicos:** Carriles: 1: cepa UPEC-2; 2: UPEC-3; 3: UPEC-4; 4: cepa UPEC-5 **B) PCR de genes DEC plasmídicos:** Carriles: 1: cepa UPEC-40; 2: cepa UPEC-1; 3: cepa UPEC-2; 4: cepa UPEC-3; 5: cepa UPEC-4. **C+.** Control positivo usando DNA de las cepas EDL933 (EHEC: *E. coli* enterohemorrágica); EAEC042 (*E. coli* enteroagregativa); EPECE2348/69 (*E. coli* enteropatógena); ETECLD102b y ETECCD79a (*E. coli* enterotoxigénica). PM: Marcador de Peso Molecular GeneRuler™ 100 pb.

**Tabla 15.** Características de 13 cepas de *E. coli* de origen clínico previamente reportadas como UPEC que son patotipos patógenos-híbridos.

Cepa	Grupo filogenético*	PAI	Factores de virulencia asociados a UPEC*				Genes de virulencia asociados a DEC	Patotipo patógeno-híbrido
			Adhesinas	Captación de hierro	Daño celular	Evasión inmune		
UPEC-1	B2	PAI II 536 - PAI IV 536, PAI I CFT073 y PAI II CFT073	<i>fimH</i> , <i>papGII</i> , <i>iha</i>	<i>lha</i> , <i>iroN</i> , <i>fyuA</i> , <i>feoB</i>	<i>sat</i> , <i>hlyA</i>	<i>traT</i>	ST, LT, <i>aggR</i>	UPEC/ETEC/EAEC
UPEC-3	C	X	<i>fimH</i> , <i>papGII</i> , <i>iha</i>	<i>iroN</i> , <i>iucD</i> , <i>fyuA</i> , <i>feoB</i> , <i>iha</i>	<i>sat</i> , <i>vat</i> , <i>agn43</i>	<i>traT</i> , <i>fliCD</i>	LT, <i>aaiG</i> , <i>aggR</i>	UPEC/ETEC/EAEC
UPEC-4	C	PAI III 536, PAI IV 536, PAI I J96	<i>fimH</i> , <i>papGII</i> , <i>iha</i>	<i>iroN</i> , <i>fyuA</i> , <i>feoB</i> , <i>iha</i>	<i>sat</i> , <i>vat</i> , <i>agn43</i>	<i>traT</i> , <i>fliCD</i>	LT, <i>aaiG</i> , <i>aggR</i>	UPEC/ETEC/EAEC
UPEC-15	E	PAI II 536	<i>fimH</i> , <i>iha</i>	<i>iucD</i> , <i>feoB</i> , <i>iha</i>	<i>cnf-1</i> , <i>agn43</i>	<i>traT</i> , <i>fliCD</i>	<i>aggR</i>	UPEC/EAEC
UPEC-17	X	X	<i>fimH</i> , <i>papGII</i> , <i>iha</i>	<i>iucD</i> , <i>fyuA</i> , <i>feoB</i> , <i>iha</i>	<i>hlyA</i>	<i>fliCD</i>	LT	UPEC/ETEC
UPEC-19	X	PAI I J96, PAI I CFT073	<i>fimH</i>	<i>iroN</i> , <i>iucD</i> , <i>fyuA</i> , <i>feoB</i>	<i>sat</i>	<i>fliCD</i>	<i>aaiG</i>	UPEC/aEAEC
UPEC-20	X	PAI III 536, PAI II CFT073	<i>fimH</i> , <i>papGII</i>	<i>feoB</i>	<i>hlyA</i>	<i>traT</i> , <i>fliCD</i>	<i>aaiG</i> , <i>bfpA</i>	UPEC/EPEC
UPEC-22	X	PAI IV 536, PAI I J96, PAI II CFT073	<i>fimH</i>	<i>iroN</i> , <i>fyuA</i> , <i>feoB</i>	<i>sat</i>		LT, <i>aaiG</i> , <i>aggR</i>	UPEC/ETEC/EAEC
UPEC-27	E	PAI III 536, PAI IV 536, PAI I J96, PAI I CFT073, PAI II CFT073	<i>fimH</i>	<i>iroN</i> , <i>iucD</i> , <i>fyuA</i> , <i>feoB</i>	<i>sat</i>	<i>fliCD</i>	<i>aggR</i>	UPEC/EAEC
UPEC-32	B1	X	<i>fimH</i>	<i>iroN</i> , <i>iucD</i> , <i>feoB</i>		<i>fliCD</i>	<i>aggR</i>	UPEC/EAEC
UPEC-33	B1	X	<i>fimH</i>	<i>iroN</i> , <i>iucD</i> , <i>fyuA</i> , <i>feoB</i>		<i>fliCD</i>	<i>aggR</i>	UPEC/EAEC
UPEC-37	B2	PAI I CFT073	<i>fimH</i> , <i>iha</i>	<i>iroN</i> , <i>iucD</i> , <i>fyuA</i> , <i>iha</i> , <i>feoB</i>	<i>sat</i> , <i>hlyA</i> , <i>vat</i>	<i>fliCD</i> , <i>kpsM</i>	<i>aggR</i>	UPEC/EAEC
UPEC-39	B2	PAI IV 536, PAI II CFT073	<i>fimH</i> , <i>iha</i>	<i>iucD</i> , <i>fyuA</i> , <i>iha</i> , <i>feoB</i>	<i>sat</i> , <i>vat</i> , <i>hlyA</i>	<i>fliCD</i> , <i>kpsM</i>	<i>aggR</i>	UPEC/EAEC
UPEC-40	B2	PAI II 536, PAI IV 536, PAI II CFT073	<i>fimH</i> , <i>iha</i>	<i>iucD</i> , <i>fyuA</i> , <i>iha</i> , <i>feoB</i>	<i>cnf-1</i>	<i>fliCD</i>	LT, <i>aggR</i>	UPEC / EAEC / ETEC

\*Ballesteros-Monreal 2021. **fimH** : adhesina fimbrial de pilus tipo 1; **papG-II** : tipo P pilus Adhesina alelo 2; **fliCD** : subunidad de flagelina/casquete flagelar; **hlyA** : α-hemolisina; **sat** : Toxina secretada por autotransportador; **vat** : Toxina autotransportadora vacuolizante; **cnf-1** : factor citotóxico necrotizante; **kpsM** : variante capsular; **traT** : proteína de resistencia sérica; **agn43** : antígeno 43; **iroN**: receptor de sideróforo de salmouelina; **iucD** : Aerobactina; **fyuA** : yersiniabactina; **iha** : receptor de enterobactina bifuncional/proteína adhesina; **feoB** : Proteína B transportadora de hierro ferroso; **bfpA**: Pilus formador de mechones; LT: Enterotoxina termolábil; **aaiG**: gen del operón codificador para el T6SS de EAEC; **aggR**: regulador transcripcional de EAEC; ST: toxina termo estable; **aEPEC**: *E. coli* enteropatógena atípica; **ETEC**: *E. coli* enterotoxigénica; **UPEC**: *E. coli* uropatógena.

Con estos resultados podemos observar que de 59 cepas de *E. coli* seleccionadas para la búsqueda de patotipos híbridos, el 38.9% (n=23/59), son patotipos patógenos-híbridos, donde se obtuvo en mayor porcentaje los patotipos aEPEC/UPEC (aisladas de portadores n=6) y UPEC/EAEC (aisladas de muestras clínicas n=6). En la **figura 16** se muestra la distribución de los patotipos híbridos en el total del cepario de diferentes orígenes del presente estudio.

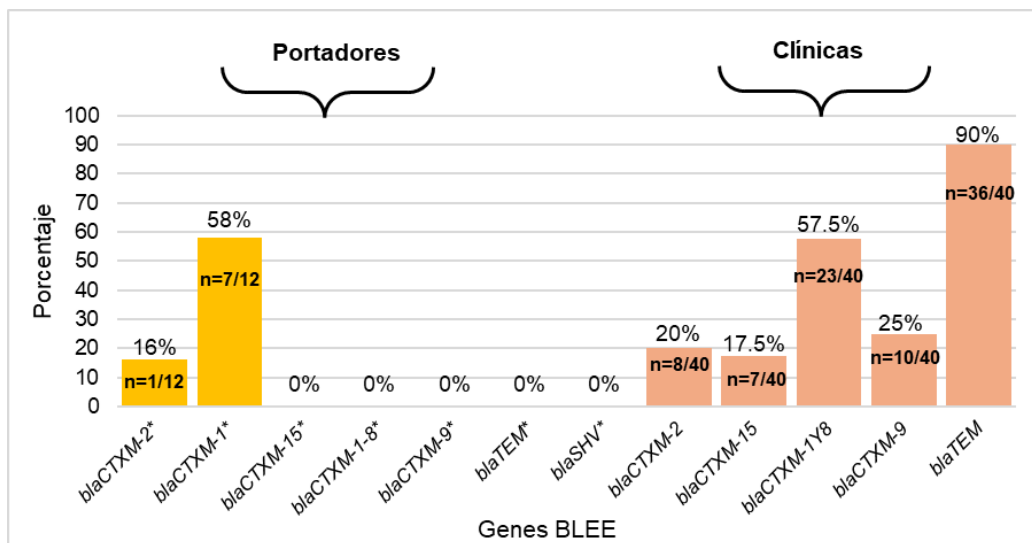


**Figura 16.** Patotipos patógenos-híbridos encontrados en las cepas de estudio.

### 8.3 Determinación de resistotipo

Se realizó la búsqueda de 5 genes asociados a resistencia de antibióticos β-lactámicos mediante PCR simplex y duplex utilizando como material genético ADN genómico (TEM, CTX-M1y8, CTX-M2, CTX-M9 y CTX-M15). Para las 40 cepas de *E. coli* de origen clínico los genes BLEE prevalentes fueron *bla*<sub>TEM</sub> (90%), seguido de *bla*<sub>CTX-M1y8</sub> (57.5%) y *bla*<sub>CTX-M9</sub> (25%). En antecedentes se mencionó que a 12 cepas de *E. coli* aisladas de heces de portadores resistente a cefotaxima (CTX) se les determinó los genes BLEE (SVH, TEM, CTX-M1y8, CTX-M2, CTX-M9 y CTX-M15) (Méndez-Moreno *et al.*, 2022).

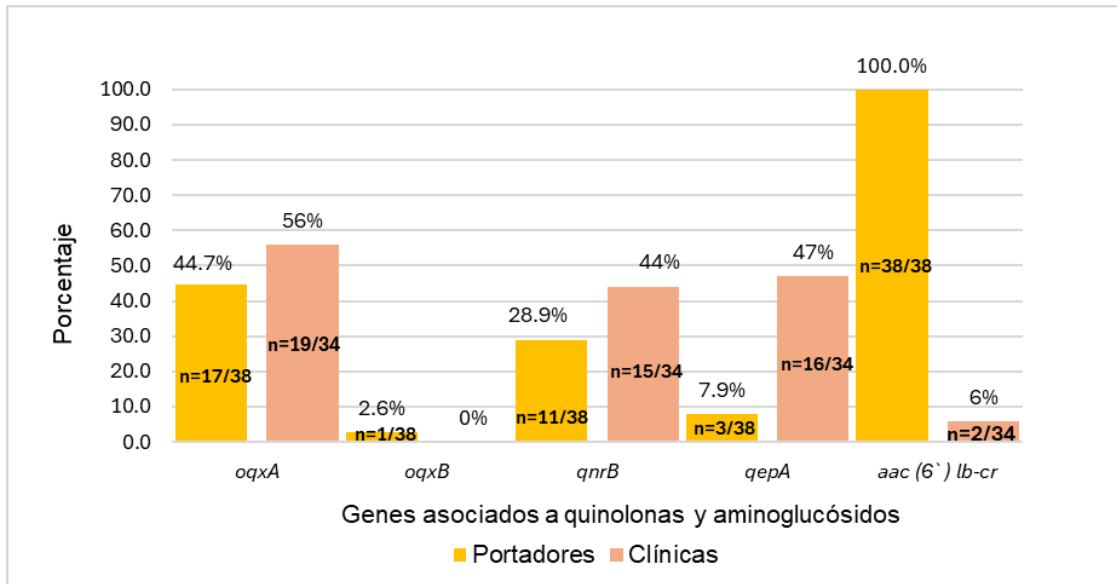
En la **figura 17** se muestra una gráfica de los resultados de genes BLEE en ambos ceparios considerando lo reportado por Méndez-Moreno para cepas de portadores y lo encontrado en el presente estudio para las cepas de *E. coli* aisladas de orina de pacientes con ITU.



**Figura 17. Prevalencia de genes BLEE en las cepas de estudio.** En color amarillo se muestran los resultados obtenidos por Méndez-Moreno *et al.*, 2022\* y en color rosa los porcentajes obtenidos en este estudio en la búsqueda de genes BLEE en las cepas de origen clínico.

También se realizó la búsqueda de genes que pueden estar relacionados con la resistencia a quinolonas (*qnrB*, *oqxA*, *oqxB*, *qepA* y *aac-(6')-Ib-cr*) y aminoglucósidos (*aac-(6')-Ib-cr*) utilizando como material genético ADN genómico, para las 40 cepas de portadores. 38 de las 40 cepas evaluadas dieron positivas para al menos un gen; donde el gen *aac-(6')-Ib-cr* fue el prevalente (n=38), sin embargo, para la variante de este gen asociado a resistencia de quinolonas solo se realizó la búsqueda mediante PCR. El gen *oqxA* se encontró en n=17 de las 38 positivas, *qnrB* (n=11), *qepA* (n=3) y el menos presente fue *oqxB*, ya que solo una cepa presentó este gen (DEC-9.4), (**figura 18 y tabla 16**). Así como también 2 cepas (5%, DEC-37.1 y DEC-45.2) presentaron 4 de los 5 genes de resistencia (*oqxA*, *qepA*, *qnrB* y *aac-(6')-Ib-cr*).

En el caso de las muestras clínicas 34 de las 40 cepas albergaron al menos un gen de resistencia; los genes para las bombas de eflujo *oqxA* y *qepA* fueron los prevalentes (56% y 47% respectivamente). Se obtuvo bajo porcentaje para los genes *qnrB* (44%) y *aac-(6')-lb-cr* (6%) y ningún aislado clínico presenta al gen *oqxB* (figura 18 y tabla 17).



**Figura 18. Porcentaje de genes asociados a quinolonas y aminoglucósidos en las cepas de estudio.** *oqxAB*: bombas de eflujo, donde *oqxA* se encuentra en la membrana interna y *oqxB* en el periplasma; *qepA*: bomba de flujo que se ubica en la membrana interna; *qnrB*: proteína de unión a la ADN girasa para evitar la acción de las quinolonas; *acc-(6')-lb-cr*: variante que tiene la capacidad de acetilar a aminoglucósidos, así como también a quinolonas, principalmente ciprofloxacino. n= es igual al número de cepas positivas que resultaron para cada gen.

En las **tablas 16 y 17** se encuentran los resultados obtenidos de la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos de las cepas de estudio, así como también el resistotipo previamente caracterizado.

**Tabla 16.** Características relacionadas con el filogrupo y perfil genotípico de resistencia a los antibióticos de las cepas de *E. coli* aisladas de heces de portadores.

Portadores (n=40)						
Cepa	Edad	Sexo	Grupo filogenético*	Resistotipo*	BLEE detectadas*	Genes de resistencia para NO-BLEE
DEC-5.2	56	M	A	DCI, AMP	-	-
DEC-6.4	66	M	Desconocido	GEN, TMP-SMT, CIP, CTX, DCI, AMK, NAL, AMP	-	<i>oqxA, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-6.6	66	M	Desconocido	TE, C, DCI, AMP	-	<i>qnrB, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-7	60	M	B2	GEN, TMP-SMT, CIP, CTX, AMK, NAL, AMP, DCI, TE.	-	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-9.1	60	H	A	GEN, TMP-SMT, CIP, CTX, DCI, NAL, AMP	CTX-M1, CTX-M2	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-9.2			B2	CRO, AMK, CFX, FOS	CTX-M1, CTX-M3	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-9.3			A	GEN, TMP-SMT, CIP, CTX, DCI, NAL, AMP	CTX-M1	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-9.4			A	GEN, TMP-SMT, CIP, CTX, DCI, NAL, AMP, CRO, CFX, FOS	CTX-M1	<i>oqxA, oqxB, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-10.3	64	M	B2	GEN, TMP-SMT, CIP, CTX, DCI, NAL, AMP, AMK	-	-
DEC-12	70	M	A	GEN, TMP-SMT, CIP, CTX, DCI, NAL, AMP	CTX-M1	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-12.1			B2	DCI, FOX, CRO, AMP	CTX-M1	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-12.2			B2	CRO, AMK, CFX	CTX-M1	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-12.3			B2	DCI, FOX, CRO, AMP	-	<i>oqxA, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-12.4			A	GEN, TMP-SMT, CIP, CTX, DCI, NAL, AMP, CRO, AMIK	-	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-13.4	34	M	C	DCI, FOX, AMP	-	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-17	63	H	B2	SENSIBLE	-	<i>qnrB, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-17.4			B2	TE, DCI, AMP	-	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-18.2	61	M	B2	TE, DCI, AMP	-	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-25	60	H	ND	X	-	<i>aac-(6')-lb-cr</i>

DEC-25.1			F	DCI, AMP	-	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-25.2			A	DCI, AMP	-	<i>oqxA, qnrB, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-25.3			B2	DCI, AMP	-	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-27.4	60	M	A	TE, FOS, DCI, AMP	-	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-31.3	55	M	A	TE, DCI, AMP	-	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-35	61	M	B2	TE, FOS, DCI, AMP	-	<i>oqxA, qnrB, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-35.1			Desconocido	TE, C, FOS, DCI, AMP	-	<i>aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-36.1	73	M	B2	FOS, DCI, AMP	-	<i>oqxA, qnrB, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-36.3	73	M	B2	X	-	<i>oqxA, qnrB, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-36.4			B2	DCI	-	<i>oqxA, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-37.1	43	H	F	TE, C, DCI, AMP	-	<i>oqxA, qnrB, qepA, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-37.2			B2	DCI, AMP	-	<i>aac-(6')-lb-cr,</i>
DEC-37.4			F	TE, C, DCI, AMP	-	<i>oqxA, qnrB, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-40.3	55	M	F	TE, DCI, AMP	-	<i>oqxA, qepA, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-41.3	57	M	B1	DCI, AMP	-	<i>oqxA, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-44.2	60	M	B1	TE, C, DCI, AMP	-	<i>oqxA, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-44.5			B1	TE, DCI, AMP	-	<i>qnrB, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-45.2	38	M	-	X	-	<i>oqxA, qnrB, qepA, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-45.5			-	X	-	<i>oqxA, qnrB, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-50.1	22	M	B2	TE, DCI, AMP	-	<i>oqxA, aac-(6')-lb-cr</i>
DEC-50.2			B2	GEN, TMP-SMT, CIP, CTX, DCI, NAL, AMP, CRO, CFX.	-	<i>oqxA, aac-(6')-lb-cr</i>

\*Determinado por Méndez-Moreno *et al.*, 2022. **GEN**: Gentamicina, **TMP-SMT**: Trimetoprim-Sulfametoxazol, **CIP**: Ciprofloxacino, **CTX**: Cefotaxima, **DCI**: Nitrofurantoina, **AMK**: Amikacina, **AMP**: Ampicilina, **NAL**, Acido Nalidixico, **CRO**: Ceftriaxona, **CFX**: Cefixima, **C**: Cloranfenicol, **TE**: Tetraciclina, **FOS**: Fosfomicina.

**Tabla 17.** Características relacionadas con el filogrupo y perfil genotípico de resistencia a los antibióticos de las cepas de *E. coli* aisladas de orina de pacientes con ITU (clínicas).

Clínicas (n=40)				
Cepa	Grupo filogenético *	Resistotipo*	BLEE detectadas	Genes de resistencia para NO-BLEE
UPEC 1	B2	AMK, GM, CIP, NOR LVX, AMP, CFX, CTX, AMC, AMS	TEM	-
UPEC 2	B1	GM,CIP,NOR,LVX,TSX,AMP,CFX,CFZ,CTX,CRO,FEP,ATM,AMC,AMS,TE	M2, M1y8, TEM	<i>qnrB</i>
UPEC 3	C	AMK,GM,TSX,AMP,CFX,CTX,AMC,TE	M2, M1y8, TEM	<i>qnrB</i>
UPEC 4	C	AMK,GM,CFX	M15, M1y8, TEM	-
UPEC 5	C	TSX,AMP,CX,CFX,CFZ,CTX,CRO,FEP,ATM,AMC,AMS	M2, M1y8, TEM	-
UPEC 6	B2	GM, CIP, NOR LVS, TSX, AMP, AMC, TE	M9, M1y8, TEM	-
UPEC-7	B1	AMK,GM,AMP,AMC,TE	TEM	<i>qnrB</i>
UPEC-8	-	TE	M15, M9, TEM	<i>qnrB</i>
UPEC-9	B2	-	M1y8, TEM	<i>qnrB</i>
UPEC-10	-	GM,AMP,CFZ,TE	M15, M1y8, TEM	<i>qqxA</i> , <i>qnrB</i>
UPEC-11	?	GM, CIP, NOR LVX, AMP, CFX, CTX	M1y8, TEM	<i>qepA</i>
UPEC-12	E	AMK,GM,AMP,AMC,TE	M1y8, TEM	<i>oqxA</i>
UPEC-13	-	-	M1y8, TEM	<i>oqxA</i>
UPEC-14	E	AMK,CTX,TE	M1y8, M9, TEM	<i>oqxA</i> , <i>qnrB</i>
UPEC-15	E	GM,TSX,AMP,AMC,TE	M9, TEM	<i>oqxA</i> , <i>qnrB</i>
UPEC-16	B1	GM,CFX	M9, M1y8, TEM	<i>oqxA</i> , <i>qnrB</i>
UPEC-17	-	AMK,GM,CTX,TE	M9, M1y8, TEM	<i>oqxA</i> , <i>qepA</i>
UPEC-18	B2	AMP,AMC,ASM	M15, M1y8, TEM	<i>oqxA</i>
UPEC-19	-	AMK,CTX	M1y8	<i>qnrB</i> , <i>qepA</i>
UPEC-20	-	AMK, GM, AMP, CTX, ATM, AMC	M1y8	<i>oqxA</i> , <i>qnrB</i>

UPEC-21	B1	AMK,TSX,AMP,CFZ,CTX,AMC,AMS	M15, TEM	<i>qnrB</i>
UPEC-22	?	AMK,GM,CTX	TEM	<i>qnrB, qepA</i>
UPEC-23	?	AMK,GM,CTX,AMC	TEM	<i>qnrB, qepA</i>
UPEC-24	?	AMK, GM, AMP, CTX, CRO	TEM	-
UPEC-25	E	AMK,GM,TSX,CTX,CRO,AMC,TE	TEM	<i>oqxA, qepA</i>
UPEC-26	B2	AMK, GM, AMP, CTX, AMC	M2, TEM	<i>oqxA, qepA</i>
UPEC-27	E	AMK,GM,CIP,NOR,LVX,TSX,AMP,CX,CFZ,CTX,CRO,AMC, MEM	M2, TEM	<i>oqxA</i>
UPEC-28	E	AMK,GM,TSX,AMP,CFZ,CTX,CRO,AMC,TE	M15, M1y8, TEM	<i>oqxA, qepA</i>
UPEC-29	B1	AMK,GM,CIP,NOR,LVX,TSX,AMP,CFX,CTX,AMC,TE	M1y8, TEM	<i>oqxA, qepA</i>
UPEC-30	B2	TSX,AMP,CTX,AMC,TE	M2, M15, M1y8, M9, TEM	<i>qnrB, qepA</i>
UPEC-31	B1	GM, CIP, NOR, LVX, TSX, AMP, CTX, AMC	M1y8, TEM	<i>oqxA, qepA</i>
UPEC-32	B1	AMK,GM,CIP,NOR,TSX,AMP,CFX,CFZ,CTX,CRO,AMC	M1y8, TEM	<i>oqxA, qepA</i>
UPEC-33	B1	AMK,GM,TSX,AMP,CTX,CRO,AMC	TEM	<i>oqxA</i>
UPEC-34	B2	AMK,GM,CIP,NOR,LVX,TSX,MAC,AMP,CFX,CFZ,CTX,CRO,AMC,TE	M1y8, TEM	<i>qepA</i>
UPEC-35	B1	AMK,GM,CIP,NOR,LVX,TSX,MAC,AMP,CX,CFX,CFZ,CTX,CRO,AMC	-	<i>oqxA, qnrB</i>
UPEC-36	B1	AMK,GM,CIP,NOR,LVX,TSX,AMP,CX,CXF,CFZ,CTX,CRO,ATM,AMC	-	<i>oqxA, qepA</i>
UPEC-37	B2	TSX,AMP,AMC,AMS	M9, TEM	-
UPEC-38	B2	GM,LVX,TSX,AMP,CFX,FEP,ATM,AMC,AMS	M1y8, M2, M9, TEM	<i>qepA</i>
UPEC-39	B2	AMK, GM, CIP, NOR, AMP,CFZ,CTX,CRO,AMC,AMS,TE,IMP	M2, M9, TEM	<i>aac-(6')-lb-cr, qnrB,</i>
UPEC-40	B2	CIP,NOR,LVX,AMP,CFX,CFZ,CTX,CRO,FEP,ATM,AMC,AMS,TE	M1y8, TEM	<i>aac-(6')-lb-cr, qepA</i>

\*Determinado por Ballesteros-Monrreal *et al.*, 2021. ? : No detectado **AMK** : amikacina; **GM** : Gentamicina; **CIP** : Ciprofloxacina; **NOR** : norfloxacina; **LVX** : levofloxacina; **TSX** : cotrimoxazol; **DCI** : nitrofurantoína; **AMP** : ampicilina; **CX** : cefoxitina; **CFX** : Cefuroxima; **CFZ** : ceftazidima; **CTX** : cefotaxima; **CRO** : Ceftriaxona; **FEP** : Cefepima; **ATM** : aztreonam; **AMC** : amoxicilina/clavulanato; **AMS** : Ampicilina/Sulbactam; **TE** : tetraciclina; **MEM** : Meropenem; **IMP** : Imipenem; **ETP** : Ertapenem.

#### 8.4 Secuenciación y análisis de cepas de interés

Los resultados que se mencionan a continuación se encuentran publicados (**Ortega-Enriquez et al., 2024**) (**anexo 5**). Se seleccionaron 3 cepas de portadores para realizar la secuenciación de su genoma completo debido a que poseen características interesantes. Las 3 cepas de *E. coli* seleccionadas presentaron por ensayos *in silico*, dos o más determinantes de patotipos diarreogénicos (2 cepas aisladas del mismo portador DEC 36.3 y DEC-36.4) y una de las cepas además posee genes que codifican factores de virulencia de UPEC (DEC 25.2). DEC-36.3 (aEPEC/ETEC/DAEC) y DEC-36.4 (aEPEC/ETEC) son consideradas como cepas “heteropatógenas” ya que poseen genes del patotipo DEC y fueron aisladas del mismo portador y una cepa “patógena híbrida” que posee genes DEC y genes de ExPEC, denominada DEC-25.2 que específicamente es aEPEC/ETEC/UPEC.

Se realizó secuenciación por Illumina y se obtuvieron lecturas cortas, para posteriormente realizar análisis bioinformático y genómica comparativa (ver material y métodos). En la **tabla 18** se muestran las características de los genomas analizados para estas 3 cepas de *E. coli* aisladas de portadores, obtenidas a partir de los resultados obtenidos en la plataforma RAST.

**Tabla 18.** Características generales del genoma de las cepas de portadores secuenciadas.

Cepa	Origen	Filogrupo <sup>1</sup>	Tamaño del genoma Mb	Contenido de G+C %	N50	Número de contigs	Serotipo/serogrupo	MLST
DEC-25.2	Heces de portador humano	A	5,327,597	50.6	95056	224	O153:H2	ST 69
DEC-36.3	Heces de portador humano	B2	5,233,542	50.8	77241	276	H4	ST 4238
DEC-36.4			5,171,155	49.9	77634	249	H4	

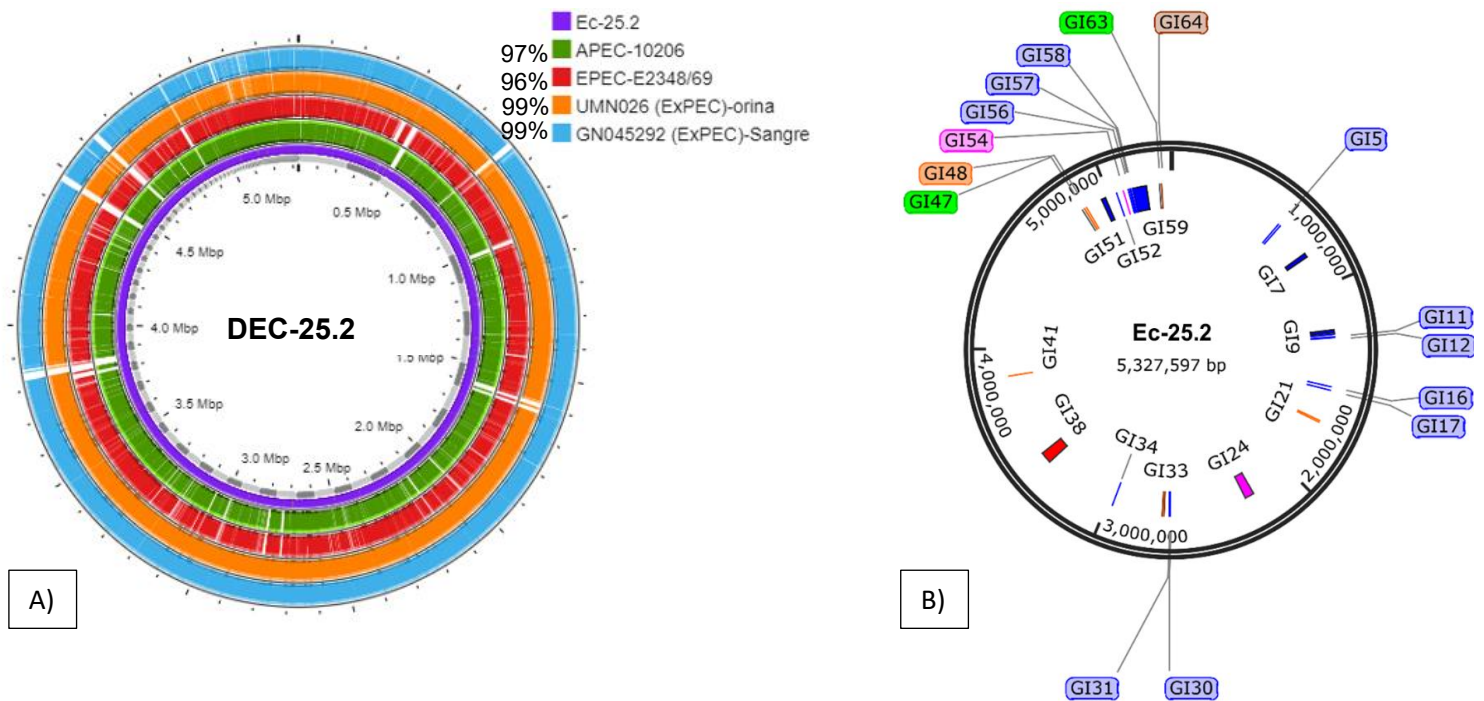
<sup>1</sup>Datos obtenidos por Méndez-Moreno et al., 2022. Las características de los 3 genomas secuenciados se obtuvieron en las plataformas de RAST y el Center for Genomic Epidemiology (ver sección de material y métodos) (**Ortega-Enriquez et al., 2024**).

El genoma de DEC-25.2 presentó una identidad del 100% con los genomas que están clasificados como ExPEC y que se recuperaron de muestras de orina (número de acceso CU928163.2 y CP032515.1) **figura 19, panel A**. Las islas genómicas o IG para este genoma se predijeron utilizando BLAST frente a genomas de *E. coli* disponibles públicamente. La mayoría de las IG encontradas para las tres cepas secuenciadas corresponden a islas genómicas de origen fágico y elementos genéticos móviles como plásmidos y secuencias de inserción, **figura 19, panel B**.

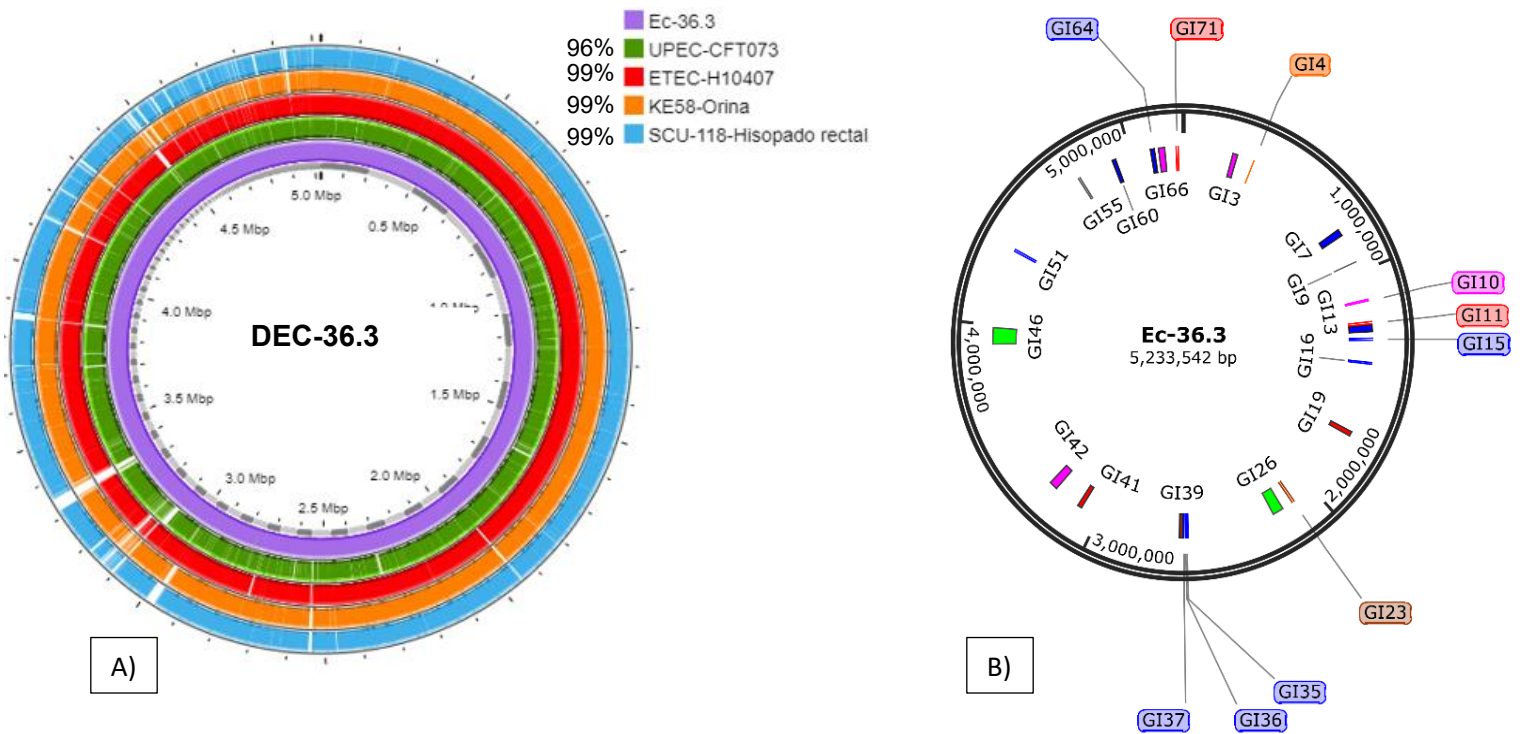
De igual forma, el ensamble del genoma de la cepa *E. coli* DEC-36.3 mostró un 99.97% de identidad con el genoma de la cepa de *E. coli* KE58 (número de acceso CP141075.1) aislada de orina en Dallas, Texas y con el genoma de ETEC6329F (número de acceso CP122609.1) documentada como *E. coli* enterotoxigénica como nuestro aislado (**figura 20 Panel A**). El origen de IG encontradas en la plataforma de IslandViewer en su mayoría pertenecieron a origen fágico y de virulencia (**figura 20 panel B**). Por otro lado, el genoma de DEC-36.4 aislada de heces del mismo portador que la cepa anterior, tuvo un 99,97% de identidad con la cepa de *E. coli* 184/2aE (número de acceso CP072858.1) que fue aislada en Brasil a partir de las heces de un viajero que regresaba del África subsahariana (**figura 21 Panel A**). En la **figura 21 panel B** se muestra las IG encontradas en su mayoría de origen fágico y elementos genéticos móviles. En la sección de **anexo 4** se muestran los alineamientos realizados en la plataforma de Proksee.

El análisis *in silico* del serotipo mostró que DE-25.2 pertenecía a ST69. Por otro lado, tanto DEC- 36.3 como DEC-36.4 pertenecían al ST4238. Lo que respecta a las características de virulencia y resistencia se muestran en la **tabla 19**. Los genomas presentan determinantes genéticos de resistencia a fluoroquinolonas, aminoglucósidos, en su mayoría. Por otro lado, la herramienta VirulenceFinder reveló la presencia de genes implicados en la captación de hierro, fimbrias, adhesinas no fimbriales y toxinas implicadas en la patogenicidad de *E. coli*.

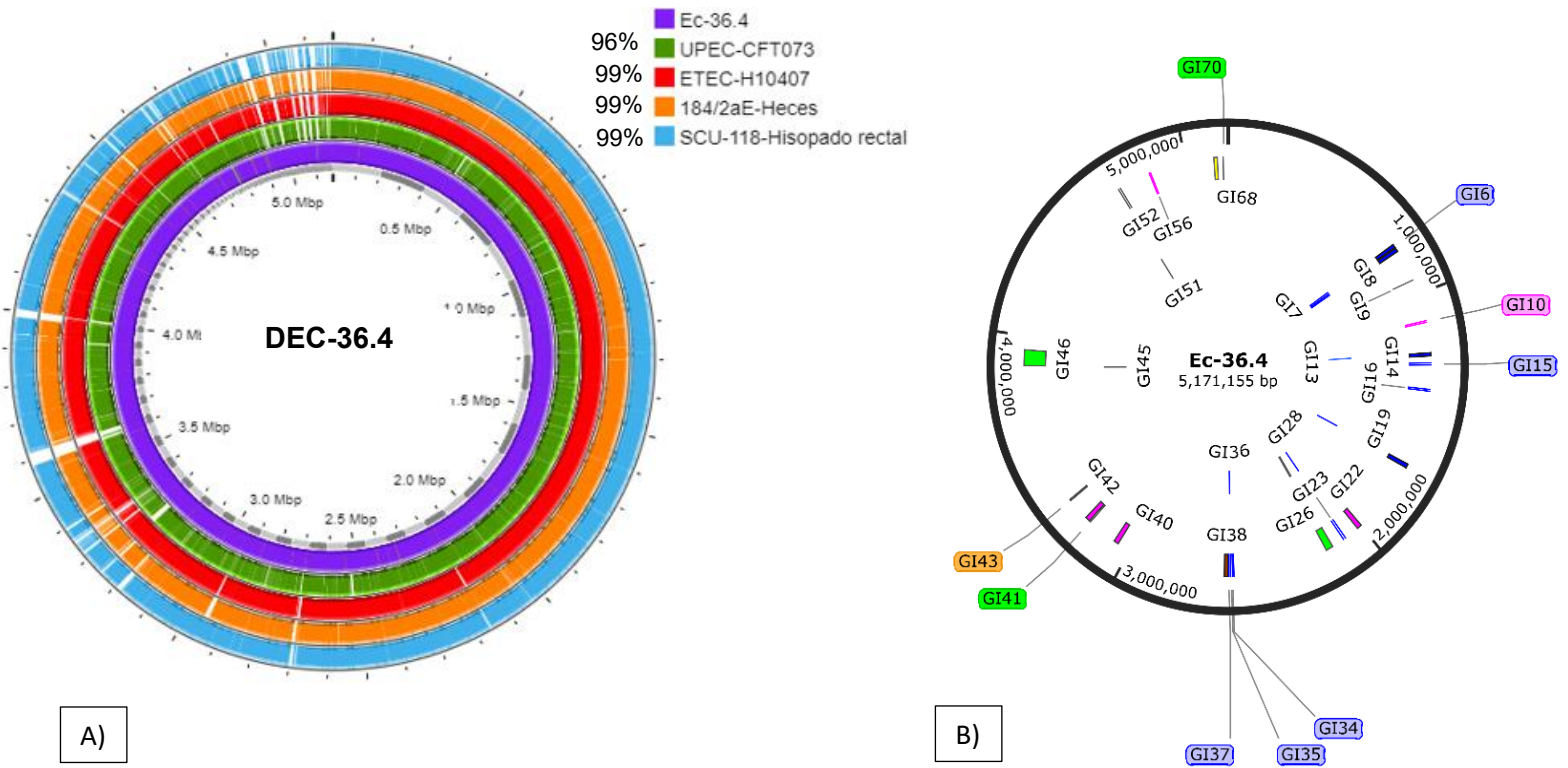
Los elementos genéticos móviles encontrados en los genomas secuenciados se muestran en la **tabla 19**. En lo que respecta a la filogenia como ya se ha mencionado, los genomas DEC-36.3 y DEC-36.4 pertenecen al filogrupo B2 y se clasifican en el ST4238 y el genoma DEC-25.2 pertenece al filogrupo A y al ST69. Se construyó un árbol filogenético basado en UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) de acuerdo con los SNPs encontrados para cada cepa, la filogenia mostró que los genomas DEC-36.3 y DEC-36.4 forman parte de un clado junto a ETEC (**figura 22**). El genoma DEC-25.2 pertenece a un clado en estrecha relación con APEC (*E. coli* Patógeno Aviar), correspondiente al patotipo ExPEC, pero también relación con EPEC que es uno de los patotipos previamente asociados a diarrea (**Méndez-Moreno et al., 2022**).



**Figura 19. Características del genoma secuenciado de la cepa DEC-25.2. A). Mapa que muestra la comparación entre los genomas secuenciados con genomas de referencia previamente reportados en NCBI realizado en Proksee.** Los genomas de referencia, EPEC (*E. coli* enteropatógena, categoría del patotipo diarreogénico o DEC), APEC (*E. coli* patógeno aviar del patotipo ExPEC). Los genomas marcados en color corresponden al análisis en IslandViewer (naranja) y BV-BCR (azul) donde se buscaron IG y genomas similares previamente reportados. **B) Mapa realizado en SnapGene que muestra las Islas Genómicas encontradas en el genoma secuenciado.** Origen fágico en azul; elementos genéticos móviles en verde; IG de factores de virulencia asociados a toxinas y genes de evasión inmune, en rosa; relacionadas con la adherencia como fimbrias en naranja; sistemas toxina-antitoxina en amarillo; IG de resistencia a antibióticos en café. (Ortega-Enriquez *et al.*, 2024).



**Figura 20. Características del genoma secuenciado de la cepa DEC-36.3. A). Mapa que muestra la comparación entre los genomas secuenciados con genomas de referencia previamente reportados en NCBI realizado en Proksee. Los genomas de referencia, ETEC (*E. coli* enterotoxigénica, categoría del patotipo diarreogénico o DEC), UPEC (*E. coli* uropatógena del patotipo ExPEC). Los genomas marcados en color corresponden al análisis en IslandViewer (naranja) y BV-BCR (azul) donde se buscaron IG y genomas similares previamente reportados. B) Mapa realizado en SnapGene que muestra las Islas Genómicas encontradas en el genoma secuenciado. Origen fágico en azul; elementos genéticos móviles en verde; IG de factores de virulencia asociados a toxinas y genes de evasión inmune, en rosa; relacionadas con la adherencia como fimbrias en naranja; sistemas toxina-antitoxina en amarillo; IG de resistencia a antibióticos en café. (Ortega-Enriquez et al., 2024).**



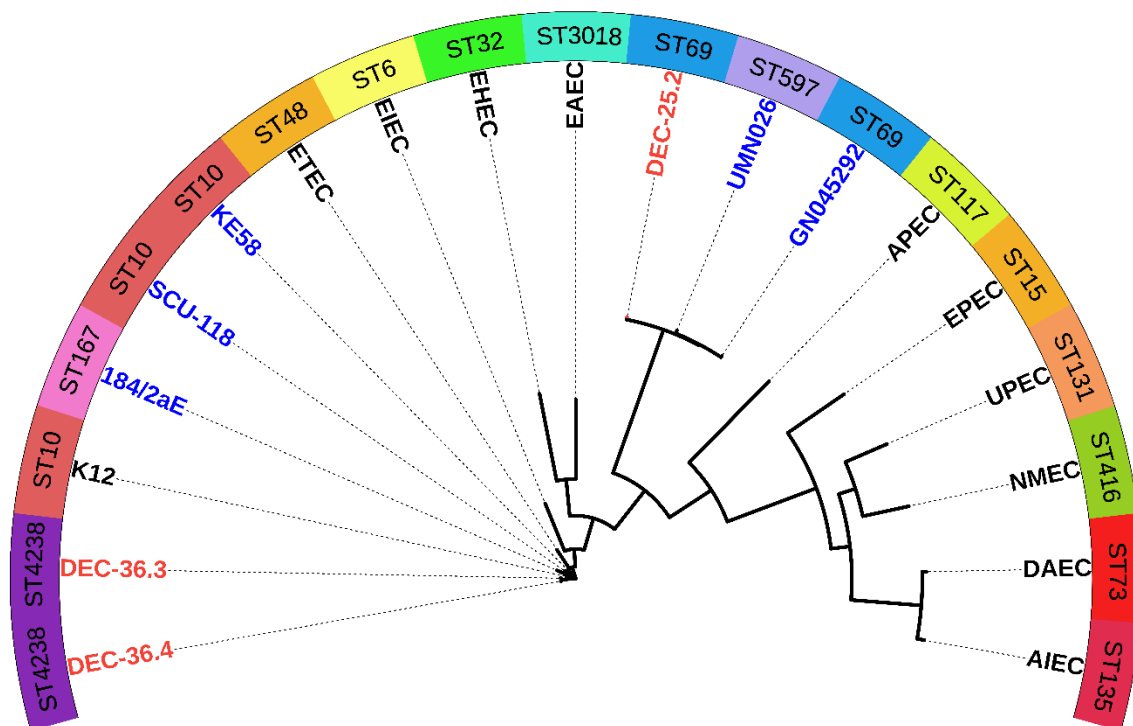
**Figura 21. Características del genoma secuenciado de la cepa DEC-36.4. A). Mapa que muestra la comparación entre los genomas secuenciados con genomas de referencia previamente reportados en NCBI realizado en Proksee. Los genomas de referencia, ETEC (*E. coli* enterotoxigénica, categoría del patotipo diarreogénico o DEC), UPEC (*E. coli* uropatógena del patotipo ExPEC). Los genomas marcados en color corresponden al análisis en IslandViewer (naranja) y BV-BCR (azul) donde se buscaron IG y genomas similares previamente reportados. B) Mapa realizado en SnapGene que muestra las Islas Genómicas encontradas en el genoma secuenciado. Origen fágico en azul; elementos genéticos móviles en verde; IG de factores de virulencia asociados a toxinas y genes de evasión inmune, en rosa; relacionadas con la adherencia como fimbrias en naranja; sistemas toxina-antitoxina en amarillo; IG de resistencia a antibióticos en café (Ortega-Enriquez et al., 2024).**

**Tabla 19. Genes de resistencia, virulencia y EGM encontrados en los genomas de las cepas de *E. coli* aisladas de origen fecal de portadores secuenciadas a través de las herramientas mostradas en CGE (Center for Genomic Epidemiology) y CARD.**

Cepa	DEC-25.2	DEC-36.3	DEC-36.4
Variante de FimH	<i>fimH27</i>	<i>fimH54</i>	<i>fimH54</i>
Genes de resistencia	Fluoroquinolonas ( <i>qnrB19</i> ); Aminoglucósidos ( <i>aadA5</i> ; <i>aac</i> (6')- <i>lb-cr</i> ) Sulfonamidas ( <i>sul1</i> ); Sulfametoxazol- Trimetoprim ( <i>dfrA17</i> )	Fluoroquinolonas ( <i>qnrB</i> ); Aminoglucósidos ( <i>aac</i> (6')- <i>lb-cr</i> )	Fluoroquinolonas ( <i>qnrB</i> ); Aminoglucósidos ( <i>aac</i> (6')- <i>lb-cr</i> )
Bombas de eflujo	Fluoroquinolonas ( <i>evgA</i> , <i>mdtH</i> , <i>marA</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> );	Macrólidos ( <i>tolC</i> , <i>evgA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> );	Macrólidos ( <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> ); Tetraciclinas ( <i>evgA</i> , <i>emrY</i> );

asociadas a resistencia	Tetraciclina ( <i>emrY</i> , <i>evgA</i> , <i>marA</i> ); Macrólido ( <i>evgA</i> ); Monobactámicos ( <i>marA</i> ); Carbapenémicos ( <i>marA</i> ); Cefalosporinas ( <i>marA</i> ).	Tetraciclinas ( <i>evgA</i> , <i>emrY</i> ); Nitroimidazol ( <i>msbA</i> ); Fluoroquinolonas ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); Aminoglucósidos ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); Carbapenemasas ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> , <i>evgA</i> , <i>AcrS</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); Cefalosporinas ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrA</i> , <i>emrB</i> , <i>evgS</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>acrE</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); Cloranfenicol ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrA</i> , <i>emrB</i> , <i>evgS</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>acrE</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> )	Estreptograminas b ( <i>msrA</i> ); Nitroimidazol ( <i>msbA</i> ); Fluoroquinolonas ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); Aminoglucósidos ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); Carbapenemasas ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> , <i>evgA</i> , <i>AcrS</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); Cefalosporinas ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrA</i> , <i>emrB</i> , <i>evgS</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>acrE</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); Cloranfenicol ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrA</i> , <i>emrB</i> , <i>evgS</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>acrE</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> )
Genes de virulencia	<i>chuA</i> , <i>cia</i> , <i>eilA</i> , <i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>gad</i> , <i>hlyE</i> , <i>iha</i> , <i>irp2</i> , <i>iss</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>kpsE</i> , <i>kpsMII_K52</i> , <i>lpfA</i> , <i>ompT</i> , <i>papA</i> , <i>papC</i> , <i>sat</i> , <i>senB</i> , <i>sitA</i> , <i>terC</i> , <i>traJ</i> , <i>traT</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i>	<i>afaD</i> , <i>capU</i> , <i>cea</i> , <i>colE5</i> , <i>csgA</i> , <i>fimH</i> , <i>hlyE</i> , <i>iha</i> , <i>ireA</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>shiB</i> , <i>sigA</i> , <i>traT</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i>	<i>afaD</i> , <i>capU</i> , <i>cea</i> , <i>colE5</i> , <i>csgA</i> , <i>fimH</i> , <i>hlyE</i> , <i>iha</i> , <i>ireA</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>shiB</i> , <i>sigA</i> , <i>traT</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i>
EGM's	Plásmidos: Col156, Col4401, Col(pHAD28), IncFIB, IncF11, Inc11-l.	Plásmidos: IncB/O/K/Z.	Plásmidos: IncB/O/K/Z.

\*EGM's: Elementos Genéticos Móviles. **chuA**: Receptor de hemina de la membrana externa; **cia**: Colicina; **eilA**: homólogo de HiiA de *Salmonella*; **fimH**: fimbrias de tipo 1; **fyuA**: receptor de sideróforo de yersiniabactina; **gad**: Glutamato Decarboxilasa; **hlyE**: Hemolisina de *E. coli* Aviar; **ireA**: Receptor de sideróforo; **iha**: Proteína de adherencia y captación de hierro; **irp2**: Proteína de alto peso molecular 2 Péptido sintetasa no ribosomal; **iss**: Aumento de la supervivencia del suero; **iucC**: Aerobactina sintetasa; **iutA**: Receptor de aerobactina; **kpsE**: Polisacárido de la cápsula Exportación Proteína de la membrana interna; **kpsMII\_K52**: Proteína transportadora de ácido polisialico-capsula del grupo 2; **lpfA**: Fimbria polar larga; **ompT**: Proteasa de membrana externa; **papA**: Subunidad mayor del pili F16; **papC**: Fimbrias de la membrana externa chaperona P; **sat**: Autotransportadores de serina proteasa de Enterobacteriaceae (SPATE); **senB**: Plásmido que codifica a enterotoxina; **shiB**: Homólogos del gen *shiA* de la isla de patogenicidad SHI-2 de *Shigella flexneri*; **sigA**: Autotransportadores de serina proteasa de Enterobacteriaceae (SPATE); **sitA**: Proteína transportadora de hierro; **terC**: Proteína de resistencia a los iones telurio; **traJ**: Regulador positivo del Operón de Transferencia Conjugal; **traT**: Proteína de la membrana externa- resistencia al complemento; **yehA**: Lipoproteína de la membrana externa; **yehB**: Chaperona de fimbria YHD; **yehC**: Chaperona de fimbria YHD; **yehD**: Subunidad mayor de pilina YHD Clúster fimbrial; **afaD**: Adhesión afimbrial; **capU**: Homólogo de la hexosiltransferasa; **cea**: Colicina E1; **colE5**: Colicin aE5; **sitABCD**: El sistema mediador del transporte de hierro y manganeso; **qacE**: Detección de genes de resistencia a biocidas; **evgA**: Regulador positivo de los complejos de proteínas de eflujo EmrKY y MdtEF; **mdtH**: Proteína de resistencia a múltiples fármacos; **emrR**: Regulador negativo de la bomba de eflujo de múltiples fármacos EmrAB-TolC; **emrB**: Translocasa de la proteína de eflujo EmrB-TolC; **qnrB19**: Proteína de resistencia a quinolonas mediada por plásmido; **emrY**: Transporte multidroga que mueve sustratos a través de la membrana interna de los gramnegativos; **aadA5**: Gen de la aminoglucósido nucleotidiltransferasa; **sul1**: Dihidropteroato sintasa resistente a sulfonamidas; **dfrA17**: Dihidrofolato reductasa codificada por integrón; **tolC**: Subunidad proteica de complejos de eflujo de múltiples fármacos; Subunidad proteica del complejo de eflujo de múltiples fármacos acrA-AcrB-TolC; **acrA**: Representa la porción periplásmica de la proteína de transporte; **acrB**: Funciona como un heterotrímero que forma el componente de la membrana interna; **acrE**: Proteína de fusión de membrana, similar a acrA; **acrS**: Represor del complejo de eflujo AcrAB y asociado a la expresión de AcrEF; **gadX**: Regulador de la familia AraC que promueve la expresión de MdtEF para conferir resistencia a múltiples fármacos; **mdtE**: Proteína de fusión de membrana del complejo de eflujo de múltiples fármacos MdtEF; **kdpDE**: Sistema regulador de dos componentes en *Escherichia coli*. Papel en el transporte de potasio y la homeostasis; **cpxA**: Sensor quinasa localizado en la membrana que se activa por el estrés de la envoltura; **marA**: Activador transcripcional de genes implicados en la resistencia múltiple a los antibióticos; **msbA**: Miembro del grupo transportador MDR-ABC, transporta lípido A; **msr(A)**: Metionina sulfóxido reductasa A; **mph(C)**: Macrólido fosfotransfera.

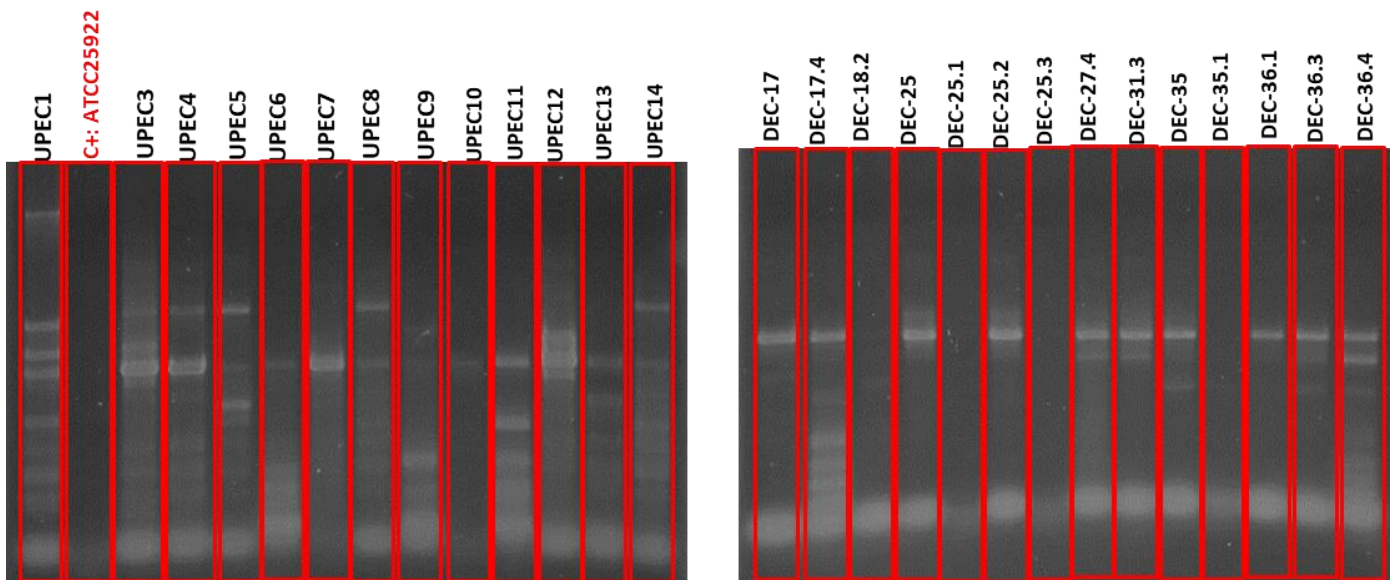


**Figura 22. Árbol filogenético UPGMA basado en SNPs. Representación gráfica de los genomas secuenciados en comparación con los genomas de referencia de cepas de *E. coli*.** Genomas de cepas de estudio de portadores subrayadas de color rojo: DEC-25.2, DEC-36.3 y DEC-36.4. Genomas de referencia reportados mediante el análisis en Proksee y NCBI en color azul. Genomas de referencia de cepas de *E. coli* en color negro: EPEC (E2348/69), ETEC (H10407), EHEC (1092), EAEC (SAMEA7457016), EIEC (53638), y DAEC (SK1144), UPEC (CFT073), APEC (*E. coli* patógena aviar 102026), AIEC (*E. coli* adherente-invasiva LF82), NMEC (O18) y *E. coli* K12 (comensal) (Ortega-Enriquez et al., 2024).

El análisis bioinformático sugirió que los tres genomas analizados pertenecen a patotipos híbridos. El genoma DEC-25.2, previamente reportado como (aEPEC/DEC), incluye factores de virulencia que definen ExPEC (UPEC), así como la presencia de GI con una identidad BLAST del 100% con los genomas UPEC. En cambio, la filogenia mostró que los conjuntos genómicos de DEC-36.3 (aEPEC/ETEC/DAEC) y DEC-36.4 (aEPEC/ETEC) están agrupados en un clado que incluye genomas que pertenecen a patotipos diarreogénicos. Estos resultados sugieren que estas cepas deben considerarse como *E. coli* híbridas heteropatógenas.

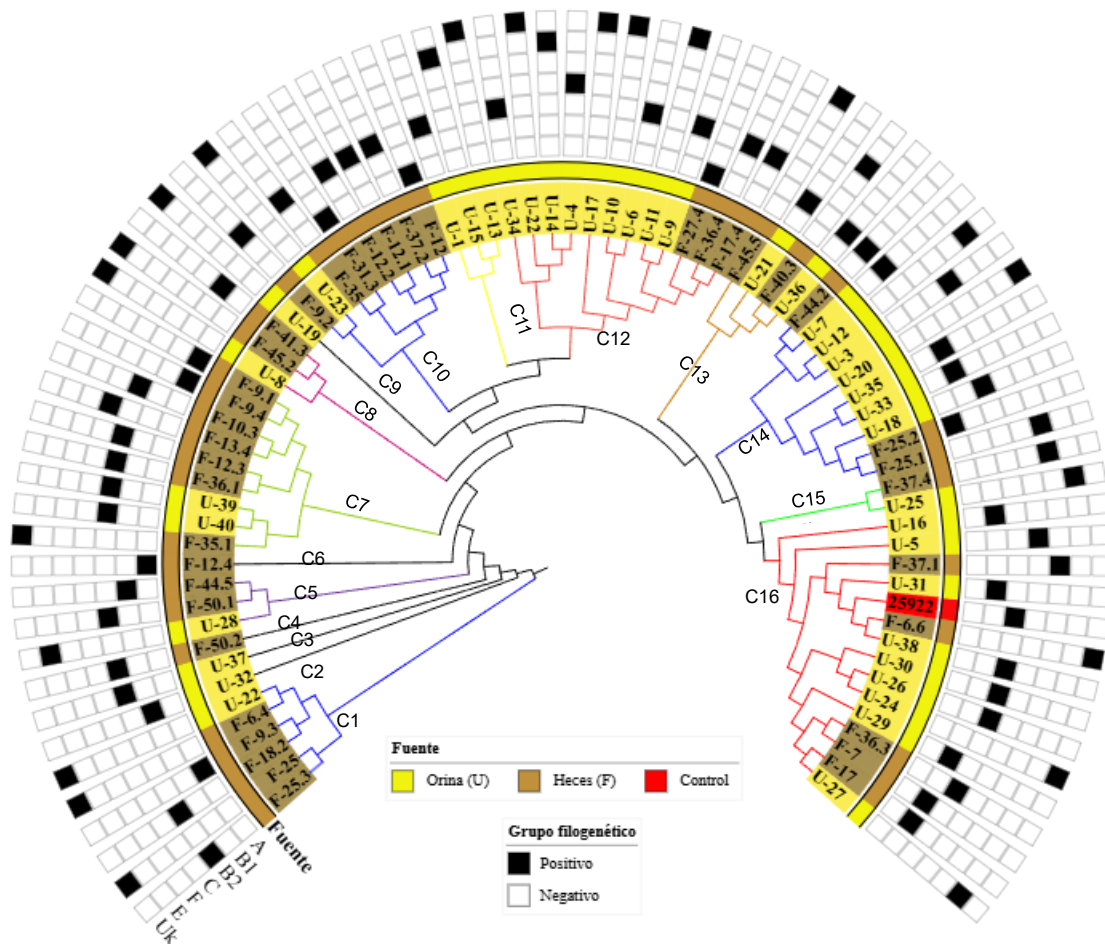
### 8.5 Relación filogenética mediante ERIC-PCR

La ERIC-PCR es una técnica que nos permite inferir la diversidad clonal entre distintos géneros bacterianos. En el presente estudio se caracterizaron las 80 cepas de *E. coli*, aisladas de dos orígenes diferentes (40 de origen fecal y 40 de origen urinario), con el fin de establecer una relación filogenética. En la **figura 23** se muestra el patrón de bandas seleccionadas por el programa GelJ.



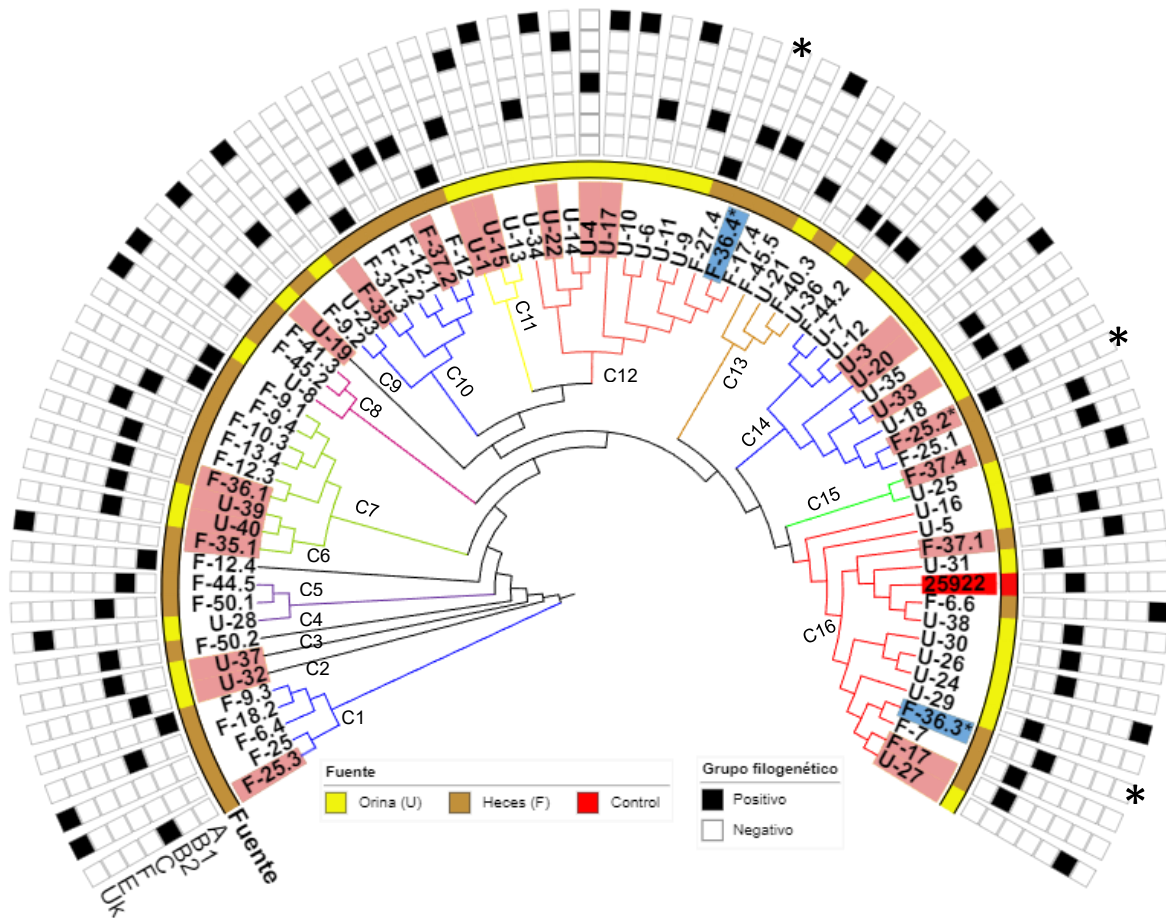
**Figura 23. Fotografía de los gels representativos obtenidos de los productos de ERIC-PCR.** DEC: Portadores, UPEC: Clínicas. C+: Cepa ExPEC *E. coli* ATCC25922.

Posteriormente los aislados fueron agrupados mediante el algoritmo UPGMA, datos que se utilizaron para la construcción de un dendograma en el programa iTOL donde se estableció una relación filogenética independiente del origen con 16 clados (C) relacionados (**figura 24**). En los 10 primeros clados se agruparon 34 cepas, que en su mayoría se aislaron de portadores (F) (n=25, 73.5%), el resto son aislados de orina (U) (n=9 26.4%). Sin embargo, en los C 12 y 16 se agrupan cepas de ambos orígenes (rojo).



**Figura 24. Dendrograma construido mediante los resultados de ERIC-PCR.** Se utilizo el programa GelJ, el algoritmo UPGMA y el programa iTOL. En color rojo se muestra la cepa control ATCC25922 (UPEC). U: Origen urinario; F: Origen fecal. Los grupos filogenéticos están indicados para cada cepa en la parte superior de la figura con recuadros en negro y la letra C con un número indica los diferentes clados esquematizados con diferentes colores.

Además, se puede observar que, en 10 clados se encontraron 25 cepas híbridas (C1, C2, C3, C7, C9, C10, C11, C12, C14 y C16). En los C7, C12, C14 y C16 se agrupan la mayoría de las cepas categorizadas como híbridas, en C14 se encuentran las cepas UPEC-3, UPEC-20, UPEC-33 y DEC-25.2. En el C16 se agruparon UPEC-27 con las cepas de portadores DEC-17, DEC-36.3 y DEC-37.1. Así como también en el C7 se agruparon UPEC-39 con DEC-35.1 y DEC-36.1, finalmente en el C12 se agruparon las cepas clínicas UPEC-22, UPEC-4, DEC-36.4 y UPEC-17. 23 cepas son híbridas-patógena y 2 son heteropatógenas (**figura 25**).

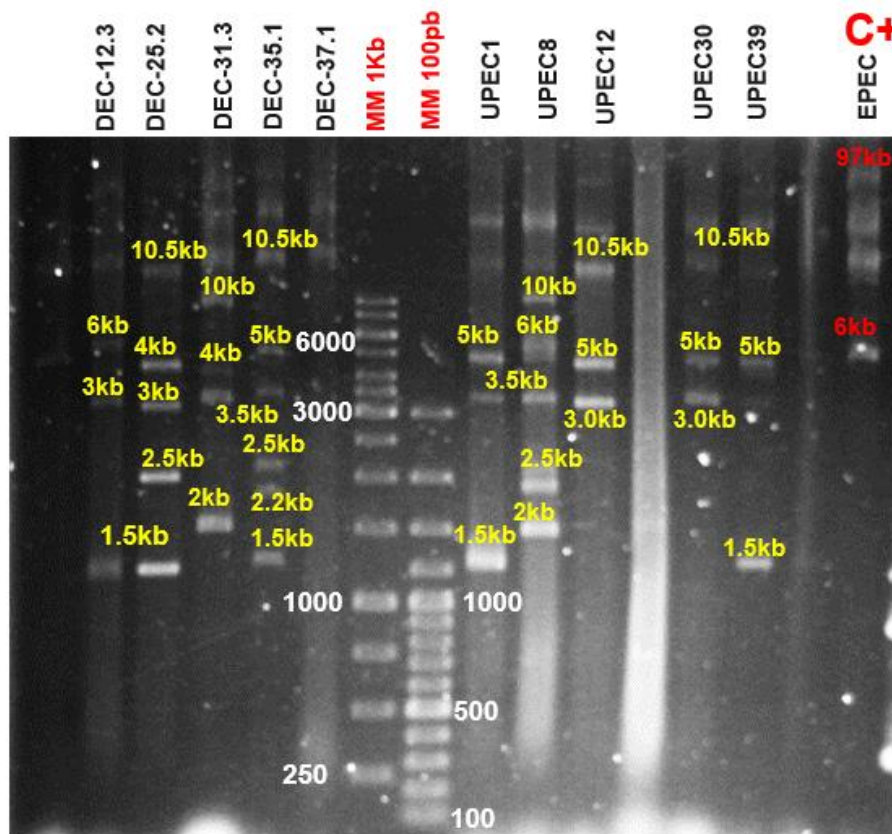


**Figura 25. Dendrograma construido en base al perfil de bandas de ERIC-PCR.** En color rosa se muestran las cepas clasificadas como patotipo hibrido-patogeno. En color azul las cepas consideradas como patotipos heteropatogenos según análisis bioinformático. Se usó el programa GelJ, el algoritmo UPGMA y el programa iTOL. En color rojo la cepa control ATCC25922 (UPEC). **U**: Origen urinario; **F**: Origen fecal. Los grupos filogenéticos están indicados para cada cepa en la parte superior de la figura con recuadros en negro y la letra C con un número indica los diferentes clados esquematizados con diferentes colores.

\* cepas secuenciadas y analizadas por bioinformática.

### 8.6 Perfil y caracterización plasmídica parcial

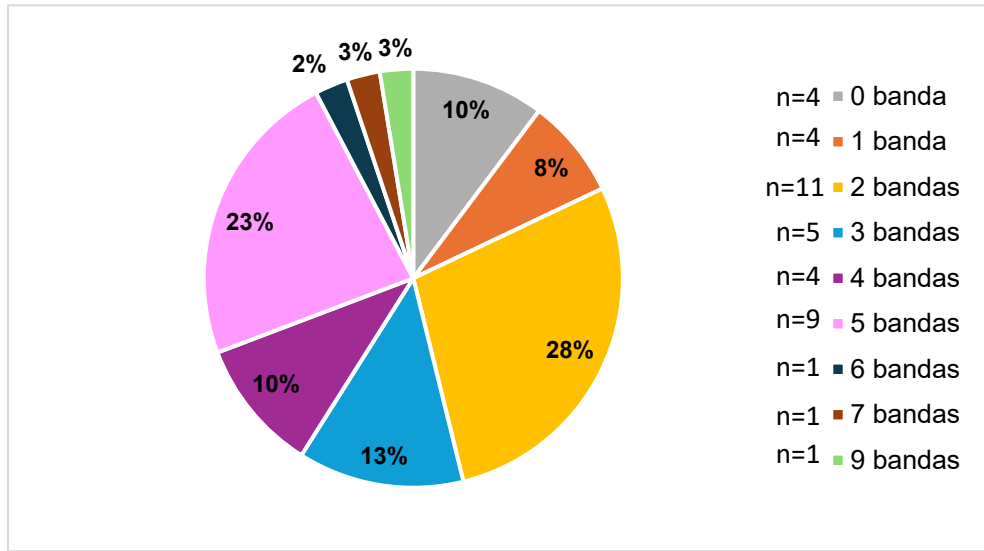
El perfil plasmídico se realizó mediante la extracción de ADN por el método de lisis alcalina, posteriormente mediante un análisis electroforético se determinó el número de bandas plasmídicas y tamaños aproximados en base a cepas control y marcadores de peso molecular. En la **figura 26** se muestra un gel representativo del perfil plasmídico.



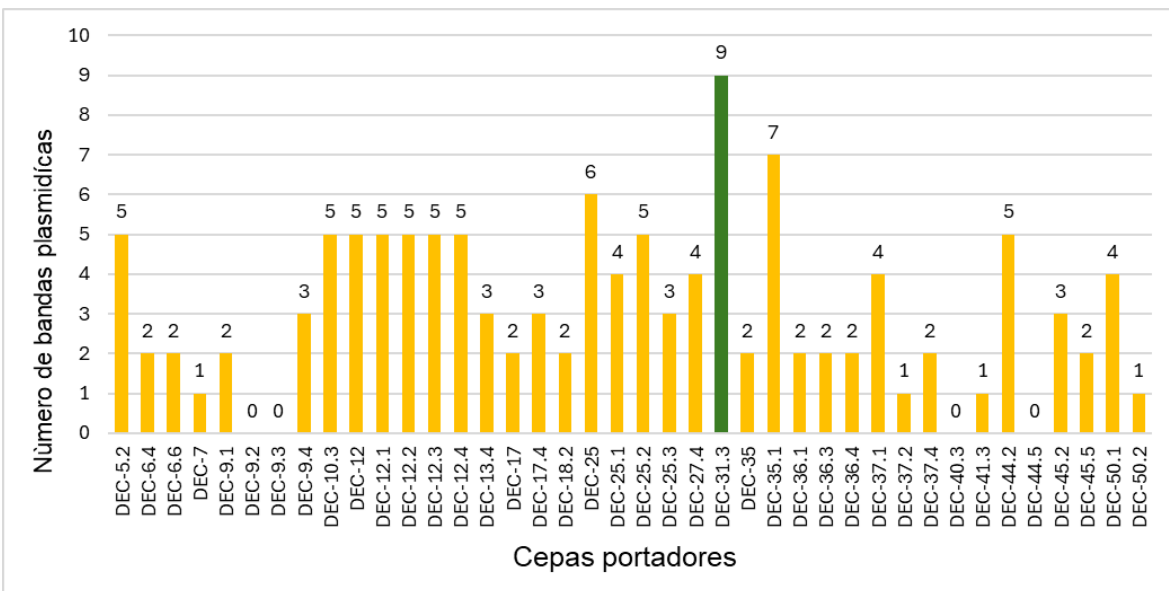
**Figura 26. Perfil plasmídico de *E. coli* de origen fecal y urinario. Gel de agarosa al 1.2 % representativo de la extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina de diferentes cepas de *E. coli*. Los controles usados fueron EPEC E2348/69 (6.1 kb y 97 kb) y marcadores de peso molecular de 100 pb y 1kb. Los números arriba de cada banda indican el peso aproximado molecular expresado en kilopares de bases (kb). DEC. Cepas de origen fecal, UPEC. Cepas urinarias.**

Del análisis del perfil plasmídico para las cepas de portadores, se observó que 36 de las 40 (90%) mostraron un perfil de bandas plasmídicas que poseen de 1 a 9 bandas por cepa. Las cepas con 2 bandas representan el mayor porcentaje (31% o n=11) (**figura 27**) y tamaños aproximados de 1.9 kb a 95 kb. La cepa DEC-31.3 de

portadores fue la que presento el mayor número de bandas (n=9) correspondiente a un patotipo ETEC (gen LT) según lo reportado por Méndez-Moreno et al., 2022 y según este estudio con un perfil de virulencia asociado a UPEC de *fimH*, *iucD*, *fyuA*, *satP* y *traT* y con el gen de resistencia *aac-(6')-Ib-cr*. Se identificaron cuatro cepas sin plásmidos (**figura 28**).

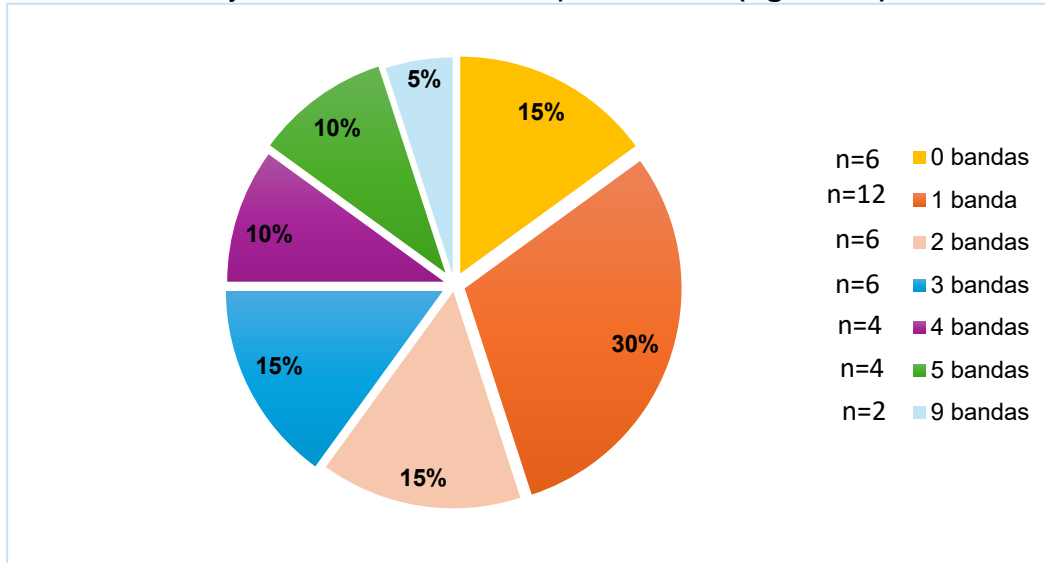


**Figura 27. Bandas plasmídicas en *E. coli* de origen fecal.** En colores se muestra el porcentaje por número de bandas plasmídicas (ver referencia en panel derecho).

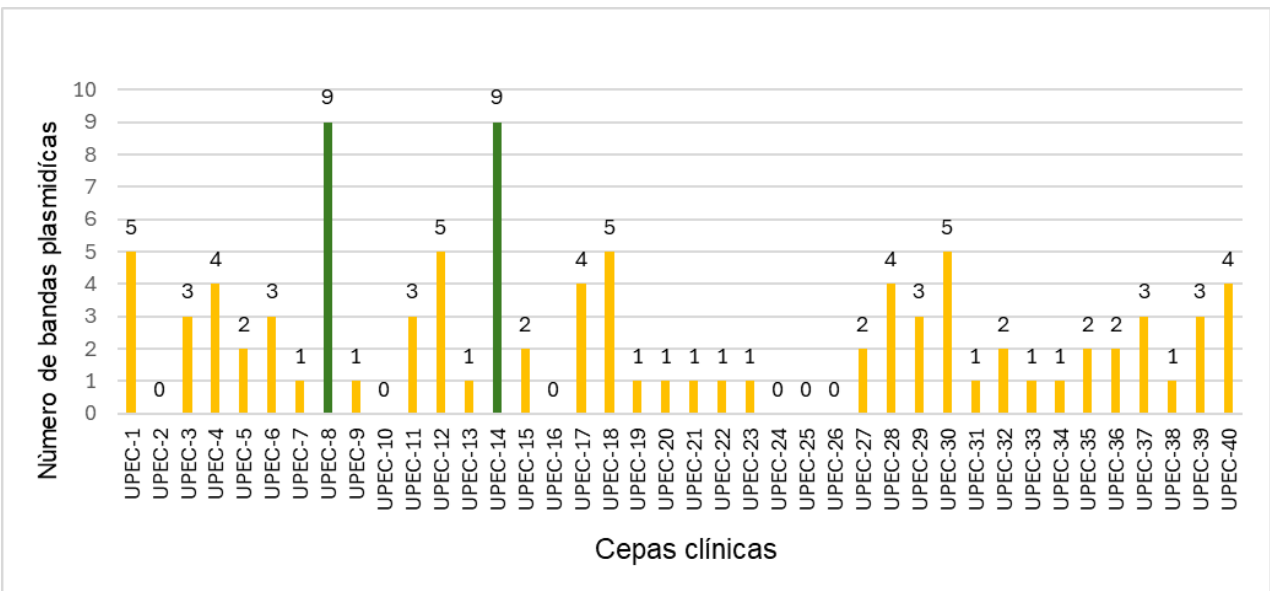


**Figura 28. Número de bandas plasmídicas en cepas de *E. coli* de origen fecal.** DEC-31.3 con el mayor número de bandas.

Por otra parte, 34 de las 40 muestras clínicas (85%) mostraron bandas plasmídicas, poseen de 1 a 9 bandas por cepa (**figura 29**) y tamaños aproximados de 1.4 kb a 92 kb. Las cepas UPEC-8 con perfil de virulencia (*fimH*, *fliCD*, *hlyA*, *KpsM*, *traT*, *feoB*), genes de resistencia CTXM-15, M9, *bla<sub>TEM</sub>*, *qnrB* y UPEC-14 (*fimH*, *kpsM*, *iucD*, *feoB* y genes de resistencia CTXM1y8, M9, *bla<sub>TEM</sub>*, *oqxA*, y *qnrB*) fueron las que presentaron el mayor número de bandas plasmídicas (**figura 30**).

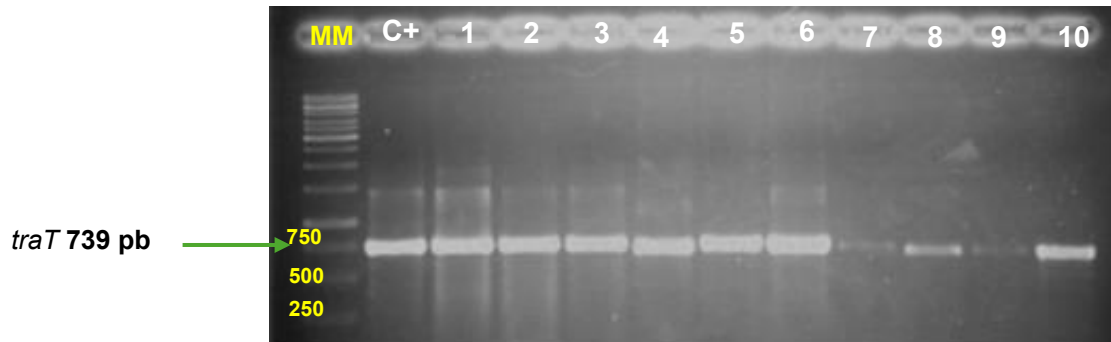


**Figura 29. Bandas plasmídicas por cepa en las muestras clínicas.** En colores se muestra el porcentaje por número de bandas plasmídicas (ver referencia en panel derecho).



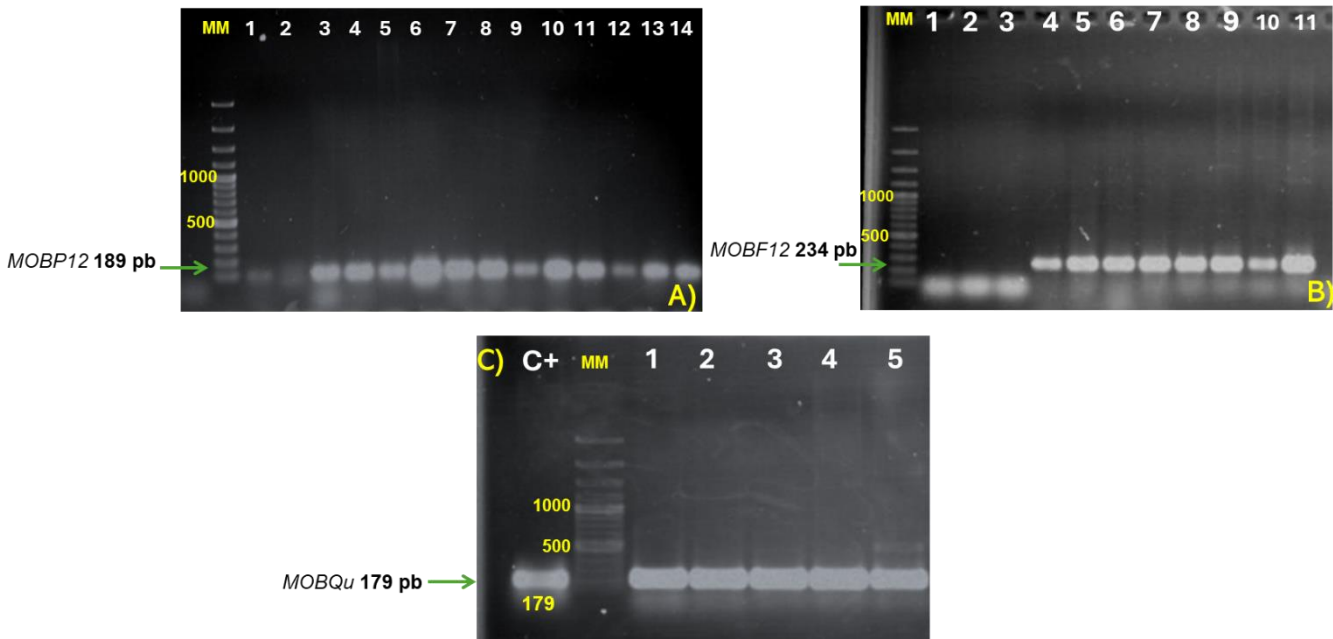
**Figura 30. Numero de bandas plasmídicas por cepa en las muestras de origen clínicas.** UPEC 8 y UPEC 14 con el mayor número de bandas.

En la caracterización parcial de plásmidos se descartaron las cepas que por medio del perfil plasmídico no presentaron bandas; por lo que se trabajaron 36 cepas de origen fecal y 34 cepas de origen urinario o clínico. 80% ( $n=29$ ) de las cepas de portadores o de origen fecal y 58% ( $n=20$ ) de las muestras clínicas presentaron el gen *traT* **figura 31**.

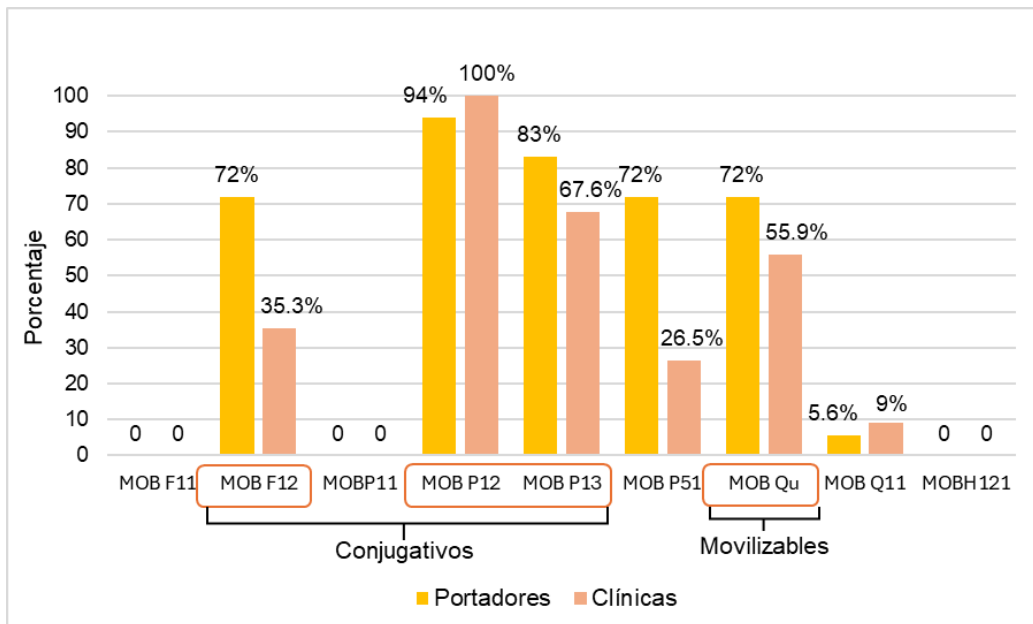


**Figura 31. Determinación del gen *traT* en *E. coli* de origen fecal y urinario.** Gel de agarosa al 1% representativo. C+: O581 Carriles: **1:** DEC-25.2; **2:** DEC-31.3; **3:** DEC-35.1; **4:** DEC-36.3; **5:** DEC-36.4; **6:** UPEC28; **7:** UPEC29; **8:** UPEC30; **9:** UPEC31 y **10:** UPEC32. MM: Marcador de 1kb.

Así mismo, se realizó la búsqueda de la familia de relaxasas (MOB) (**figura 32**) las prevalentes para ambos ceparios fueron la familia MOBP: MOBP12 (94 % y 100%), MOBP13 (83% y 67.6%), MOBP51 (72% y 26.5%), después la familia MOBF, MOBF12 (72% y 35%), para portadores y muestras clínicas respectivamente. Estas familias de relaxasas se han caracterizado por pertenecer a plásmidos conjugativos. La familia MOBQu que se ha reportado en plásmidos movilizables se encontró en 72% para portadores y 55.9% para clínicas (**figura 33**).

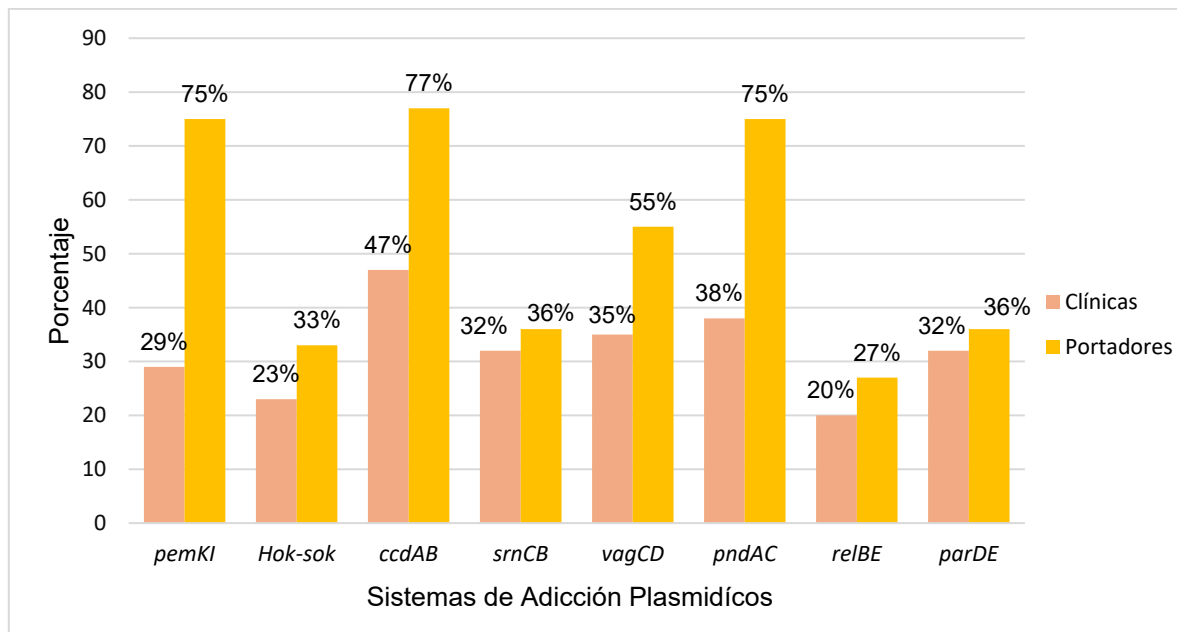


**Figura 32. Determinación de familias de relaxasas en *E. coli* con plásmidos de origen fecal y urinario.** Resultados del corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.2%. **A) Búsqueda de MOB P12:** Carriles: 1: DEC-5.2; 2: DEC-6.4; 3: DEC-25.3; 4: DEC-31.3; 5: DEC-35.1; 6: DEC-36.3; 7: DEC-36.4; 8: UPEC1; 9: UPEC2; 10: UPEC3; 11: UPEC4; 12:UPEC5; 13:UPEC8 y 14:UPEC14. **B) Búsqueda de MOB F12:** Carriles: 1: DEC-17; 2: DEC-17.4; 3: DEC-18.2; 4: DEC-25.2; 5: DEC-25.3; 6: DEC-31.3; 7: UPEC19; 8: UPEC20; 9: UPEC21; 10: UPEC22 y 11: UPEC23. **C) Búsqueda de MOB Qu.** C+: Cepa CR135. Carriles: 1: DEC-25.2; 2: DEC-25.3; 3: DEC-31.3; 4: UPEC8 y 5: UPEC14.



**Figura 33. Gráfica con la prevalencia de familias de relaxasas encontradas en las bandas plasmídicas de las cepas de estudio.** Familias MOB F12, MOB P12, MOB P13 y MOB Qu fueron las más prevalentes para ambos ceparios (aparecen en recuadros).

Finalmente se realizó la búsqueda de los Sistemas de Adicción Plasmídicos (SAP), observando que los prevalentes en las cepas de portadores fueron *ccdAB* con el 77% (n=28/36), *pndAC* 75% (n=27/36) y *pemKI* con el 75% (n=27/36). En las muestras clínicas los SAP prevalentes fueron *ccdAB* (47%, n=16/34), *pndAC* (38%, n=13/34) y *vagCD* (35% n=12/34) (**figura 34**). El sistema *relBE* fue el menos presente con 27.8 % y 20.6% para portadores y clínicas respectivamente. Como se puede observar en la **figura 34** las cepas de portadores tienen un mayor porcentaje de SAPs principalmente *pemKI*, *ccdAB* y *pndAC*. En las **tablas 20 y 21** se resume la caracterización plasmídica por el origen de cepas.



**Figura 34. Porcentaje de sistemas SAP encontrados en las cepas de *E. coli*. De origen fecal (portadores) y urinario (clínico).**

**Tabla 20.** Características de las bandas plasmídicas encontradas en las cepas de *E. coli* aisladas de heces de portadores.

Portadores																	
Cepa	No. Bandas Plasmídicas	Tamaño de bandas plasmídicas (kb)	gen <i>traT</i>	Familia MOB						Sistemas de Adición Plasmídicos							
				F12	P12	P13	P51	Qu	Q11	<i>pemKI</i>	<i>hok-sok</i>	<i>ccdAB</i>	<i>srnCB</i>	<i>vagCD</i>	<i>pndAC</i>	<i>relBE</i>	<i>parDE</i>
DEC-5.2	5	2-10.2															
DEC-6.4	2	5.0-10.5															
DEC-6.6	2	10.5															
DEC-7	1	10.2															
DEC-9.1	2	10.2-10.5															
DEC-9.2	0	x															
DEC-9.3	0	x															
DEC-9.4	3	1.7-10															
DEC-10.3	5	1.5-10.2															
DEC-12	5	1.7-10.5															
DEC-12.1	5	1.2-6.0															
DEC-12.2	5	1.7-10.5															
DEC-12.3	5	1.7-10.5															
DEC-12.4	5	1.7-10.5															
DEC-13.4	3	6.0-10.2															
DEC-17	2	2.5-3.0															
DEC-17.4	3	1.7-10.1															
DEC-18.2	2	2.5-3.1															
DEC-25	6	1.5-20															
DEC-25.1	4	1.5-20															
DEC-25.2	4	1.5-20															
DEC-25.3	3	1.5-20															
DEC-27.4	4	3.5-20															
DEC-31.3	9	1.7-95															
DEC-35	2	1.5-10.6															



UPEC-10	0	X																	
UPEC-11	3	1.7-3.0																	
UPEC-12	5	3.5-4.0																	
UPEC-13	1	10.5																	
UPEC-14	9	1.5-92																	
UPEC-15	2	1.4-5.0																	
UPEC-16	0	X																	
UPEC-17	4	1.4-10																	
UPEC-18	5	1.4-90																	
UPEC-19	1	2																	
UPEC-20	1	10.5																	
UPEC-21	1	3																	
UPEC-22	1	10.5																	
UPEC-23	1	10.5																	
UPEC-24	0	X																	
UPEC-25	0	X																	
UPEC-26	0	X																	
UPEC-27	2	3.0-6.0																	
UPEC-28	4	3.1-6.0																	
UPEC-29	3	2.9-4.0																	
UPEC-30	5	3.1-6.0																	
UPEC-31	1	3.0-4.0																	
UPEC-32	2	3.0-4.0																	
UPEC-33	1	6																	
UPEC-34	1	6																	
UPEC-35	2	3.0-4.0																	
UPEC-36	2	4.0-5.0																	
UPEC-37	3	1.4-90																	
UPEC-38	1	6																	
UPEC-39	3	1.5-5.0																	
UPEC-40	4	1.5-90																	

Cuadros sombreados: Presencia. Cuadros **sin** color: Ausencia.

## 9. DISCUSIÓN

La importancia del estudio de *Escherichia coli* reside en que además de ser un miembro importante de la microbiota fecal, el patotipo extraintestinal o ExPEC es el causante del 90% de las Infecciones del Tracto Urinario. Además, el patotipo diarreogénico o DEC, con sus 6 categorías, es el agente causal de diarrea a nivel mundial principalmente en niños y viajeros. Sumado a esto, es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un miembro de prioridad crítica en su lista de bacterias, por pertenecer al grupo ESKAPE, por presentar resistencia a carbapenémicos y la producción de BLEEs (OMS, 2024; Winstead *et al.*, 2024). Además, al combinarse los factores de virulencia que se encuentran asociados a cada patotipo por mecanismos de transferencia genética horizontal, han aparecido “cepas híbridas” que tienen el potencial de ser más virulentas y agravar la enfermedad del hospedero.

Se trabajaron 80 cepas de *E. coli*; 40 que fueron aisladas de heces de portadores con una edad de 18-80 años y a las cuales se les realizó la búsqueda de genes asociados a patotipos DEC por Méndez-Moreno *et al.*, 2022. En el presente estudio se les determinaron los genes asociados a UPEC para establecer si poseen el potencial de daño urinario, así como determinar si se presentan cepas híbridas heteropatógenas (combinación de factores de virulencia de diferentes categorías DEC) o híbridos-patógenos (combinación de factores de virulencia DEC y UPEC). Los genes más frecuentes encontrados fueron aquellos asociados a adhesinas como *fimH* (100%), sistemas de captación de hierro (*fyuA* 100% e *iucD* 85%), asociados a daño celular como las toxinas *satAP* (5.6%) y genes implicados en la evasión de la respuesta inmune como *traT* (84%).

Se ha reportado que cepas UPEC residen en tracto intestinal de los seres humanos, uniéndose a los enterocitos a través de adhesinas específicas que reconocen receptores sobre las criptas intestinales (Klein & Hultgren, 2020) y para poder diferenciarse de la mayoría de las cepas de *E. coli* comensales o diarreogénicas poseen genes que expresan factores de virulencia que permiten su

transición exitosa del tracto intestinal al tracto urinario cuando encuentran las condiciones adecuadas tanto ambientales como del hospedero para migrar de un sitio a otro (**Lloyd et al., 2007; Sora et al., 2021**). Se ha reportado la combinación de ciertos factores de virulencia que actúan de manera sinérgica, ejemplo, las adhesinas que participan en la adherencia inicial y por lo tanto en la colonización del tracto urinario, la producción de toxinas para inducir el daño al epitelio celular. Posteriormente la expresión de sideróforos que le permiten a la bacteria sobrevivir adquiriendo metales esenciales como el hierro para competir en diferentes nichos y por último aquellos factores que le permiten evadir las defensas del hospedero (**Pokharel et al., 2023**). Otros estudios mencionan que las cepas de *E. coli* capaces de causar ITU deben poseer factores de virulencia asociados al linaje clonal ST131 (cepa ExPEC), como los genes *sat* (toxina secretada por autotransportador), *cnf-1* (factor de necrosis citotóxico), *fimH* (adhesina fimbrial pili tipo 1), *iucD* (aerobactina), *fyuA* (yersiniabactina), *kpsMIII* (variante capsular), *traT* (proteína de resistencia sérica) e *iha* (receptor de enterobactina bifuncional / adhesina) (**Riley et al., 2014; Nicolas-Chanoine et al., 2014**). Esto se compara con los resultados obtenidos en el presente estudio donde se encontró al menos un gen asociado a cada mecanismo de daño como *fimH* (adhesina), *fyuA* e *iucD* (captación de hierro), *satAP* y *vatAP* (daño celular) y *traT* (evasión de la respuesta inmune) en las cepas de origen de heces, lo que sugiere el potencial uropatógeno que estas cepas aisladas de heces de portadores pueden tener, ya que en las condiciones favorables para la bacteria, como inmunosupresión del huésped pueden expresar estos genes y colonizar otros nichos, en este caso, vías urinarias.

En el estudio realizado por **Spurbeck et al.**, en el **2012** se describe un conjunto de cuatro genes de factores de virulencia, *yfcV* (subunidad principal de una supuesta fimbria chaperona), *vat* (toxina vacuolizante), *fyuA* (yersiniabactina) y *chuA* (proteína de unión al grupo hemo) que son genes frecuentemente asociados con cepas de *E. coli* uropatógena. Los autores mencionan que el gen *fyuA* en combinación con al menos dos factores de virulencia,

*vat*, *chuA* o *yfcV* es predictivo para asociar el potencial urovirulento de cepas UPEC con cepas comensales. Si bien en el presente todas las cepas de portadores fueron positivas para el gen *fyuA*, solo dos de ellas (DEC-17 y DEC-25.2), muestran la combinación de genes de *fyuA* y *vat*; sería interesante buscar los otros genes asociados a la virulencia de UPEC en las cepas, para tener un perfil de caracterización más amplio y certero del potencial uropatógeno que las cepas DEC puedan tener.

Muchos de estos factores de virulencia suelen estar codificados en Islas de Patogenicidad (PAI) y al encontrarse en diferentes cepas de *E. coli* nos ayuda a inferir el potencial patógeno que estas pueden poseer, debido a que se encuentran ausentes en las cepas comensales. Las PAI que se buscaron en las 40 cepas de *E. coli* de portadores han sido previamente reportadas en genomas de *E. coli* ExPEC (UPEC) (**Sabaté et al., 2006**). El 67% presentó al menos 1 PAI, la predominante fue la PAI IV<sub>536</sub> (67%) que se ha relacionado con la presencia del sideróforo yersiniabactina (*fyuA*), la segunda más frecuente fue la PAI II<sub>CFT073</sub> (7.5%), relacionada con los genes de fimbrias P y genes reguladores de hierro (**Sarowska et al., 2019**). Estos resultados se comparan con lo reportado por Sabaté et al., 2006 donde a partir de 50 cepas de *E. coli* comensales, el 40% tuvo alguna PAI, siendo también la más prevalente la PAI IV<sub>536</sub> con un 38% (**Sabaté et al., 2006**). **Ballesteros-Monrreal et al., 2021** también reportó que cepas clínicas aisladas de orina de mujeres que cursaban con ITU, la presencia de PAI IV<sub>536</sub> como la más prevalente con un 72 %, seguida de PAI II<sub>CFT073</sub> (48%) y PAI I<sub>J96</sub> (48%); así también en los aislados de muestras de orina en el estudio de **Cortez De la Puente, 2020**, las PAIs I<sub>CFT073</sub> y II<sub>CFT073</sub> fueron las más prevalentes (39% y 33%) y la PAI II<sub>J96</sub> en un 4%. Lo cual nos indica la distribución de Islas de Patogenicidad características de UPEC presentes en aislados comensales del tracto gastrointestinal. Según los resultados obtenidos en la búsqueda de genes asociados a UPEC en las muestras de portadores, se considera que las cepas de *E. coli* tienen el potencial de causar daño a nivel intestinal y otras a nivel urinario, por lo cual se consideran como

patotipos heteropatógenos e híbridos-patógenos respectivamente. Cuando se presente una disbiosis en los hospederos sanos, los patotipos tanto DEC como ExPEC encuentran las condiciones favorables para expresar factores de virulencia que causan infección y posteriormente una enfermedad. Esto se agrava en aquellos hospederos cuyo sistema inmunológico está comprometido, como las personas en los extremos de la vida (bebés y adultos mayores), embarazadas, diabetes, pacientes con cáncer y coinfecciones (por ejemplo, VIH-SIDA).

A las 40 cepas se les buscaron genes asociados a patotipos diarreogénicos, de las cuales 14 se consideraron como patotipos híbridos (35%); siendo los más prevalentes UPEC/EAEC (*aggR* y *aaiG*) (15% n=6/40), seguido del patotipo UPEC/EAEC/ETEC (12.5%, n=5/40). El primer reporte de una cepa híbrida UPEC/EAEC fue en 1991 en un estudio usando cepas de *E. coli* multirresistentes que fueron EAEC O78:H10 y que provocaron un brote de infección de tracto urinario en Copenhague, Dinamarca (**Olesen et al., 2012**). En los últimos años se han estudiado las propiedades del patotipo diarreogénico EAEC para causar infecciones extraintestinales, donde se ha buscado y descrito características de adhesión principalmente del patrón de Adherencia Agregativa (AA) en células epiteliales y/o la presencia de genes asociados a EAEC en diferentes colecciones de cepas de *E. coli* que causan ITU (**Schüroff et al., 2021**).

En un estudio realizado en Brasil por **Abe et al., 2008** se reportaron a partir de 225 cepas de UPEC aisladas de pacientes con ITU sintomática, 16 cepas con un patrón de AA, la secuencia *aata* (complejo de proteína transportadora de dispersina) así como el gen *aggR* que definen al patotipo EAEC. Recientemente **Moazeni et al., 2024**, de 202 cepas UPEC, 9 de ellas portaban *aggR* y el plásmido pCVD432 de EAEC o ambas, por lo cual fueron consideradas como híbridas UPEC/EAEC, de las cuales estaban relacionadas principalmente con el grupo filogenético E (66.6%).

En cambio, en el presente estudio las cepas con patotipos híbridos UPEC/EAEC solo 2 poseen al grupo filogenético E (33.3%), seguido de B2 (2,

33.3%) y B1 (2, 33.3%), del mismo modo se determinó la presencia de PAI por **Moazeni et al., 2024** donde todas las cepas híbridas portaban PAI IV<sub>536</sub> y se encontraron PAI II<sub>536</sub> y PAI I<sub>CFT073</sub> en 3 (33,3%) y 1 (11,1%) cepas híbridas. Contrario a lo reportado en nuestro estudio, donde solo dos cepas híbridas poseen a la PAI IV<sub>536</sub> (UPEC 27 y UPEC 39).

Estos hallazgos pueden ser debido a que el patotipo EAEC se ha aislado de heces de hospederos asintomáticos (sin diarrea), por lo que resulta lógico que se compartan los factores de virulencia de los distintos patotipos (ExPEC y DEC), debido a la presencia de EAEC en el intestino, ocasionando así una infección urinaria en condiciones favorables para la bacteria; adicionalmente, las investigaciones se centran en el estudio del plásmido de adherencia agregativa de EAEC (pAA) que puede circular en diferentes genomas de *E. coli*, incluyendo genes de virulencia asociados a causar infecciones extraintestinales (**Nunes et al., 2017; Nascimento et al., 2022; Luiz et al., 2024**).

En otro estudio realizado en Irán por **Salmani et al., 2016** a partir de 50 cepas de *E. coli* causantes de ITU, se detecta el gen *aggR* (23%), así como también las toxinas LT y ST del patotipo ETEC en 2 cepas de orina y la combinación de genes LT y *aggR* en 3 cepas. Esto coincide con los resultados encontrados en el presente trabajo y evidencia la distribución de diferentes factores de virulencia pertenecientes a patotipos de *E. coli* en cepas de diferente origen. En nuestro estudio de las 80 cepas, se detectaron patotipos híbridos en el 28.75% (n=23/80); 4 patotipos híbridos-patógenos aislados de muestras de heces de portadores (aEPEC/UPEC; aEPEC/ETEC/UPEC; aEPEC/DAEC/UPEC; ETEC/UPEC) y la cepa DEC-25.2 identificada por bioinformática como híbrido patógeno (ExPEC-DEC; aEPEC/ETEC/UPEC), además las identificadas como heteropatógenas por **Méndez-Moreno et al., 2022** (aEPEC/ETEC, aEPEC/DAEC, aEPEC/ETEC/DAEC) y 5 aislados de muestras de orina (UPEC/aEAEC; UPEC/EAEC/ ETEC; UPEC/aEAEC/EPEC; UPEC/EAEC y UPEC/ETEC), además de 2 cepas

identificadas mediante análisis bioinformático como patotipos heteropatógenos (DEC-36.3 y DEC-36.4).

Como se ha mencionado con anterioridad al compartirse distintos factores de virulencia en las cepas de estudio, el potencial bacteriano para causar daño en el hospedero aumenta, pudiendo desencadenar una enfermedad más complicada de eliminar, por lo que también el tratamiento antibiótico a administrar puede ser menos efectivo. Debido a esto para el caso de las cepas de origen fecal (portadores), previamente se les determinaron los genes de resistencia asociados a la producción de BLEE por **Méndez-Moreno et al., 2022**, indicado previamente en la tabla 1 de la sección de materiales y métodos. Por lo que en el presente estudio se realizó la búsqueda de genes asociados a resistencia a fluoroquinolonas y aminoglucósidos considerados como antibióticos no BLEE usados como primera línea de defensa contra las enfermedades causadas por *E. coli*. Los resultados obtenidos para las muestras de portadores muestran una alta prevalencia en la búsqueda del gen *aac-(6')-Ib-cr* (85%, n=34/40) lo cual coincide con el resistotipo de las cepas en estudio, donde se observa un alto porcentaje de resistencia para aminoglucósidos (GM: 100%; AMK 45%) y quinolonas (CIP: 65.7%; NAL: 70.2%). Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por **Cortés-Cortés, 2016**, donde se identifica este gen de resistencia en cepas de *E. coli* aisladas de voluntarios sanos; además estas cepas productoras de BLEE y resistentes a fluoroquinolonas y aminoglucósidos se asignaron al filogrupo A, que según la clasificación de **Clermont et al., 2013**, se atribuye a cepas comensales, sin embargo en nuestro estudio se asignaron en su mayoría al grupo filogenético B2 (44%, n= 15/34), seguido del grupo A (17%, n=6/34), lo cual evidencia la alta prevalencia de multidrogorresistencia por parte de *Escherichia coli*, aun cuando el hospedero no presenta síntomas característicos asociados a una enfermedad causada por la bacteria.

Además, existe una correlación entre la presencia de los genes *aac-(6')-Ib-cr* y *qnrB* (n=11/40, 27.5%), este resultado es mayor a los hallazgos de **Kariuki et al., 2023**, donde a partir de muestras de heces obtenidas en Kenia se identificó el

co-transporte de *qnrB* con *acc-(6')-lb-cr* en 12 de 188 cepas de *E. coli* que corresponde a un 6,4%.

Del mismo modo en un estudio realizado en Bolivia en 2017, se buscaron los genes de la bomba de eflujo *oqxAB*, siendo la primera detección de *E. coli* portadora de *oqxAB* en América Latina aisladas de muestras clínicas (orina, sangre e infecciones de oído) (**Saba et al., 2017**). En nuestro estudio se obtuvieron aislados positivos para *oqxA* (42.5%, n=17/40); sin embargo, en estas cepas aisladas de heces de portadores sanos del presente estudio, solo una cepa porta *oqxAB*, junto con el gen *aac-(6')-lb-cr* (DEC-9.4). Este es un hallazgo relevante ya que la cepa al poseer diferentes mecanismos moleculares incrementa la resistencia a fluoroquinolonas principalmente al ciprofloxacino, lo cual dificulta el tratamiento.

En el caso de las muestras clínicas de orina se realizó la búsqueda de siete genes BLEE en las 40 cepas de origen clínico donde se obtuvieron los más altos porcentajes para el gen *bla<sub>TEM</sub>* (90%, n=36/40), seguido de *bla<sub>CTXM1-8</sub>* (57.5%, n=23/40); estos resultados son similares a un estudio realizado en Egipto por **Hassuna et al., 2020**, donde a partir de 134 aislados de *E.coli* productoras de ITU en la comunidad, el gen BLEE más predominante fue *bla<sub>TEM</sub>* encontrado en 60 aislamientos (75%), seguido del gen *bla<sub>CTX-M</sub>* que encontró en 45 aislamientos (56%), donde el grupo M1 fue encontrado en 22 aislados, el grupo M2 en 12 aislados, M8 en 10 aislados y un aislado en el grupo M9 (**Hassuna et al., 2020**). En otro estudio realizado por **Jena et al., 2017**, en 112 aislados de *E. coli*, se encontró que los 46 aislados de *E. coli* productores de BLEE tenían al menos un gen *bla*. El *bla<sub>TEM</sub>* fue el predominante (93,47%) seguido de *bla<sub>CTX-M</sub>* (82,6%) y *bla<sub>SHV</sub>* (4,34%).

Estos datos resultan alarmantes debido a que el gen *bla<sub>TEM</sub>* confiere resistencia a ampicilina, penicilina y cefalosporinas de primera generación como cefalotina, así también las enzimas CTX-M a las cefalosporinas en especial a la cefotaxima y a la ceftriaxona y poseen poca capacidad de hidrolizar la ceftazidima

y cefepime, antibióticos  $\beta$ -lactámicos usados normalmente en la clínica (**López-Velandia et al., 2016; Whelan et al., 2023**).

En el genotipo de resistencia asociado a los antibióticos aminoglucósidos y quinolonas se obtuvo una alta prevalencia del gen *oqxA* (47.5%, n=19/40), pero en ningún aislado se identificó a *oqxB*, en diferentes estudios existe la baja prevalencia de *oqxAB* en *E. coli* de origen humano, sin embargo, en aislados de heces de animales es común encontrar estos genes de bomba de eflujo; el primer reporte se generó en 2004 en el plásmido pOLA52 en *E. coli* del estiércol porcino en Dinamarca (**Hansen et al., 2004**), así como también en un estudio epidemiológico realizado en China donde a partir 172 cepas de *E. coli*, el gen *oqxAB* se detectó en el 46,3% de los aislamientos de cerdos, el 13% de pollos, el 43,9% del entorno de granjas (muestras ambientales) y el 30,3% de trabajadores agrícolas (heces de humano) (**Zhao et al., 2010; Chen et al., 2012; Li et al., 2019**).

De igual manera, de acuerdo con lo reportado por **Carattoli, 2009**, es común encontrar una correlación entre cepas productoras de *bla*<sub>CTX-M1-2-3</sub> con el gen *aac-(6')-Ib-cr*, lo cual concuerda con los resultados de nuestro estudio (11.25%, n=9/80). Así como también con lo reportado por **Saba et al., 2017** en Bolivia, donde 64 muestras de *E. coli* albergaban el gen *aac-(6')-Ib-cr* y a su vez el grupo *bla*<sub>CTX-M1</sub> y pertenecían al grupo filogenético B2, lo cual también sugiere la distribución geográfica de estos genes implicados en la alta resistencia a antibióticos. En el presente estudio se encontró también una correlación entre los genes PMQR, *aac-(6')-Ib-cr* y *qnrB* (16.25%, n=13/80) y los genes *aac-(6')-Ib-cr* y *oqxA* (21.25%, n=17/80). Otro estudio donde se comparten estos resultados es en lo obtenido por **Gallegos-Miranda et al., 2020**, donde a partir de muestras de orina aisladas de diferentes hospitales de Sonora, México se obtuvo una prevalencia en la producción de BLEE del grupo CTX-M1 en correlación con el gen *aac-(6')-Ib-cr* y *qnrB* (13.33%, n=6/45). Todo esto indica la importancia de identificar los mecanismos de resistencia de las cepas circulantes de *E. coli* en la comunidad para poder transmitir y aplicar

las medidas necesarias en los diferentes centros de salud para el tratamiento y control adecuado de las enfermedades producidas por los patotipos de *E. coli*.

El poder estudiar y analizar a profundidad las características genotípicas de patogenicidad de las cepas de *E. coli* nos dará un indicio del comportamiento que estas pueden tener en el hospedero, por lo que se realizó la secuenciación y el análisis por genómica comparativa de 3 cepas de origen fecal (portadores) (DEC-25.2, DEC-36.3 y DEC-36.4) seleccionadas por ser cepas híbridas y dos de ellas aisladas del mismo paciente. El genoma de DEC-25.2 presentó una identidad del 100% con el genoma UMN026 que está clasificado como ExPEC que se recuperó de muestras de orina.

Del mismo modo el genoma fue analizado en la plataforma BV-BCR, comparándolo con otros genomas previamente reportados, dando un 99% de similitud con el genoma GN04592 (No. Acceso CP095538), aislada del torrente sanguíneo de un humano, además mediante el análisis filogenético, el genoma de DEC-25.2 se agrupó en clados cercanos al genoma ExPEC, APEC (*E. coli* patógeno aviar) considerado como ExPEC con un 97% de similitud, así como también en un clado cercano al genoma del patotipo DEC, EPEC (*E. coli* enteropatógena) con un 96% de similitud.

En lo que respecta al análisis del serotipo se encontró que DEC-25.2 pertenece a ST69, este ST ha sido previamente reportado en cepas clínicas asociadas a infecciones urinarias y sanguíneas (**Doumith et al., 2015**). Sin embargo, **Matsui et al., 2020** muestran una amplia distribución de ST69 entre cepas recuperadas de heces de donantes sanos y de pacientes con infección urinaria. Los factores de virulencia reportados para DEC-25.2 fueron que alberga *fimH27*, este se ha descrito en aislados de orina y sangre humana (**Liu et al., 2018**). En un estudio anterior, **Barrios-Villa et al., en 2020** reportaron la presencia del alelo *fimH27* en cepas ExPEC pertenecientes al patotipo AIEC, así como en genomas EIEC y K12. En este estudio también de Barrios-Villa detectaron la presencia de genes

implicados en la captación de hierro, fimbrias, adhesinas no fimbriales y toxinas implicadas en la patogenicidad de *E. coli*.

Los genes de virulencia comunes en los 3 genomas secuenciados en el presente trabajo fueron *fimH* (fimbrias de tipo 1), *iucC* (aerobactina sintetasa), *iutA* (receptor férrico de aerobactina), *iha* (proteína de adherencia), *traT* (proteína de la membrana externa implicada en la resistencia al complemento) y *hlyE* (hemolisina de *E. coli* patógena aviar). También presentan genes homólogos presentes en otros géneros como *eilA* (regulador de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella*, del homólogo HilA de *Salmonella*) y *shiB* (captación de la vía de Shikimato, homólogos del gen *shiA* de la isla de patogenicidad SHI-2 de *Shigella flexneri*), que pueden representar un importante mecanismo de transferencia horizontal de genes entre enterobacterias que coexisten en el hospedador, lo cual sugiere que los signos y síntomas pueden ser más graves, complicando la enfermedad. El genoma de DEC-25.2 mostró determinantes genéticos de resistencia a fluoroquinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas, carbapenemasas y cefalosporinas. Basándose en la tipificación de replicones, Plasmid Finder arrojó cuatro grupos de incompatibilidad de plásmidos en el genoma de DEC-25.2 [Col(pHAD28), IncFIB, IncF11, IncI1-I]. Se ha informado anteriormente de plásmidos con Col(pHAD28) en cepas de *Salmonella* obtenidas de muestras de granjas lecheras en México y de aves de corral en Nigeria (**Barrera et al., 2023; Jibril et al., 2012**); así como también fue reportado en una cepa UPEC filogrupo D, serotipo O23:H4 que fue aislada de muestra clínica en Egipto (**Zacaria et al., 2021**). Estos plásmidos han sido reportados en cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Cronobacter sakazakii* y *E. coli* portadoras de genes de resistencia a aminoglucósidos (**Shelenkov et al., 2023; Mousavi et al., 2023**). Por otro lado, los plásmidos IncFIB, IncF11 e IncI1-1 son los más comunes en *E. coli*; estos grupos de incompatibilidad se han reportado tanto en plásmidos conjugativos como móviles y debido a estas características pueden diseminar más fácilmente determinantes que contribuyen a la patogenicidad de *E. coli*, ya que estos plásmidos suelen albergar genes de resistencia principalmente

codificantes para BLEE (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub> y *bla*<sub>CTX-M-1</sub>) y determinantes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos (*aac*-(6')-*Ib-cr*) y enzimas modificadoras de aminoglucósidos (incluyendo *aadA2*, *aadA5*) y varios genes *tet*, *sul* y *dfr*. Además de estar relacionados con los complejos clonales de *E. coli* ST131 y ST410, dos clones de *Escherichia coli* patógena extraintestinal (ExPEC) (**Rozwandowicz et al., 2018; Pitout et al., 2023**). El genoma de DEC-25.2 muestra características que corroboran su clasificación como cepa “híbrida”, específicamente como “patógeno-híbrido” (combinación de factores de virulencia ExPEC con DEC).

Por otro lado, del análisis de los genomas DEC-36.3 y DEC-36.4, aislados de heces del mismo portador, se encontró que el ensamblaje DEC-36.3 mostró un 99.97% de identidad con el genoma KE58 (número de acceso CP141075.1) recuperado de una muestra de orina en Dallas, Texas de una paciente con infecciones recurrentes del tracto urinario, este hallazgo es interesante debido a que Sonora (donde se aislaron las muestras) tiene frontera con Estados Unidos. Estas relaciones en la identidad de los genomas entre cepas pueden deberse a la alta migración que existe, ocasionando que los pacientes portadores de *E. coli* transmitan la bacteria en diferentes regiones. Otra cepa con un 99,97 % de identidad fue ETEC6329F (número de acceso CP122609.1) documentada como ETEC como nuestro aislado (**Méndez-Moreno et al., 2022**). Por otro lado, el genoma de DEC-36.4 tuvo un 99,97% de identidad con 184/2aE (número de acceso CP072858.1), una cepa de *E. coli* aislada en Brasil a partir de las heces de un viajero que regresaba del África subsahariana.

Del mismo modo en el análisis en la plataforma BV-BCR se obtuvo un 99% de similitud para los genomas DEC-36.3 y DEC-36.4 analizados, con un genoma obtenido de una cepa aislada de un hisopado rectal (No. acceso CP051716). En el análisis filogenético estos genomas se agruparon en clados cercanos a patotipos DEC, en específico a ETEC, como fue previamente reportado por **Méndez-Moreno et al., 2022**, dando un 99% de similitud en los alineamientos realizados (Proksee).

Los análisis *in vitro* por PCR fueron positivos para LT (EPEC) y la adhesina *daaE* del patotipo DAEC según lo reportado por **Méndez-Moreno et al., 2022**, sin embargo, estos genes no fueron encontrados en el análisis bioinformático, por lo cual se sugiere que la información de estos genes pudo perderse del genoma cuando se realizó la eliminación de veinticuatro contigs debido a que tenían menos de 200 pb de longitud; inclusive por los *gaps* (se producen cuando las sondas no pueden diseñarse para una porción determinada de una región objetivo) que se generan por la secuenciación de tipo illumina. Así mismo, se sugiere la utilización de otros análisis como secuenciación de molécula sencilla, secuenciación de *long reads*, con el fin de poder cerrar el genoma y obtener resultados más certeros o inclusive un análisis de *primerwalking* (implica el diseño de cebadores basados en información de secuencia obtenida previamente para secuenciar tramos largos de ADN) con el fin de poder eliminar esos *gaps* generados por la secuenciación.

Con base en el análisis filogenético se realizó un alineamiento con el genoma de la cepa UPEC-CFT073 donde para ambos genomas (DEC-36.3 y DEC-36.4) se obtuvo un 96% de similitud. Por otra parte, DEC- 36.3 y DEC-36.4 pertenecen a la ST4238 que fue notificada por primera vez en 2014 en una cepa aislada de un niño con diarrea e identificada como EPEC en Colombia (**Guerra et al., 2014**). El alelo *fimH54* encontrado para ambos genomas DEC-36.3 y 36.4, ha sido reportado a partir de *E. coli* aislada de muestras diarreicas humanas identificadas como patotipos híbridos aEPEC/ExPEC (**Díaz-Jiménez et al., 2020**). Asimismo, otros autores han asociado *fimH54* con cepas APEC (**Jørgensen et al, 2019; Hayashi et al, 2019**). Esta variabilidad antigénica de la fimbria encargada de adherirse a residuos manosiados de las células sombrilla de la vejiga podría tener importantes implicaciones en la colonización de diferentes microambientes y/o hospederos, haciendo que estas cepas sean capaces de causar diferentes infecciones o alojarse en diferentes hospederos y a su vez, tengan mayor eficiencia de diseminación. Los genomas DEC-36.3 y DEC-36.4 presentaron genes asociados a la resistencia a fluoroquinolonas, macrólidos, aminoglucósidos, cefalosporinas, tetraciclinas,

nitroimidazol y fenicol. Además, se ha informado que el plásmido IncB/O/K/Z encontrado en los genomas secuenciados podría estar distribuido tanto en cepas de origen clínico como alimentario de la familia *Enterobacteriaceae*, tal y como informan **Balbuena-Alonso et al., 2022**, y también se reporta que porta genes de resistencia a azitromicina en cepas de *K. pneumoniae*, lo que coincide con nuestros resultados, sugiriendo que este plásmido se distribuye dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (**Yang et al., 2022**). Por todo este análisis de los genomas de DEC-36.3 y DEC-36.4 reportamos que estas cepas deben considerarse híbridas específicamente como *E. coli* heteropatógenas.

Como se trabajó con cepas de *E. coli* aisladas de diferentes orígenes, se realizó una ERIC-PCR para conocer si existía una relación filogenética entre estas. A pesar de que las cepas se agruparon en 16 clados diferentes, hubo clados donde se agruparon cepas de ambos orígenes (C12 y C16), donde también se agruparon las cepas híbridas, en su mayoría en los clados 14, 7 y 16. Este análisis permitió observar relaciones filogenéticas entre las cepas de origen fecal y urinario y apoya la presencia de cepas híbridas que comparten características y factores de virulencia que provienen de los dos patotipos DEC y ExPEC. También los resultados de la filogenia apoyan la hipótesis de que el origen de las cepas ExPEC es a partir de cepas comensales que adquirieron factores de virulencia por mecanismos de transferencia genética horizontal (conjugación, transformación y transducción). Alternativamente los patotipos DEC pudieron cursar el mismo proceso adquiriendo genes ExPEC (**Manges et al., 2019; Desvaux et al., 2020**).

Como se ha mencionado la diseminación del material genético entre bacterias, se da en su mayoría por elementos genéticos móviles, principalmente los plásmidos, que participan en el mecanismo de conjugación, estos plásmidos suelen clasificarse en móviles, conjugativos y no móviles, por lo que se realizó el análisis del perfil plasmídico en las cepas de estudio. En ambos ceparios, entre el 85 y 90% de las cepas presentaron de 1 a 9 bandas plasmídicas, con pesos que van de 1.5 a 95 kbs. Sin embargo, debido a que los plásmidos pueden tener diferentes

conformaciones y en el estudio solo se realizó mediante extracción por lisis alcalina, para obtener resultados más certeros se sugiere realizar el perfil plasmídico por un método de mayor especificidad para la detección del peso y número de plásmidos como la electroforesis en gel de campo pulsado con la enzima S1 (PFGE-S1).

Adicionalmente, para caracterizar a los plásmidos, se hizo la búsqueda de los genes *traT*, que además de estar implicados en la evasión de la respuesta inmune, juegan un papel importante como lipoproteína de la membrana externa expuesta a la superficie celular de los plásmidos conjugativos, ya que su función radica en la prevención del autoacoplamiento de células que portan plásmidos conjugativos idénticos o estrechamente relacionados, mediante el bloqueo de la formación de agregados de apareamiento estables (**Frankel et al., 2023; Sukupolvi et al., 1990**). El 80% y 58% de las cepas de portadores y clínicas respectivamente dieron positivas en la búsqueda de los genes *traT*.

Los genes *mob* que codifican a las proteínas relaxasas, son componentes importantes de los relaxosomas tanto en los plásmidos conjugativos como en los movilizables, donde la familia MOB-F es la más común en enterobacterias, asociadas habitualmente a plásmidos conjugativos de bajo número de copias y tamaños aproximados de 45-200kb (**Rozwandowicz et al., 2018**). Sin embargo, en el presente estudio se obtuvo un alto porcentaje de plásmidos pertenecientes a las familias MOBP12 también presente en plásmidos conjugativos, (94% y 100%) y P13 (83% y 67%) para las cepas de portadores y clínicas respectivamente. La familia MOB-F12 se encontró en un 72% para muestras de portadores y un 35% para muestras clínicas y la familia MOBQ (*mob<sub>Qu</sub>*) correspondiente a plásmidos movilizables, se obtuvieron porcentajes del 72% y 59% para portadores y clínicas respectivamente. **Barrios-Villa et al., 2018** reportó a partir de 4 cepas de portadores sanos que las relaxasas presentes fueron MOB-F11 (100%), seguido de MOB-Q12, MOB-Q11, MOB-P51. Así como también previamente, **Ixtapan-Tejeros (2018)** reportó la presencia de la relaxasa MOBF12 (47%) en cepas UPEC aisladas de muestras clínicas, del mismo modo en la caracterización de este cepario **Cortez de**

**la Puente, 2020**, encontró la presencia de las relaxasas MOB-Q12 (12%), MOB-Qu (8%) y MOB-Q11 (2%). Con estos resultados podemos observar la alta distribución principalmente de las familias MOB-P, MOB-F y MOB-Q en cepas de *E. coli*, considerando que los plásmidos encontrados tienen la capacidad de ser móviles y conjugativos independientemente del origen.

En la caracterización plasmídica también se realizó la búsqueda de los sistemas de adicción plasmídicos (SAP), principalmente los de tipo II, conocidos como toxina-antitoxina (TA) ya que parecen ser los más abundantes en los genomas bacterianos, y está fuertemente representada en elementos genéticos móviles como plásmidos y fagos, pero también en cromosomas bacterianos (**Fraikin et al., 2020**). Los SAP más frecuentemente encontrados en las cepas de estudio fueron *ccdAB* (77% y 47%), *pndAC* (75% y 38%), *pemKI* (75% y 29%), *srnCB* y *parDE* (36% y 32%), para portadores y clínicas respectivamente. Estos resultados son similares con lo obtenido por **Cortes Cortes, 2016** donde a partir de 11 cepas de muestras de heces los SAP más prevalentes fueron *pemKI* (81%), *srnBC* (90%), *ccdAB* (81%) y *vagCD* (54%).

Como se puede observar, las cepas de portadores tienen un mayor porcentaje de SAPs principalmente *pemKI*, *ccdAB* y *pndAC*, a pesar de que estas cepas fueron aisladas de heces de voluntarios sin sintomatología asociada a la patogénesis de *E. coli*, hay que considerar que estos sistemas fueron los primeros descritos en la bacteria, por lo que encontrarlos en más alto porcentaje en este origen no necesariamente este asociado con la virulencia, si no que el reservorio de *E. coli* es el intestino, estos sistemas se han descrito además de ayudar a la permanencia del plásmido, en respuesta al estrés bacteriano (formación de biopelícula y tolerancia al calor), así como también tolerancia a antibióticos y módulos de defensa de fagos, además se ha descrito que los TA de tipo II influyen en la supervivencia intracelular bacteriana dentro de las células epiteliales, (**Qiu et al., 2022; Boss et al., 2023; Bustamante et al., 2024**).

El sistema *ccdAB* fue el primer descrito en el plásmido IncF de *E. coli* y está implicado en el mantenimiento de material genético, en cromosomas bacterianos parece estar involucrado en la respuesta al estrés bacteriano induciendo la producción de biopelículas, junto con *pemKI* descrito en cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Kamruzzaman *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2020). Por lo cual resulta lógico que sean los prevalentes en las cepas de estudio, debido a que se encuentran distribuidos en la familia de enterobacterias. El sistema *parDE* también se ha descrito que mediado por plásmidos y participa en la tolerancia a los antibióticos y al calor en *E. coli* (Kamruzzaman *et al.*, 2019).

En el presente estudio se realizó la caracterización de cepas de *E. coli* aisladas de dos distintos orígenes, heces de portadores y orina de mujeres con infección en tracto urinario, donde se encontraron cepas híbridas patógenas con genes de resistencia a antibióticos principalmente a  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas, así como también la caracterización de elementos genéticos móviles como plásmidos implicados en la transferencia de material genético entre las bacterias. Además, mediante las herramientas de análisis bioinformático y genómica comparativa de las cepas, se logró conocer más el contenido genético de estas cepas de *E. coli* de portadores circulantes en la comunidad. Por lo que la presente investigación nos revela información importante que apoya seguir realizando una vigilancia epidemiológica enfocada al estudio de cepas obtenidas a partir de diferentes hospederos.

## 10. CONCLUSIONES

- 1) Se encontraron cepas de *E. coli* heteropatógenas e híbridas patógenas aisladas tanto de orina de pacientes con ITU como de heces de portadores.
- 2) Las cepas en estudio (portadores y clínicas) tienen una relación filogenética independiente de su origen.
- 3) Se sustenta con los resultados obtenidos el origen fecal de las cepas extraintestinales.
- 4) Se identificaron genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTXM1</sub>, así como genes NO-BLEE de resistencia a los principales antibióticos utilizados en la clínica como son beta-lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos.
- 5) Se encontró una correlación entre *bla*<sub>CTX-M1</sub> y el gen *aac-(6')-Ib-cr*, lo que evidencia la importancia epidemiológica y de un adecuado tratamiento para evitar una co-selección de resistencia.
- 6) Destaca la importancia epidemiológica al residir en que al presentarse una disbiosis en la microbiota, las cepas híbridas pueden desencadenar una enfermedad más grave en intestino y/o en nichos extraintestinales debida a la combinación de diferentes factores de virulencia pertenecientes a los diferentes patotipos de *E. coli*.
- 7) Se encontraron plásmidos con características de ser potencialmente movilizables y conjugativos, por lo que son capaces de diseminar genes de virulencia y/o resistencia entre cepas de *E. coli*.
- 8) Se reporta una alta prevalencia de sistemas toxina-antitoxina previamente reportados que pueden estar relacionados con la capacidad de “permanencia” de estos elementos genéticos en la bacteria y/o con la capacidad de presentar multiresistencia antibiótica y alta virulencia.

## 11.PERSPECTIVAS

1. Secuenciación de producto de PCR positivo en la amplificación del gen *aac-(6')-Ib-cr* para un resultado más certero en la búsqueda de la variante que presenta resistencia a quinolonas.
2. Determinación de grupo de incompatibilidad plasmídica mediante PBRT: PCR-Based Replicon Typing (Tipificación de Replicones Basada en PCR).
3. Análisis de la transferencia genética horizontal mediante el mecanismo de conjugación.
4. Determinación de otros genes de virulencia de ExPEC (UPEC) a las cepas de portadores como:
  - 3.1. Esquema de Spurbeck: **yfcV** (subunidad principal de una supuesta fimbria chaperona-usher), **chuA** (codifica una proteína de unión al hemo).
  - 3.2. Esquema de Johnson: **papAH** (fimbrias P), **sfa/focDE** (fimbrias S y F1C), **afa/draBC** (adhesinas de unión al antígeno Dr), *iutA* (receptor de aerobactina), **tosA** (adhesina no fimbrial).
  - 3.3. Asociados a la formación de biofilm: fimbrias **uclA** (proteína de subunidad principal), **uclD** (adhesina), **csgA** (subunidad mayor de curli), **csgD** (proteína reguladora de la transcripción del operón CsgBAC), **bcsA** (subunidad catalítica de la sintasa de celulosa).
  - 3.4. Genes implicados en la evasión de la respuesta inmune: **kpsM** (variante capsular).
5. Electroforesis de campos pulsados con la enzima S1, para determinar el perfil plasmídico.

## 12. APORTACIONES

- Estudio y caracterización de cepas de *E. coli* circulantes de portadores.
- Cepas caracterizadas de *E. coli* aisladas de heces de portadores y muestras clínicas aisladas de orina que pueden ser utilizadas como cepas control en próximas investigaciones.
- El aporte de la genómica comparativa de tres cepas de *E. coli* aisladas de heces de portadores, en su identificación como heteropatógenas (2) e híbrida patógena (1).
- Vigilancia epidemiológica en la comunidad de las cepas de *E. coli* multirresistentes a antibióticos.

### 13. REFERENCIAS

- Abe, C. M., Salvador, F. A., Falsetti, I. N., Vieira, M. A., Blanco, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Machado, A. M., Elias, W. P., Hernandez, R. T., & Gomes, T. A. (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS immunology and medical microbiology*, 52(3), 397–406. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00388.x>
- Águila Sánchez, A., Rodríguez, A., Fernández Abreu, A., Cruz Infante, Y., Bravo Fariñas, L., Hernández Martínez, J. L & Bebelagua, D. (2020). *Escherichia coli* diarrogénicos, identificación de patotipos y fenotipos de resistencia antimicrobiana en aislados cubanos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 72(1).
- Alcock, B. P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K. W., Raphenya, A. R., Wlodarski, M. A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S. A., Tsang, K. K., Baker, S. J. C., Dave, M., McCarthy, M. C., Mukiri, K. M., Nasir, J. A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., Kwong, M., ... McArthur, A. G. CARD (2023): expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic acids research*. 2023, 51(D1), D690–D699.
- Alvarado, A., Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2012). A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PloS one*, 7(7), e40438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040438>
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., ... Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Balbuena-Alonso, M. G., Cortés-Cortés, G., Kim, J. W., Lozano-Zarain, P., Camps, M., & Del Carmen Rocha-Gracia, R. (2022). Genomic analysis of plasmid content in food isolates of *E. coli* strongly supports its role as a reservoir for the horizontal transfer of virulence and antibiotic resistance genes. *Plasmid*. 123-124, 102650. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2022.102650>
- Ballesteros-Monrreal, M. G., Arenas-Hernández, M. M. P., Barrios-Villa, E., Juarez, J., Álvarez-Ainza, M. L., Taboada, P., De la Rosa-López, R., Bolado-Martínez, E., & Valencia, D. (2021). Bacterial Morphotypes as Important Trait for Uropathogenic *E. coli* Diagnostic; a Virulence-Phenotype-Phylogeny Study. *Microorganisms*, 9(11), 2381.
- Barrera, S., Vázquez-Flores, S., Needle, D., Rodríguez-Medina, N., Iglesias, D., Sevigny, J. L., Gordon, L. M., Simpson, S., Thomas, W. K., Rodolfo, H., & De Donato, M. Serovars. (2023). Virulence and Antimicrobial Resistance Genes of Non-Typhoidal *Salmonella* Strains from Dairy Systems in Mexico. *Antibiotics* (Basel, Switzerland). 12(12), 1662. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12121662>
- Barrios-Villa, E. (2018). Estudio de la transferencia genética de la resistencia a antimicrobianos en *Escherichia coli* aisladas de diferentes orígenes y genómica comparativa de cepas ST131. Tesis Doctoral.
- Barrios-Villa, E., Martínez de la Peña, C. F., Lozano-Zaraín, P., Cevallos, M. A., Torres, C., Torres, A. G., & Rocha-Gracia, R. D. C. (2020). Comparative genomics of a subset of Adherent/Invasive *Escherichia coli* strains isolated from individuals without inflammatory bowel disease. *Genomics*. 112(2), 1813–1820. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.10.013>

- Barrios-Villa, E., Picón, L. R., Reynaga, R. B., & Arenas-Hernández, M. M. D. L. P. (2023). An updated overview on the resistance and virulence of UPEC. *Trending Topics in Escherichia coli Research: The Latin American Perspective*, 249-276.
- Bartual, S., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M., Wisplinghoff, H., & Rodríguez-Valera, F. (2005). Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4382-4390.
- Bennett, J. E., Dolin, R., & Blaser, M. J. (2020). *Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*. Elsevier Gezondheidszorg.
- Bertelli, C., Laird, M. R., Williams, K. P., Simon Fraser University Research Computing Group, Lau, B. Y., Hoad, G., & Brinkman, F. S. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic acids research*, 2017, 45(W1), W30-W35.
- Bortolaia V, Kaas RF, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, Philippon A, Allesoe RL, Rebelo AR, Florensa AR, Fagelhauer L, Chakraborty T, Neumann B, Werner G, Bender JK, Stingl K, Nguyen M, Coppens J, Xavier BB, Malhotra-Kumar S, Westh H, Pinholt M, Anjum MF, Duggett NA, Kempf I, NykÅsenoja S, Olkkola S, Wiczorek K, Amaro A, Clemente L, Mossong J, Losch S, Ragimbeau C, Lund O, Aarestrup FM. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 75(12),3491-3500
- Bustamante, P., Ramos-Corominas, M. N., & Martinez-Medina, M. (2024). Contribution of Toxin-Antitoxin Systems to Adherent-Invasive *E. coli* Pathogenesis. *Microorganisms*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12061158>
- Boss, L., & Kędzierska, B. (2023). Bacterial Toxin-Antitoxin Systems' Cross-Interactions- Implications for Practical Use in Medicine and Biotechnology. *Toxins*, 15(6), 380. <https://doi.org/10.3390/toxins15060380>
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. (2020) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 10(1):421.
- Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in microbiology*, 3, 110. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>
- Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Aarestrup FM, Hasman H. (2014). PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother*. 58(7) 3895-903.
- Carattoli A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(6), 2227–2238. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>
- Carroll, K. C. (2016). *Microbiología médica*. Editorial McGraw-Hill. Center for Genomic Epidemiology. (2011). <https://www.genomicepidemiology.org/>
- Chávez-Jacobo, Víctor M., Ramírez-Díaz, Martha I., Silva-Sánchez, Jesús, & Cervantes, Carlos. (2015). Resistencia Bacteriana a Quinolonas: Determinantes Codificados en Plásmidos. *REB. Revista de educación bioquímica*, 34(1), 4-9.
- Checa Rojas, A., Orlando Santillan, Andres Andrade-Dominguez (2017, 26 de Octubre) Método: Extracción de ADN plasmídico (Lisis alcalina modificado). Conogasi, Conocimiento para la vida. Fecha de consulta: agosto 6, 2024 Alberto Checa Rojas. (2017). Método: Extracción de ADN plasmídico (Lisis alcalina modificado). Sitio web: <https://conogasi.org/articulos/metodo-extraccion-de-adn-plasmidico-lisis-alkalina-modificado/>
- Chen, X., Zhang, W., Pan, W., Yin, J., Pan, Z., Gao, S., & Jiao, X. (2012). Prevalence of qnr, aac (6')-Ib-cr, qepA, and oqxAB in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and

- the environment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(6), 3423–3427. <https://doi.org/10.1128/AAC.06191-11>
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*. 5(1):58-65. doi: 10.1111/1758-2229.12019. Epub 2012 Dec 24. PMID: 23757131.
- Coluzzi, C., Garcillán-Barcia, M. P., de la Cruz, F., & Rocha, E. P. (2022). Evolution of plasmid mobility: origin and fate of conjugative and nonconjugative plasmids. *Molecular Biology and Evolution*, 39(6), msac115.
- Cortés Cortés, G. (2016). Caracterización de la resistencia antimicrobiana y tipificación molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes hospederos en Puebla, México.
- Cortez de la Puente, I. (2020). Estudio de la virulencia y características de transferencia de material genético en cepas de *E. coli* aislada de infección de tracto urinario. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/10440>
- De Toro, M., Pilar Garcillán-Barcia, M., & De La Cruz, F. (2015). Plasmid diversity and adaptation analyzed by massive sequencing of *Escherichia coli* plasmids. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, 219-235.
- 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, 2065. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02065>
- Dias, R. C. B., Tanabe, R. H. S., Vieira, M. A., Cergole-Novella, M. C., Dos Santos, L. F., Gomes, T. A. T., Elias, W. P., & Hernandez, R. T. (2020). Analysis of the Virulence Profile and Phenotypic Features of Typical and Atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Isolated from Diarrheal Patients in Brazil. *Frontiers in cellular and microbiology*, 10, 144. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00144>
- Díaz-Jiménez, D., García-Meniño, I., Herrera, A., García, V., López-Beceiro, A. M., Alonso, M. P., Blanco, J., & Mora, A. (2020). Genomic Characterization of *Escherichia coli* Isolates Belonging to a New Hybrid aEPEC/ExPEC Pathotype O153:H10-A-ST10 eae-beta1 Occurred in Meat, Poultry, Wildlife and Human Diarrheagenic Samples. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 9(4), 192. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040192>
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G., & Hacker, J. (2002). Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I (536) to PAI IV (536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infection and immunity*, 70(11), 6365–6372. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6365-6372.2002>
- Doumith, M., Day, M., Ciesielczuk, H., Hope, R., Underwood, A., Reynolds, R., Wain, J., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2015). Rapid identification of major *Escherichia coli* sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. *Journal of clinical microbiology*. 53(1), 160–166. <https://doi.org/10.1128/JCM.02562-14>
- Eftekhari, F., PhD, & Seyedpour, S. M., MSc (2015). Prevalence of qnr and aac (6')-Ib-cr Genes in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Imam Hussein Hospital in Tehran. *Iranian journal of medical sciences*, 40(6), 515–521.
- Elgorriaga-Islas, E., Guggiana-Nilo, P., Domínguez-Yévenes, M., González-Rocha, G., Mella-Montecinos, S., Labarca-Labarca, J., ... & Bello-Toledo, H. (2012). Prevalencia del determinante de resistencia plasmídica a quinolonas aac (6')-Ib-cr en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas en diez hospitales de Chile. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(8), 466-468.
- Erjavec M.S. (2019). The Universe of *Escherichia coli*. IntechOpen. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.73717>

- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., & Vargas-Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista chilena de infectología*, 33(4), 438-450.
- Fernández-García, L., Blasco, L., Lopez, M., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T., & Tomas, M. (2016). Toxin-Antitoxin Systems in Clinical Pathogens. *Toxins*, 8(7), 227. <https://doi.org/10.3390/toxins8070227>
- Fraikin N, Goormaghtigh F, Van Melderen L. (2020). Type II Toxin-Antitoxin Systems: Evolution and Revolutions. *J Bacteriol.* 202:10 <https://doi.org/10.1128/jb.00763-19>
- Frankel, G., David, S., Low, W. W., Seddon, C., Wong, J. L. C., & Beis, K. (2023). Plasmids pick a bacterial partner before committing to conjugation. *Nucleic acids research*, 51(17), 8925–8933. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad678>
- Gallegos-Miranda, V., Garza-Ramos, U., Bolado-Martínez, E., Navarro-Navarro, M., Félix-Murray, K. R., Candia-Plata, M. D. C., Sanchez-Martinez, G., Dúran-Bedolla, J., & Silva-Sánchez, J. (2021). ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from health-care institutions in Mexico. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*, 33(2), 122–127. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2020.1861815>
- Gal-Mor, O., & Finlay, B. B. (2006). Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular microbiology*, 8(11), 1707–1719. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00794.x>
- Garza-González, E., Bocanegra-Ibarias, P., Rodríguez-Noriega, E., González-Díaz, E., Silva-Sanchez, J., Garza-Ramos, U., Contreras-Coronado-Tovar, I. F., Santos-Hernández, J. E., Gutiérrez-Bañuelos, D., Mena-Ramirez, J. P., Ramírez-De-los-Santos, S., Camacho-Ortiz, A., & Morfín-Otero, R. (2021). Molecular investigation of an outbreak associated with total parenteral nutrition contaminated with NDM-producing *Leclercia adecarboxylata*. *BMC Infectious Diseases*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-021-05923-0>
- Geurtsen, J., De Been, M., Weerdenburg, E., Zomer, A., McNally, A., & Poolman, J. (2022). Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac031>
- Grant, J. R., Enns, E., Marinier, E., Mandal, A., Herman, E. K., Chen, C. Y., Graham, M., Van Domselaar, G., & Stothard, P. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic acids research*, 51(W1), W484–W492. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad326>
- Green, M. and Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th Edition, Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Griffiths, D., Fawley, W., Kachrimanidou, M., Bowden, R., Crook, D., Fung, R., Golubchik, T., Harding, R., Jeffery, K., Jolley, K., Kirton, R., Peto, T., Rees, G., Stoesser, N., Vaughan, A., Walker, A., Young, B., Wilcox, M., & Dingle, K. (2010). Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(3), 770-778.
- Guamán Gualpa, W. (2020). Evaluación de mecanismos moleculares de resistencia a fluoroquinolonas en cepas de *E. coli* uropatógena en población nativa amerindia kichwa del Ecuador.
- Guerra, J. A., Romero-Herazo, Y. C., Arzuza, O., & Gómez-Duarte, O. G. (2014) Phenotypic and genotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* clinical isolates from northern Colombia, South America. *BioMed research international*, 236260. <https://doi.org/10.1155/2014/236260>
- Hacker, J., & Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual review of microbiology*, 54, 641–679. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.641>

- Hansen, L. H., Johannesen, E., Burmølle, M., Sørensen, A. H., & Sørensen, S. J. (2004). Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(9), 3332-3337.
- Hassuna, NA, Khairalla, AS, Farahat, EM. (2020). Caracterización molecular de *E. coli* productora de  $\beta$  lactamasas de espectro extendido recuperada de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad en el Alto Egipto. *Representante científico* 10 , 2772. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59772-z>
- Hayashi, W., Tanaka, H., Taniguchi, Y., Iimura, M., Soga, E., Kubo, R., Matsuo, N., Kawamura, K., Arakawa, Y., Nagano, Y., & Nagano, N. (2019). Acquisition of mcr-1 and Cocarriage of Virulence Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Municipal Wastewater Influent in Japan. *Applied and environmental microbiology*. 85(22), e01661-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01661-19>
- Henderson, J. P., Crowley, J. R., Pinkner, J. S., Walker, J. N., Tsukayama, P., Stamm, W. E., Hooton, T. M., & Hultgren, S. J. (2009). Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS pathogens*, 5(2), e1000305. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000305>
- Heras, J. C. Domínguez, E. Mata, and V. Pascual. (2015). GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*, 16:270 <http://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>.
- Hong, B. K., Wang, M., Chi, H. P., Kim, E. C., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2009). oqxAB encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), 3582–3584. <https://doi.org/10.1128/AAC.01574-08>
- Huelgas Méndez, D. (2020). Clasificación filogenética, virulencia y resistencia antimicrobiana de *E. coli* aislada de varones con infección de tracto urinario. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/11381>
- Ixtepan Tejero, C. (2018). Características de virulencia, resistencia y transferencia del material genético en cepas de *E. coli* uropatógena. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/8138>
- Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature communications*, 9(1), 5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
- Jauregui, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., Picard, B., Nassif, X., & Brisse, S. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*. 9(1), 560.
- Jena, J., Sahoo, R. K., Debata, N. K., & Subudhi, E. (2017). Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M genes of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in adults. *3 Biotech*, 7(4), 244. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0879-2>
- Jibril, A. H., Okeke, I. N., Dalsgaard, A., Menéndez, V. G., & Olsen, J. E. (2021). Genomic analysis of antimicrobial resistance and resistance plasmids in *Salmonella* serovars from poultry in Nigeria. *Antibiotics*. 10(2), 99.
- Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, Aarestrup FM. (2014). Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxinogenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 52(5) 1501-1510.

- Joensen, K. G., A. M. Tetzschner, A. Iguchi, F. M. Aarestrup, and F. Scheutz. (2015). Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* using whole genome sequencing (WGS) data. *J.Clin.Microbiol.* 53(8):2410-2426.
- 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. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 76(1), 101–109. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390>
- Jørgensen, S. L., Stegger, M., Kudirkiene, E., Lilje, B., Poulsen, L. L., Ronco, T., Pires Dos Santos, T., Kiil, K., Bisgaard, M., Pedersen, K., Nolan, L. K., Price, L. B., Olsen, R. H., Andersen, P. S., & Christensen, H. (2019). Diversity and Population Overlap between Avian and Human *Escherichia coli* Belonging to Sequence Type 95. *mSphere.* 4(1), e00333-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00333-18>
- Kamruzzaman M, Iredell J. A. (2019). ParDE-family toxin antitoxin system in major resistance plasmids of *Enterobacteriaceae* confers antibiotic and heat tolerance. *Sci Rep*;9(1):9872. 10.1038/s41598-019-46318-1
- Kamruzzaman, M., Wu, A. Y., & Iredell, J. R. (2021). Biological Functions of Type II Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria. *Microorganisms,* 9(6), 1276. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061276>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology,* 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kariuki, K., Diakhate, M. M., Musembi, S., Tornberg-Belanger, S. N., Rwigy, D., Mutuma, T., ... & Kariuki, S. (2023). Plasmid-mediated quinolone resistance genes detected in Ciprofloxacin non-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolated from children under five years at hospital discharge, Kenya. *BMC microbiology,* 23(1), 129.
- Kim, H. B., Wang, M., Park, C. H., Kim, E. C., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2009). oqxAB encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy,* 53(8), 3582–3584. <https://doi.org/10.1128/AAC.01574-08>
- Klein, R. D., & Hultgren, S. J. (2020). Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nature reviews. Microbiology,* 18(4), 211–226. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0324-0>
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine,* 6(6), a027029. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>
- Larsen, M., Cosentino, S., Rasmussen, S., Rundsten, C., Hasman, H., Marvig, R., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontón, T., Ussery, D., Aarestrup, F., & Lund, O. (2021). Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology.* 50(4), 1355-1361.
- Lemee, L., Dhalluin, A., Pestel-Caron, M., Lemeland, J., & Pons, J. Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. (2004). *Journal of Clinical Microbiology.* 42(6), 2609-2617.
- Letunic I, Bork P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research.*49(W1):W293-6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Li, J., Zhang, H., Ning, J., Sajid, A., Cheng, G., Yuan, Z., & Hao, H. (2019). The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrobial resistance and infection control,* 8, 44. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0489-3>

- Llorente, M. T., Escudero, R., Ramiro, R., Remacha, M. A., Martínez-Ruiz, R., Galán-Sánchez, F., de Frutos, M., Elfa, M., Onrubia, I., & Sánchez, S. (2023). Enteroagregative *Escherichia coli* as etiological agent of endemic diarrhea in Spain: A prospective multicenter prevalence study with molecular characterization of isolates. *Frontiers in microbiology*, 14, 1120285. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1120285>
- Lloyd, A. L., Rasko, D. A., & Mobley, H. L. (2007). Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 189(9), 3532–3546. <https://doi.org/10.1128/JB.01744-06>
- López-Velandia, Diana Paola, Torres-Caycedo, María Inés, & Prada-Quiroga, Carlos Fernando. (2016). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Universidad y Salud*, 18(1), 190-202.
- Luiz, B. M., Cergole-Novella, M. C., Dantas, S. T., de Lira, D. R., de Souza, G. F., Fernandes, I. D. A., ... & Hernandez, R. T. (2024). Enteroagregative *Escherichia coli* (EAEC) isolates obtained from non-diarrheic children carry virulence factor-encoding genes from Extraintestinal Pathogenic E. Coli (ExPEC). *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-11.
- Malberg Tetzschner AM, Johnson JR, Johnston BD, Lund O, Scheutz F. (2020). In Silico Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *J. Clin. Microbiol.* 58(10) e01269-20. doi:10.1128/JCM.01269-20.
- Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D., & Pitout, J. D. D. (2019). Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. *Clinical microbiology reviews*, 32(3), e00135-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18>
- Matsui, Y., Hu, Y., Rubin, J., de Assis, R. S., Suh, J., & Riley, L. W. (2021). Multilocus sequence typing of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infection patients and from fecal samples of healthy subjects in a college community. *MicrobiologyOpen*. 9(6), 1225–1233. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1032>
- Mella M., Sergio, Sepúlveda A., Marcela, González R., Gerardo, Bello T., Helia, Domínguez Y., Mariana, Zemelman Z., Raúl, & Ramírez G., César. (2004). Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista chilena de infectología*, 21(4), 330-338. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182004000400007>
- Méndez-Moreno, E., Caporal-Hernandez, L., Mendez-Pfeiffer, P. A., Enciso-Martinez, Y., De la Rosa López, R., Valencia, D. & Barrios-Villa, E. (2022). Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from healthy donors, including a triple hybrid strain. *Antibiotics*, 11(7), 833.
- Millán, Ysheth, Araque, María, & Ramírez, Ana. (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. *Frente. Microbiol.* 10:633 <https://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182020000200117>
- Mira Bleda, E. (2022). Resistencia de *Escherichia coli* a quinolonas y factores asociados en pacientes hospitalizados por pielonefritis aguda. Proyecto de investigación.
- Mnif, B., Vimont, S., Boyd, A., Bourit, E., Picard, B., Branger, C., Denamur, E., & Arlet, G. (2010). Molecular characterization of addiction systems of plasmids encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1599–1603.
- Moazeni, S., Askari Badouei, M., Hashemitabar, G., Rezatofighi, S. E., & Mahmoodi, F. (2024). Detection and characterization of potentially hybrid enteroagregative

- Escherichia coli* (EAEC) strains isolated from urinary tract infection. *Brazilian Journal of Microbiology*, 55(1), 1-9.
- Morin, N., Santiago, A. E., Ernst, R. K., Guillot, S. J., & Nataro, J. P. (2013). Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 81(1), 122–132. <https://doi.org/10.1128/IAI.00676-12>
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 28, 648-656.
- Mousavi, Z. E., Koolman, L., Macori, G., Fanning, S., & Butler, F. (2023). Comprehensive Genomic Characterization of *Cronobacter sakazakii* Isolates from Infant Formula Processing Facilities Using Whole-Genome Sequencing. *Microorganisms*, 11(11), 2749. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112749>
- Movahedi, M., Zarei, O., Hazhirkamal, M., Karami, P., Shokoozadeh, L., & Taheri, M. (2021). Molecular typing of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection by ERIC-PCR. *Gene Reports*, 23, 101058.
- Nascimento, J. A., Santos, F. F., Valiatti, T. B., Santos-Neto, J. F., M. Santos, A. C., Cayô, R. & AT Gomes, T. (2021). Frequency and diversity of hybrid *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections. *Microorganisms*, 9(4), 693.
- Nascimento, J. A., Santos, F. F., Santos-Neto, J. F., Trovão, L. O., Valiatti, T. B., Pinaffi, I. C., ... & Gomes, T. A. (2022). Molecular epidemiology and presence of hybrid pathogenic *Escherichia coli* among isolates from community-acquired urinary tract infection. *Microorganisms*, 10(2), 302.
- Nicolas-Chanoine, M. H., Bertrand, X., & Madec, J. Y. (2014). *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clinical microbiology reviews*, 27(3), 543–574. <https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>
- Nunes, K. O., Santos, A. C., Bando, S. Y., Silva, R. M., Gomes, T. A., & Elias, W. P. (2017). Enteroaggregative *Escherichia coli* with uropathogenic characteristics are present in feces of diarrheic and healthy children. *Pathogens and disease*, 75(8), ftx106.
- Olesen, B., Scheutz, F., Andersen, R. L., Menard, M., Boisen, N., Johnston, B., Hansen, D. S., Krogfelt, K. A., Nataro, J. P., & Johnson, J. R. (2012). Enteroaggregative *Escherichia coli* O78:H10, the cause of an outbreak of urinary tract infection. *Journal of clinical microbiology*, 50(11), 3703–3711. <https://doi.org/10.1128/JCM.01909-12>
- OMS. 2024. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
- Organización Panamericana de la Salud (2021). Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS. <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
- Ortega-Enríquez, J. Z., Arenas-Hernández, M. M., & Barrios-Villa, E. (2024). Draft genome sequence of a triple hybrid *Escherichia coli* strain isolated from healthy donor feces. *Microbiology resource announcements*, 13(5), e00113-24 <https://doi.org/10.1128/mra.00113-24>
- Ortega-Enríquez, J. Z., Martínez-de la Peña, C., Lara-Ochoa, C., Rocha-Gracia, R. D. C., Barrios-Villa, E., & Arenas-Hernández, M. M. (2024). Comparative Genomics of Three Hybrid-Pathogen Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy Donors' Feces. *Microbiology Research*, 15(3), 1412-1424 <https://doi.org/10.3390/microbiolres15030095>

- Ortega-Enriquez, J. Z., Villa, E. B., & De la Paz Arenas, M. M. (2024). Un recorrido al pequeño mundo de las bacterias. RD-ICUAP, 10, 40-49 <https://doi.org/10.32399/icuap.rdic.2448-5829.2024.Especial.1327>
- Otokunefor, K., Ogugbue, C. J., & Fajoyomi, B. U. (2020). Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) as a tool for genetic characterization of bacterial isolates in Nigeria. Nigerian Journal of Biotechnology, 37(1), 122-128.
- Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. A., Sahm, D., & Hooper, D. C. (2006). Prevalence in the United States of aac (6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(11), 3953–3955. <https://doi.org/10.1128/aac.00915-06>
- Pitout, J. D. D., & Chen, L. (2023). The Significance of Epidemic Plasmids in the Success of Multidrug-Resistant Drug Pandemic Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. Infectious diseases and therapy, 12(4), 1029–1041. <https://doi.org/10.1007/s40121-023-00791-4>
- Pedroza Viveros, N. G. (2022). Caracterización filogenética, clonal, genotípica y plasmídica en una colección de genomas de *Escherichia coli* O25: H4 y análisis del operón fimbrial ucl.
- Pokharel, P., Dhakal, S., & Dozois, C. M. (2023). The diversity of *Escherichia coli* pathotypes and vaccination strategies against this versatile bacterial pathogen. Microorganisms, 11(2), 344.
- QIA. PREP, MINIPREP, HANDBOOK QUIAGENE, MARCH 2003 PAG. 22 – 23
- Qiu, J., Zhai, Y., Wei, M., Zheng, C., & Jiao, X. (2022). Toxin-antitoxin systems: Classification, biological roles, and applications. Microbiological research, 264, 127159. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127159>
- Ramos, J. M. F., Zaragoza, M. G. O., Rodríguez, L. L. L., Partida, E. A. T., & Valencia, A. G. M. (2016). Interacciones farmacológicas relacionadas con la administración de antibióticos betalactámicos. Revista de la Asociación Dental Mexicana, 73(5), 227-234.
- Ray, C. G., & Ryan, K. J. (2010). Sherris Medical Microbiology (Vol. 6). McGraw-Hill
- Riley, LW (2014). Linajes pandémicos de *Escherichia coli* patógena extraintestinal. Microbiología clínica e infección , 20 (5), 380-390.
- 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), 745–756. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0295>
- Roer, L., Tchesnokova, V., Allesøe, R., Muradova, M., Chattopadhyay, S., Ahrenfeldt, J., Thomsen, M. C. F., Lund, O., Hansen, F., Hammerum, A. M., Sokurenko, E., & Hasman, H. (2017). Development of a Web Tool for *Escherichia coli* Subtyping Based on fimH Alleles. Journal of clinical microbiology. 55(8), 2538–2543. <https://doi.org/10.1128/JCM.00737-17>
- Rolf S. Kaas, Pimlapas Leekitcharoenphon, Frank M. Aarestrup, Ole Lund. (2014). Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. PLoS ONE; 9(8): e104984.
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 73(5), 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>
- Saba Villarroel PM, Gutkind GO, Di Conza JA, Radice MA. First survey on antibiotic resistance markers in *Enterobacteriaceae* in Cochabamba, Bolivia. Rev Argent Microbiol. 2017; 49:50–4.


- 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.
- Salmani, H., Azarnejhad, A., Fayazi, M. R., & Hosseini, A. (2016). Pathotypic and Phylogenetic Study of Diarrheagenic *Escherichia coli* and Uropathogenic *E. coli* Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Jundishapur journal of microbiology*, 9(2), e28331. <https://doi.org/10.5812/jjm.28331>
- Santos, A. C. D. 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, 339.
- Santoyo, R. M. R., Reyes, C. F., & Rodríguez, L. E. V. (2020). Características de patogenicidad en *Escherichia coli* aislada de tracto intestinal. *Investigación Científica*, 14(2), 62-66
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut pathogens*, 11, 1-16.
- Schmidt, H., & Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*, 17(1), 14–56. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.14-56.2004>
- Schüroff, P. A., Salvador, F. A., Abe, C. M., Wami, H. T., Carvalho, E., Hernandes, R. T., Dobrindt, U., Gomes, T. A. T., & Elias, W. P. (2021). The aggregate-forming pili (AFP) mediates the aggregative adherence of a hybrid-pathogenic *Escherichia coli* (UPEC/EPEC) isolated from a urinary tract infection. *Virulence*, 12(1), 3073–3093. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2007645>
- Shelenkov, A., Mikhaylova, Y., Voskanyan, S., Egorova, A., & Akimkin, V. (2023). Whole-Genome Sequencing Revealed the Fusion Plasmids Capable of Transmission and Acquisition of Both Antimicrobial Resistance and Hypervirulence Determinants in Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Microorganisms*, 11(5), 1314.
- Shintani, M., Sanchez, Z. K., & Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in microbiology*, 6, 242.
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 74(3), 434–452. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>
- Sora, V. M., Meroni, G., Martino, P. A., Soggiu, A., Bonizzi, L., & Zecconi, A. (2021). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(11), 1355. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111355>
- Spurbeck RR, Dinh PC, Walk ST, Stapleton AE, Hooton TM, Nolan LK, Kim KS, Johnson JR, Mobley HLT. (2012). *Escherichia coli* Isolates That Carry vat, fyuA, chuA, and yfcV Efficiently Colonize the Urinary Tract. *Infect Immun* 80.
- Sukupolvi, S., & O'Connor, C. D. (1990). TraT lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment. *Microbiological reviews*, 54(4), 331–341.
- Tanabe, R. H. S., Dias, R. C. B., Orsi, H., de Lira, D. R. P., Vieira, M. A., Dos Santos, L. F., Ferreira, A. M., Rall, V. L. M., Mondelli, A. L., Gomes, T. A. T., Camargo, C. H., & Hernandes, R. T. (2022). Characterization of Uropathogenic *Escherichia coli* Reveals Hybrid Isolates of Uropathogenic and Diarrheagenic (UPEC/DEC) *E. coli*. *Microorganisms*, 10(3), 645.

- 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, 1566. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>
- Torres, M., y Mattera, A. (2006). *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. (4ta edición). Editorial Médica Panamericana.
- Unterholzner, S. J., Poppenberger, B., & Rozhon, W. (2013). Toxin–antitoxin systems: biology, identification, and application. *Mobile genetic elements*, 3(5), e26219.
- Vázquez Sánchez Maricela.(2017). Determinación de características genotípicas asociadas a la virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena. Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica de Puebla. Instituto de ciencias. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., & Lesterlin, C. (2020). Plasmid transfer by conjugation in Gram-negative bacteria: from the cellular to the community level. *Genes*, 11(11), 1239.
- Wang, A., Yang, Y., Lu, Q., Wang, Y., Chen, Y., Deng, L., Ding, H., Deng, Q., Zhang, H., Wang, C., Liu, L., Xu, X., Wang, L., & Shen, X. (2008). Presence of qnr gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China. *BMC Infectious Diseases*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-68>
- Whelan, S., Lucey, B., & Finn, K. (2023). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)-Associated Urinary Tract Infections: The Molecular Basis for Challenges to Effective Treatment. *Microorganisms*, 11(9), 2169.
- Wilson, L. A., & Sharp, P. M. (2006). Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. *Molecular biology and evolution*, 23(6), 1156–1168. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj125>
- Winstead, A., Hunter, J. C., & Griffin, P. M. (2024). *Escherichia coli*, Diarrheagenic. *CDC Yellow Book*.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L., Karch, H., Reeves, P., Maiden, M., Ochman, H., & Achtman, M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*. 60(5), 1136-1151.
- Wu, A. Y., Kamruzzaman, M., & Iredell, J. R. (2020). Specialised functions of two common plasmid mediated toxin-antitoxin systems, ccdAB and pemIK, in *Enterobacteriaceae*. *PloS one*, 15(6), e0230652.
- Yacarini-Martínez, Antero Enrique, Arriaga-Deza, Emma Vanesa, Alvarado-Pineda, Rosa Liliana, & Fupuy-Chung, Jorge Antonio. (2019). Genes de virulencia de *Escherichia coli* detectados en muestras diarreicas de niños de la Región Lambayeque - Perú. *Horizonte Médico (Lima)* , 19 (1), 7-12.
- Yamane, K., Wachino, J. I., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T., & Arakawa, Y. (2007). New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9), 3354–3360. <https://doi.org/10.1128/AAC.00339-07>
- Yang, X., Liu, X., Xu, Y., Chan, E. W., Zhang, R., & Chen, S. (2022). An IncB/O/K/Z conjugative plasmid encodes resistance to azithromycin and mediates transmission of virulence plasmid in *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of antimicrobial agents*. 60(5-6), 106683.
- Zakaria, A. S., Edward, E. A., & Mohamed, N. M. (2021). Genomic Insights into a Colistin-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Strain of O23:H4-ST641 Lineage

- Harboring *mcr-1.1* on a Conjugative IncHI2 Plasmid from Egypt. *Microorganisms*, 9(4), 799. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040799>
- Zankari E, Allesøe R, Joensen KG, Cavaco LM, Lund O, Aarestrup FM. (2020). PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72(10) 2764-2768.
- Zeynudin, A., Pritsch, M., Schubert, S., Messerer, M., Liegl, G., Hoelscher, M., Belachew, T., & Wieser, A. (2018). Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of CTX-M type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of gram-negative bacilli in Jimma, Ethiopia. *BMC infectious diseases*, 18(1), 524.
- Zhao, J., Chen, Z., Chen, S., Deng, Y., Liu, Y., Tian, W., ... & Liu, J. H. (2010). Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(10), 4219-4224.

### 14. ANEXOS

**Anexo 1.** Formato de recepción de muestra de portadores (Méndez-Moreno *et al.*, 2022).



**FORMATO DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS DE HECES.**

**FECHA** \_\_\_\_\_

**Nº DE REGISTRO** \_\_\_\_\_

**NOMBRE** \_\_\_\_\_

**EDAD** \_\_\_\_\_

**ESCOLARIDA** \_\_\_\_\_

**OCUPACIÓN** \_\_\_\_\_

**CORREO ELECTRÓNICO Y/OTEFONO** \_\_\_\_\_

**¿HA PRESENTADO DIARREA EN LOS ÚLTIMOS 5 DÍAS? SI \_\_\_ NO \_\_\_**  
**EN CASO AFIRMATIVO, INDICAR QUE TRATAMIENTO TOMO.**  
 \_\_\_\_\_

**OTRAS** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**¿PRESENTA ALGUNO DE LOS SIGUIENTES SIGNOS O SINTOMAS?**

- a) FIEBRE
- b) DIARREA
- c) SENSACIÓN DE PLENITUD GÁSTRICA
- d) DOLOR ABDOMINAL
- e) FLATULENCIAS O GASES
- f) TODOS LOS ANTERIORES
- g) OTROS \_\_\_\_\_

**¿SE ENCUENTRA BAJO ALGUN TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO?**  
 SI \_\_\_ NO \_\_\_ ¿DURACIÓN? \_\_\_ ¿Cuál ANTIBIÓTICO? \_\_\_\_\_

**¿HA ESTADO BAJO ALGUN TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO ANTERIORMENTE?**  
 SI \_\_\_ NO \_\_\_ ¿DURACIÓN? \_\_\_ ¿Cuál ANTIBIÓTICO? \_\_\_\_\_

**¿SE ENCUENTRA TOMANDO ALGUN FARMACO?**  
 SI \_\_\_ NO \_\_\_ ¿Cuál FARMACO? \_\_\_\_\_

**Anexo 2.** Características del uroanálisis de las muestras clínicas (Ballesteros-Monrreal *et al.*, 2022).

**Tabla IX.** Resultados de uroanálisis y prevalencia de co-morbilidades en pacientes a) con ITU vs sin ITU y b) con morfotipo vs sin morfotipo.

	(a) Pacientes (n = 85)		P	(b) Pacientes con ITU causada por UPEC (n = 37)		P
	Con ITU n = 40 (%)	Sin ITU n = 45 (%)		Con Morfotipo n = 24 (%)	Sin Morfotipo n = 13 (%)	
<b>Uroanálisis</b>						
pH:						
5.0–6.5	33 (83)	39 (87)	0.55	22 (92)	11 (85)	0.6
7.0–8.0	7 (17)	6 (13)		2 (8)	2 (15)	
EL:						
Positivo	25 (63) *	12 (27)	0.002	16 (67)	7 (53)	0.49
Negativo	15 (37)	33 (73)		8 (33)	6 (46)	
Piuria:						
Positivo (>5 WBCs/HPF)	31 (78) *	13 (29)	<0.0001	14 (58)	10 (85)	0.72
Negativo (<5 WBCs/HPF)	9 (22)	32 (71)		10 (42)	4 (15)	
Bacteriuria:						
>2+	23 (58)	0 (0)	<0.0001	7 (29)	13 (100)	<0.0001
<2+	17 (42)	45 (100) *		17 (71) *	0 (0)	
<b>Condición</b>						
Diabetes	11 (28)	12 (27)	>0.99	7 (29)	4 (31)	>0.99
Falla Renal	3 (8)	3 (7)	>0.99	1 (4)	2 (15)	0.28
Hipertensión	10 (25)	12 (27)	>0.99	5 (20)	3 (23)	>0.99
Diagnóstico de ITU	6 (15)	2 (4)	0.12	3 (13)	3 (23)	0.64
Infección Vaginal	4 (10)	4 (9)	>0.99	0 (0) *	3 (23)	0.037
Embarazo	3 (8)	1 (2)	0.33	2 (8)	1 (8)	>0.99
Hipotiroidismo	1 (3)	5 (11)	0.2	0 (0)	1 (8)	0.35
<b>Urocultivo</b>						
<100,000 UFC/mL	17 (43)	45 (100) *	<0.0001	17 (71)	-	<0.0001
>100,000 UFC/mL	20 (50)	0 (0)		7 (29)	13 (100%)	

EL: Esterasa leucocitaria; WBCs/HPF: Células blancas por campo. La mayor prevalencia de EL y piuria en pacientes con ITU en comparación con los pacientes sin ITU fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). La mayor prevalencia de bacteriuria <2+ en orina de pacientes con morfotipo bacteriano de UPEC en sedimento urinario en comparación con pacientes sin morfotipo fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). El valor de  $p$  fue determinado mediante la prueba exacta de Fisher. Los valores estadísticamente significativos están marcados con \*.

**Anexo 3.** Protocolo de extracción ADN plasmídico mediante lisis alcalina. (QIA.PREP, 2003).

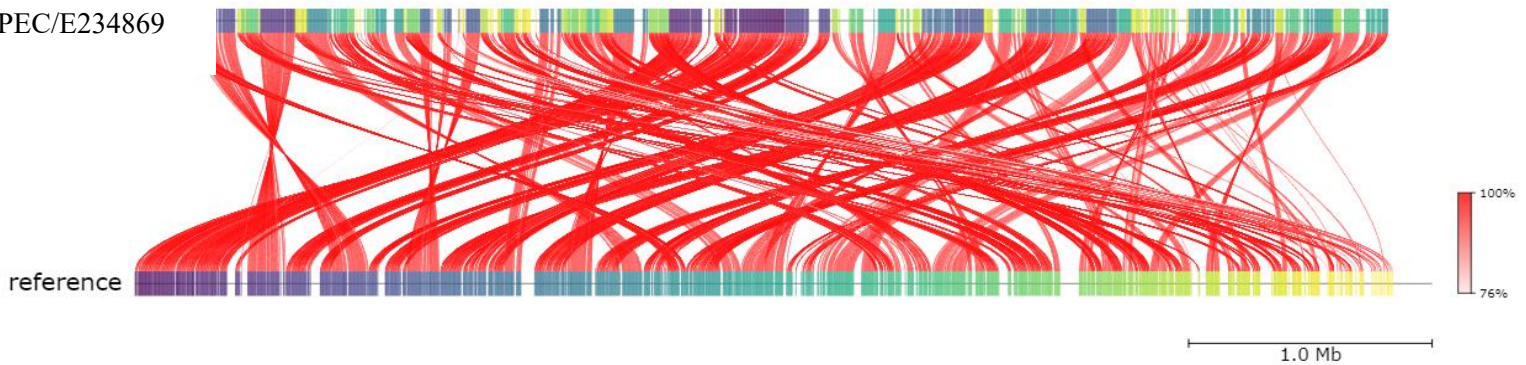
1. Precultivo bacteriano en 5 mL de medio LB con presión de selección, incubar a 37 °C de 18 a 24 hrs, con agitación.
2. Obtener el paquete celular de  $\approx$  3 mL del cultivo. Centrifugarlo durante 5 min a 12 000 rpm.
3. Decantar, tapar y Resuspender en el vortex.
4. Añadir 200  $\mu$ L de la **solución I** (2 mg de lisozima por mL de solución, 2  $\mu$ L de RNAsa por tubo, Realizar las conversiones necesarias para ajustar a 200  $\mu$ L), Resuspender en el vortex y mantener 15 min en incubadora a 37°C.
5. Agregar 400  $\mu$ L de **solución II** (200  $\mu$ L NaOH al 0.4 M y 200  $\mu$ L SDS al 2%), invertir de 5 – 20 veces y mantener 5 min en hielo.
6. Añadir 300  $\mu$ L de **solución III** (Acetato de amonio al 7.5 M) Mezclar gentilmente por algunos segundos (si son plásmidos pequeños agitar 3 veces sin consideración). Mantener 15 min en hielo.
7. Centrifugar 15 min a 12,000 rpm.
8. Inmediatamente transferir el sobrenadante a tubos nuevos por decantación y se agrega isopropanol hasta la marca de 1.5 mL ( $\approx$  400 – 500  $\mu$ L) mezclar gentilmente.
9. Mantener a temperatura ambiente durante 10 min.
10. Centrifugar 15 min a 12,000 rpm y se decanta el sobrenadante.
11. Agregar 1.5 mL de etanol al 70%, mezclar por inversión 3 – 5 veces y centrifugar 5 min.
12. Decantar y dejar secar la pastilla sobre papel, dejando inclinado el tubo y a  $\approx$  20 cm del mechero (zona de esterilidad).
13. Resuspender en 40  $\mu$ L de agua tridestilada estéril.
14. Almacenar de -20 a 4 °C

**Anexo 4. Alineamientos de los genomas de las cepas DEC25.2 (Panel A) , DEC36.3 (Panel B) y DEC36. 4 (Panel C) secuenciadas con genomas de referencia (Ortega-Enríquez *et al.*, 2024) (alineamientos realizados en la plataforma de Proksee).**

**A)**

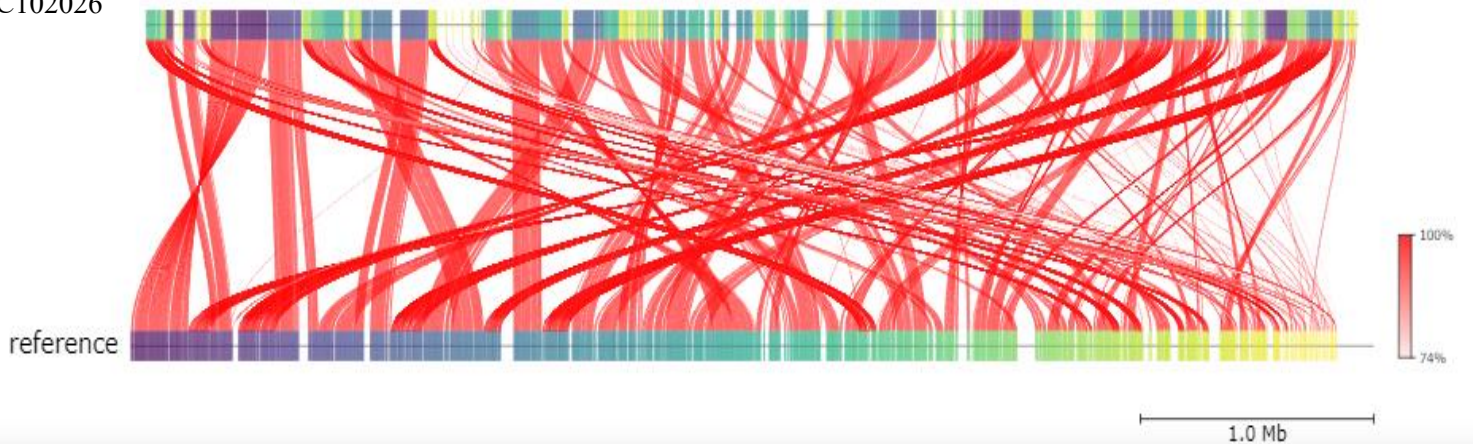
FastANI Results	
Average Nucleotide Identity (ANI)	96.8153
Reference (Project Genome)	DEC25.2 (3).fasta
Query (Uploaded Genome)	EPEC.fasta
Query Sequence Fragments	1,655
Orthologous Matches	1,297

EPEC/E234869



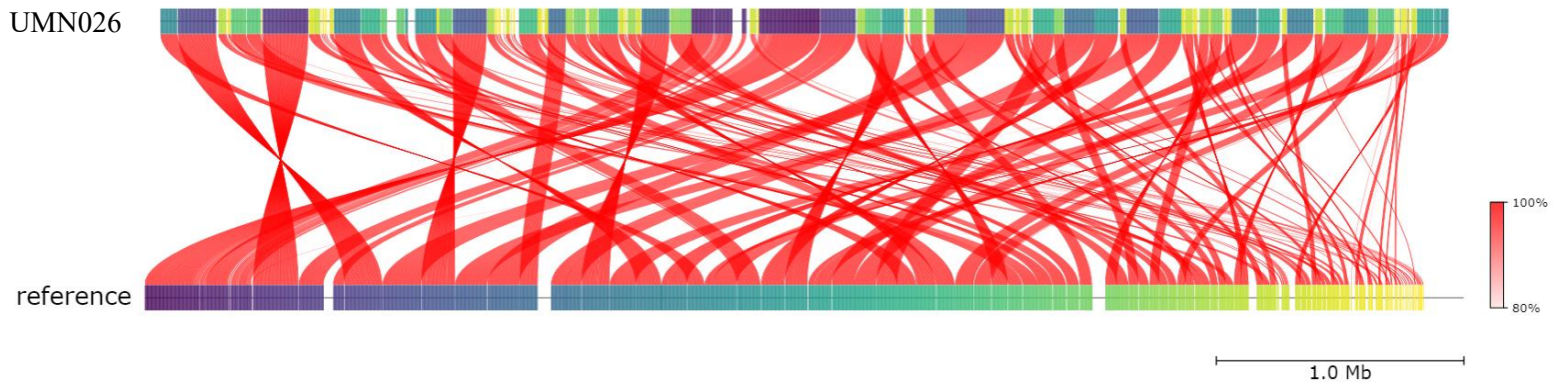
FastANI Results	
Average Nucleotide Identity (ANI)	97.401
Reference (Project Genome)	DEC25.2 (3).fasta
Query (Uploaded Genome)	APEC.fasta
Query Sequence Fragments	1,732
Orthologous Matches	1,369

APEC102026

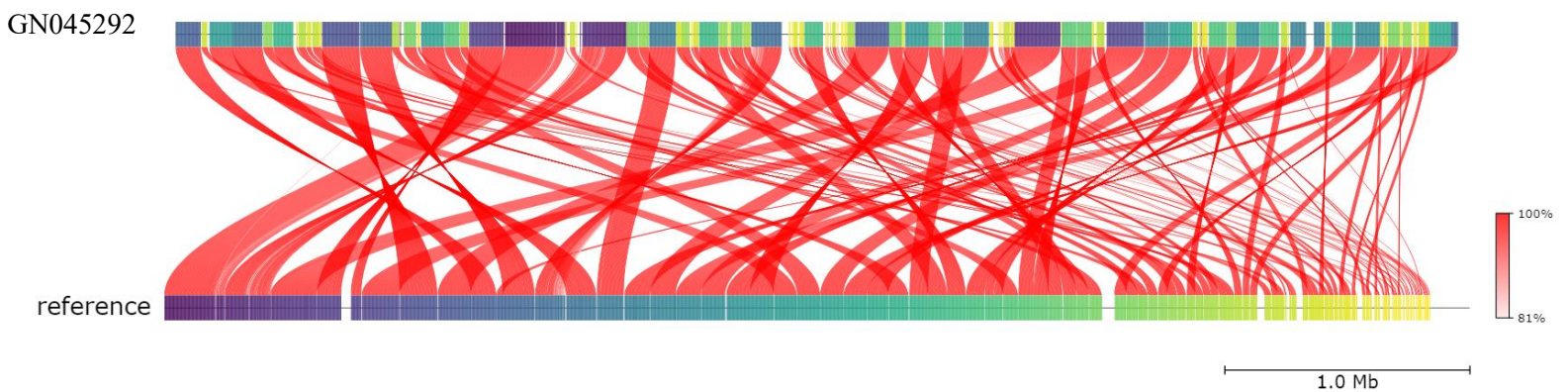


A)

FastANI Results	
Average Nucleotide Identity (ANI)	<b>99.7823</b>
Reference (Project Genome)	DEC25.2.fasta
Query (Uploaded Genome)	CU928163.2.fasta
Query Sequence Fragments	1,734
Orthologous Matches	1,569

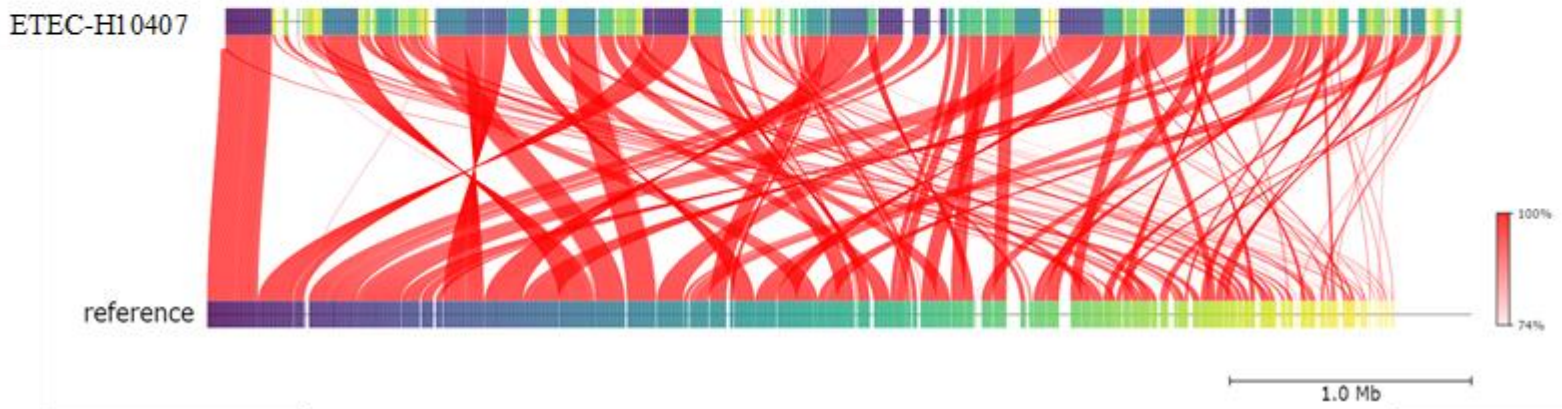


FastANI Results	
Average Nucleotide Identity (ANI)	<b>99.7152</b>
Reference (Project Genome)	DEC25.2.fasta
Query (Uploaded Genome)	CP095538.fasta
Query Sequence Fragments	1,744
Orthologous Matches	1,584

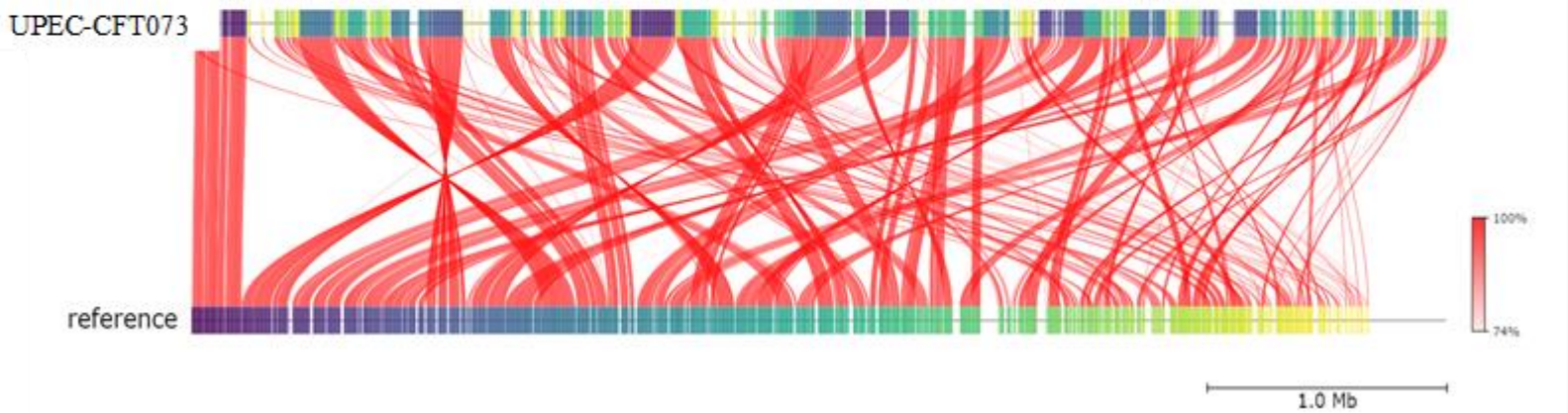


**B)**

FastANI Results	
Average Nucleotide Identity (ANI)	<b>99.0541</b>
Reference (Project Genome)	DEC36.3 (3).fasta
Query (Uploaded Genome)	ETECH10407.fasta
Query Sequence Fragments	1,717
Orthologous Matches	1,413

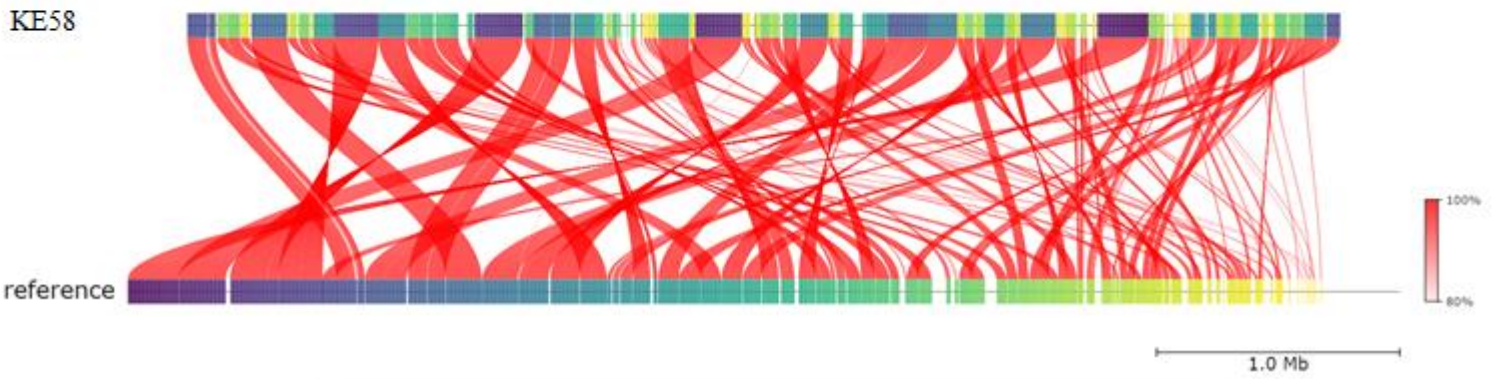


FastANI Results	
Average Nucleotide Identity (ANI)	<b>96.6349</b>
Reference (Project Genome)	DEC36.3 (3).fasta
Query (Uploaded Genome)	CFT073.fasta
Query Sequence Fragments	1,747
Orthologous Matches	1,327

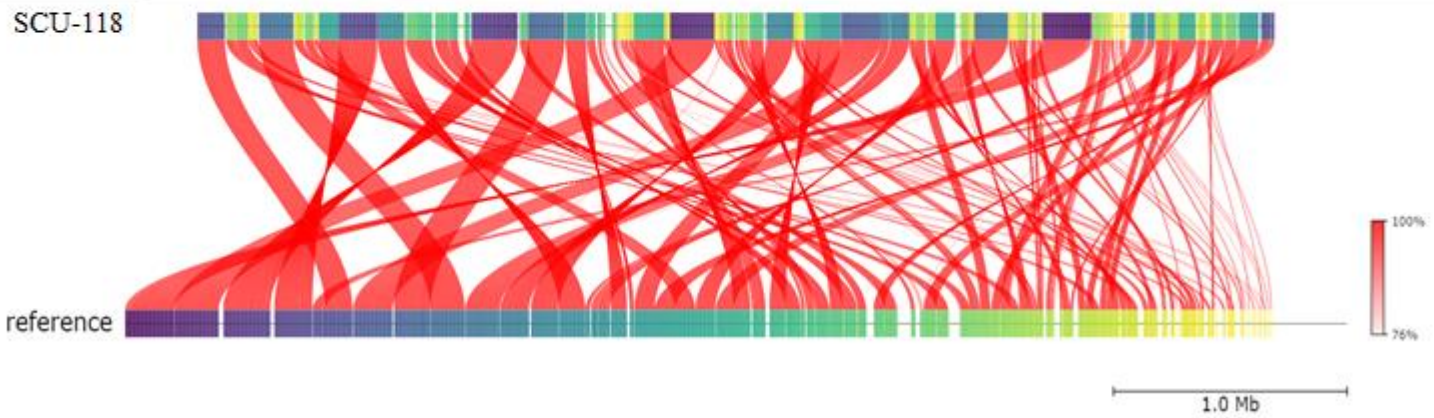


**B)**

FastANI Results	
Average Nucleotide Identity (ANI)	<b>99.5215</b>
Reference (Project Genome)	DEC36.3 (3).fasta
Query (Uploaded Genome)	CP141075.1.fasta
Query Sequence Fragments	1,581
Orthologous Matches	1,412



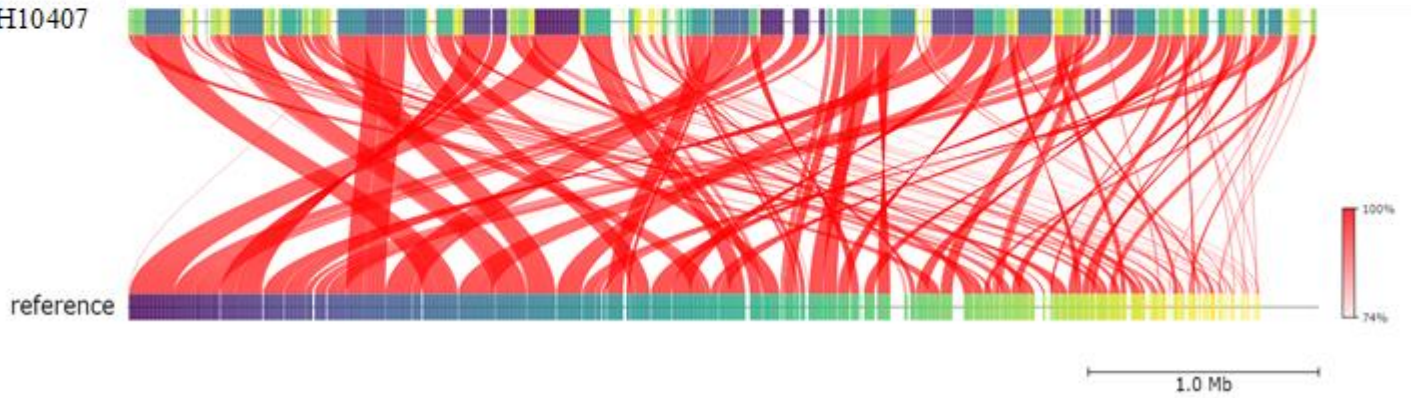
FastANI Results	
Average Nucleotide Identity (ANI)	<b>99.5542</b>
Reference (Project Genome)	DEC36.3 (3).fasta
Query (Uploaded Genome)	CP051716.fasta
Query Sequence Fragments	1,537
Orthologous Matches	1,404



**c)**

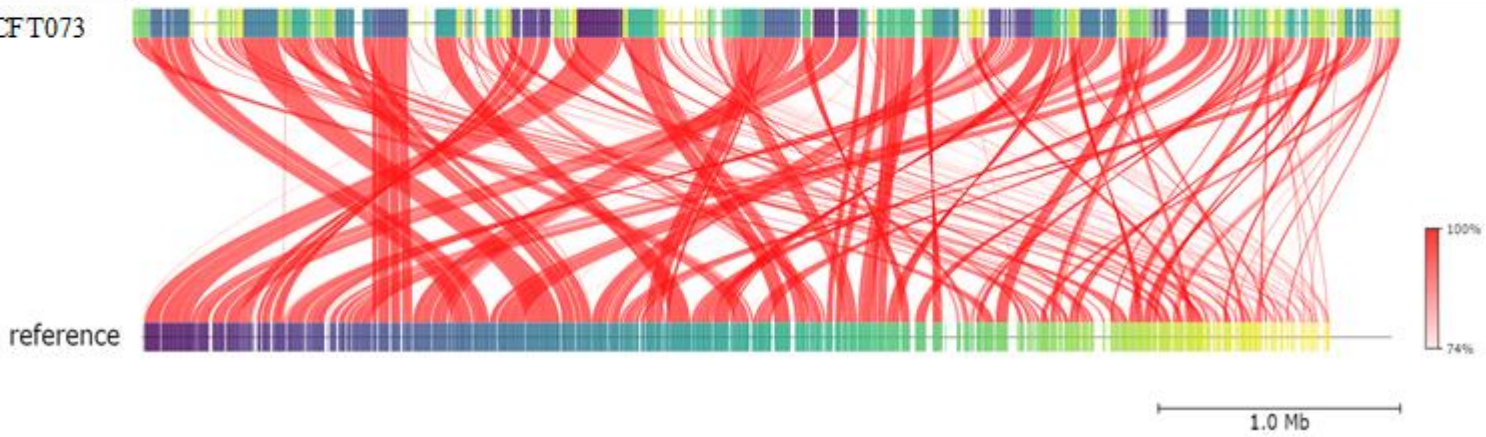
FastANI Results	
Average Nucleotide Identity (ANI)	99.0818
Reference (Project Genome)	DEC36.4 (2).fasta
Query (Uploaded Genome)	ETECH10407.fasta
Query Sequence Fragments	1,717
Orthologous Matches	1,403

ETEC-H10407



FastANI Results	
Average Nucleotide Identity (ANI)	96.6013
Reference (Project Genome)	DEC36.4 (2).fasta
Query (Uploaded Genome)	CFT073.fasta
Query Sequence Fragments	1,747
Orthologous Matches	1,321

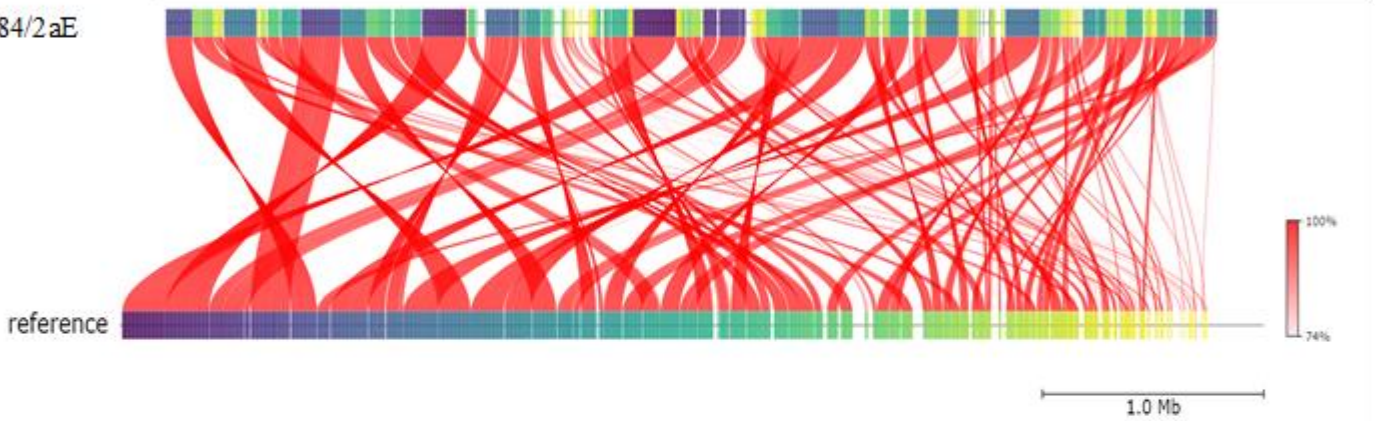
UPEC-CFT073



c)

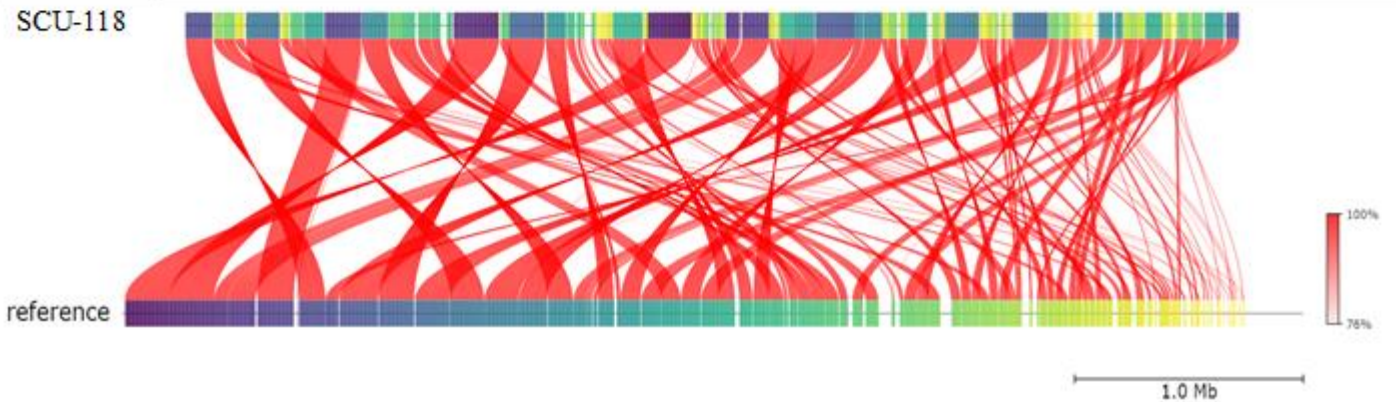
FastANI Results	
Average Nucleotide Identity (ANI)	99.3894
Reference (Project Genome)	DEC36.4 (2).fasta
Query (Uploaded Genome)	CP072858.1.fasta
Query Sequence Fragments	1,583
Orthologous Matches	1,400

184/2aE



FastANI Results	
Average Nucleotide Identity (ANI)	99.556
Reference (Project Genome)	DEC36.4 (2).fasta
Query (Uploaded Genome)	CP051716.fasta
Query Sequence Fragments	1,537
Orthologous Matches	1,404

SCU-118



## Anexo 5. Productividad científica





Communication

## Comparative Genomics of Three Hybrid-Pathogen Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy Donors' Feces

Judith Z. Ortega-Enriquez <sup>1,2</sup>, Claudia Martínez-de la Peña <sup>1</sup>, Cristina Lara-Ochoa <sup>3</sup>, Rosa del Carmen Rocha-Gracia <sup>1,2</sup>, Edwin Barrios-Villa <sup>1,2</sup> and Margarita M. P. Arenas-Hernández <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Graduate Program in Microbiology, Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, Mexico; judithzullim1802@gmail.com (J.Z.O.-E.); claudia.martinez@correo.buap.mx (C.M.-d.L.P.); rosa.rocha@correo.buap.mx (R.d.C.R.-G.)

<sup>2</sup> Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Campus Caborca, H. Caborca, Sonora 83621, Mexico

<sup>3</sup> Centro de Detección Biomolecular, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, Mexico; cristina.lara@correo.buap.mx

\* Correspondence: edwin.barrios@unison.mx (E.B.-V.); margarita.arenas@correo.buap.mx (M.M.P.A.-H.); Tel: +52-(637)-372-65-40 (ext. 7656) (E.B.-V.); Tel: +52-(222)-229-85-00 (ext. 2524) (M.M.P.A.-H.)

**Abstract:** The present study shows the genomic characterization of three pathogenic *Escherichia coli* hybrid strains. All strains were previously characterized as diarrheagenic pathotypes (DEC), obtained from feces. The three sequenced strains have genes that encode adhesins (*fimH* and *ihuA*) and iron uptake systems (*iucC* and *iutA*). Antibiotic resistance genes were also found for fluoroquinolone and aminoglycoside families in the three strains. The presence of genomic islands (GIs) in the sequenced study strains presented 100% identity (Ec-25.2) and 99% identity (Ec-36.1) with previously reported Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains. The Ec-36.4 strain shared a 99% identity with GI from the Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) pathotype of the diarrheagenic *E. coli* strain. Ec-25.2 belongs to ST69 and harbors a FimH27 variant, while Ec-36.1 and Ec-36.4 belong to ST4238 and share a FimH54 variant. Four incompatibility groups associated with conjugative plasmids were identified (IncFIB, IncF11, IncI1, and IncB/O/K/Z), as well as Insertion Sequences and MITEs elements.

**Keywords:** *Escherichia coli*; hybrid pathogens; diarrheagenic pathotype; genome; healthy donors

 **check for updates**

Citation: Ortega-Enriquez, J.Z.; Martínez-de la Peña, C.; Lara-Ochoa, C.; Rocha-Gracia, R.d.C.; Barrios-Villa, E.; Arenas-Hernández, M.M.P. Comparative Genomics of Three Hybrid-Pathogen Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy Donors' Feces. *Microbiol. Res.* **2024**, *75*, 1412–1424. <https://doi.org/10.3390/microbiol7503005>

Academic Editors: Simone Filardo, Rosa Sessa and Andrea Carolina Entrocassi

Received: 7 July 2024  
Revised: 23 July 2024  
Accepted: 31 July 2024  
Published: 2 August 2024

 Copyright © 2024 by the authors.

### 1. Introduction

*Escherichia coli* is a Gram-negative rod from Enterobacterales and one of the commensal gut species. However, several clones have acquired different virulence factors (VF) that enhance their abilities to trigger a wide spectrum of diseases, such as diarrheal illness or extraintestinal ones (such as urinary tract infections, neonatal meningitis, and bloodstream infections) [1].

The *E. coli* pathobionts associated with gut infections are classically known as diarrheagenic pathotypes (DEC) [2]. Within DEC, there are six well-known pathotypes: enteropathogenic (EPEC), enterotoxigenic (ETEC), enterohemorrhagic (EHEC), enterohaemorrhagic (EAEC), enteroinvasive (EIEC), and diffusely adherent *E. coli* (DAEC) [3]. The



Bacteriology | Announcement

## Draft genome sequence of a triple hybrid *Escherichia coli* strain isolated from a healthy donor feces

Judith Z. Ortega-Enríquez,<sup>1,2</sup> Margarita M. P. Arenas-Hernández,<sup>2</sup> Edwin Barrios-Villa<sup>1</sup>

**AUTHOR AFFILIATIONS** See affiliation list on p. 2.

**ABSTRACT** Herein is reported the draft genome sequence of a triple hybrid *Escherichia coli* strain isolated from a healthy donor feces. The assembly is 5.2 Mbp, composed of 247 contigs, with a  $N_{50}$  of 77,241 bp, presenting a GC content of 50.8%.

**KEYWORDS** *Escherichia coli*, genomes, hybrid pathogen, diarrheagenic pathotypes

The relevance of *Escherichia coli* either as a commensal or as a pathogen has been widely documented (1). Pathogenic strains are classified as diarrheagenic (DEC) or extraintestinal (ExPEC) (2–5). Six DEC variants have been characterized and are well recognized, enteroaggregative (EAEC), enteroinvasive (EIEC), enterohaemorrhagic (EHEC), diffusely adherent (DAEC), enterotoxigenic (ETEC), and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) (6).

*E. coli* Ec-36.3 belongs to a strain collection previously characterized (7). It was isolated from a healthy donor feces in Caborca, Sonora, Mexico in October 2022. A stool sample from the healthy donor collected in a sterile container was diluted in 5 mL of saline solution, then 5  $\mu$ L was plated onto a MacConkey (Becton Dickinson, BBL) agar plate and incubated aerobically at 37°C overnight. A lactose-positive colony was selected. This strain was characterized with biochemical tests using a Vitek2 system (Biomérieux, France) and molecularly using specific primers for *ybbW* as previously reported (Table 1) (8, 9); in addition, using a PCR approach were identified the genetic determinants of three diarrheagenic pathotypes: *bfpA* (but not *eae*, classifying it as atypical EPEC or aEPEC), *stx1* (from ETEC), and *daaE* (from DAEC) (7) that codify for main subunit of bundle forming pilus, thermostable toxin, and the structural subunit of the F1845 fimbriae, respectively (Table 1). The strain was stored at –80°C in Luria Bertani (LB) broth supplemented with glycerol 20%. The sampling was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and a signed informed consent form was obtained from the participants.

For DNA extraction, the Ec-36.3 was plated on agar MacConkey plates and one lactose-positive colony was inoculated on 5 mL of LB broth and incubated at 37°C overnight. Genomic DNA was obtained using the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, USA). Illumina sequencing libraries were prepared using the tagmentation-based and PCR-based Illumina DNA Prep kit (Illumina, USA) and custom IDT 10 bp unique dual indices with a target insert size of 320 bp. Illumina sequencing was performed on an Illumina NovaSeq 6000 sequencer producing 2 × 151 bp paired-end reads. In the

Editor Vanja Klepac-Ceraj, Department of Biological Sciences, Wellesley College, Wellesley, Massachusetts, USA

Address correspondence to Edwin Barrios-Villa, edwin.barrios@unison.mx.

The authors declare no conflict of interest.

asm.org/journal/mra on 03 September 2024 by 2806-263-c481-96eatb86-d600-bf4a-56c3

# UN REGORRIDO AL PEQUEÑO MUNDO DE LAS BACTERIAS

A JOURNEY INTO THE SMALL  
WORLD OF BACTERIA

Judith Zullim Ortega Enriquez (1,2\*)  
Edwin Barrios Villa (2)  
Margarita Ma. De la Paz Arenas Hernández (1)

judithzullim1802@gmail.com  
edwin.barrios@unison.mx  
margarita.arenas@correo.buap.mx

<https://orcid.org/0000-0002-2413-6004>  
<https://orcid.org/0000-0002-7864-1292>  
<https://orcid.org/0000-0002-1483-0510>

NÚMERO ESPECIAL POSGRADO ICUAP.  
Recibido: 20/diciembre/ 2023  
Aprobado: 26/febrero/ 2024  
Publicado: 7/marzo/ 2024

(1) Posgrado en Microbiología. Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos.  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

(2) Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Departamento de Ciencias Químico  
Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Campus Caborca. Av. Universidad e  
Irigoyen S/N, CP. 83621, H. Caborca Sonora, México.

**Anexo 6. Participación en congresos**

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**UNIDAD REGIONAL NORTE**  
**DIVISION DE CIENCIAS E INGENIERÍA**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**Y AGROPECUARIAS**

**4<sup>to</sup>** Congreso Nacional de Ciencias Bioquímicas  
 XXV Semana del Día del Químico

**Otorga el presente reconocimiento a:**

**Judith Zullim Ortega Enríquez, Margarita Ma. de la Paz Arenas Hernández, Edwin Barrios-Villa.**

Por haber obtenido la **"Distinción de excelencia"** en el concurso de carteles durante el **4<sup>to</sup> Congreso Nacional de Ciencias Bioquímicas y XXV Semana del Químico 2022**, el cual se llevo a cabo de los días 28-30 de noviembre y 01 de diciembre de 2022 en H. Caborca, Sonora, con el trabajo titulado:

**"Estudio de los patotipos y características asociadas a virulencia y resistencia en una colección de cepas de *E. coli* de diferentes orígenes"**

Dra. Dora E. Valencia Rivera  
Jefa de Departamento
  
M.C. Joaquín Vásquez Quiroga  
Director de División
  
Bryan Haro Bustamante  
Alumno Presidente del Comité Organizador
  
Dr. Jesús Ortega García  
Profesor Presidente del Comité Organizador

Se otorga la presente

**CONSTANCIA a:**

**Judith Zullim Ortega Enríquez**

Por su asistencia y presentación del trabajo titulado:

**Clonal relationship between *Escherichia coli* strains isolated from feces of healthy carriers and clinical samples and plasmidic profile**

Por:

Judith Zullim Ortega Enríquez, Manuel G. Ballesteros-Monrreal, Cristina Lara Ochoa, Claudia Fabiola Martínez de la Peña, Rosa del Carmen Rocha Gracia, Edwin Barrios Villa y Margarita Ma. de la Paz Arenas Hernández.

En la modalidad de cartel en el VII Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias  
 8 - 12 de octubre de 2023, San Miguel de Allende, Gto.

Atentamente  
 Por el Comité Organizador

Dra. Lourdes Girard



Anexo 7. Actividades de retribución social





# Draft genome sequence of a triple hybrid *Escherichia coli* strain isolated from a healthy donor feces

Judith Z. Ortega-Enríquez,<sup>1,2</sup> Margarita M. P. Arenas-Hernández,<sup>2</sup> Edwin Barrios-Villa<sup>1</sup>

**AUTHOR AFFILIATIONS** See affiliation list on p. 2.

**ABSTRACT** Herein is reported the draft genome sequence of a triple hybrid *Escherichia coli* strain isolated from a healthy donor feces. The assembly is 5.2 Mbp, composed of 247 contigs, with a N<sub>50</sub> of 77, 241 bp, presenting a GC content of 50.8%.

**KEYWORDS** *Escherichia coli*, genomes, hybrid pathogen, diarrheagenic pathotypes

The relevance of *Escherichia coli* either as a commensal or as a pathogen has been widely documented (1). Pathogenic strains are classified as diarrheagenic (DEC) or extraintestinal (ExPEC) (2–5). Six DEC variants have been characterized and are well recognized, enteroaggregative (EAEC), enteroinvasive (EIEC), enterohaemorrhagic (EHEC), diffusely adherent (DAEC), enterotoxigenic (ETEC), and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) (6).

*E. coli* Ec-36.3 belongs to a strain collection previously characterized (7). It was isolated from a healthy donor feces in Caborca, Sonora, Mexico in October 2022. A stool sample from the healthy donor collected in a sterile container was diluted in 5 mL of saline solution, then 5 µL was plated onto a MacConkey (Becton Dickinson, BBL) agar plate and incubated aerobically at 37°C overnight. A lactose-positive colony was selected. This strain was characterized with biochemical tests using a Vitek2 system (Biomerièux, France) and molecularly using specific primers for *ybbW* as previously reported (Table 1) (8, 9); in addition, using a PCR approach were identified the genetic determinants of three diarrheagenic pathotypes: *bfpA* (but not *eae*, classifying it as atypical EPEC or aEPEC), *stx* (from ETEC), and *daaE* (from DAEC) (7) that codify for main subunit of bundle forming pilus, thermostable toxin, and the structural subunit of the F1845 fimbriae, respectively (Table 1). The strain was stored at –80°C in Luria Bertani (LB) broth supplemented with glycerol 20%. The sampling was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and a signed informed consent form was obtained from the participants.

For DNA extraction, the Ec-36.3 was plated on agar MacConkey plates and one lactose-positive colony was inoculated on 5 mL of LB broth and incubated at 37°C overnight. Genomic DNA was obtained using the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, USA). Illumina sequencing libraries were prepared using the tagmentation-based and PCR-based Illumina DNA Prep kit (Illumina, USA) and custom IDT 10 bp unique dual indices with a target insert size of 320 bp. Illumina sequencing was performed on an Illumina NovaSeq 6000 sequencer producing 2 × 151 bp paired-end reads. In the following analysis, default settings were used unless otherwise noted. FastQC (v0.11.9) was used for quality evaluation and Cutadapt (v4.4) for trimming and cleaning of the raw reads (14). Assembly was performed with SPAdes (v3.15.4) (15). Twenty-four contigs were removed as they were below 200 bp in length. The assembled genome was 5, 233, 542 bp in length, composed of 247 contigs, which displayed an N<sub>50</sub> of 77, 241 bp and a GC content of 50.8%. The estimated sequencing depth was 80× with a coverage of 100% of the *E. coli* K12 reference genome according to the NCBI database pipeline.

**Editor** Vanja Klepac-Ceraj, Department of Biological Sciences, Wellesley College, Wellesley, Massachusetts, USA

Address correspondence to Edwin Barrios-Villa, edwin.barrios@unison.mx.

The authors declare no conflict of interest.

See the funding table on p. 2.

**Received** 5 February 2024

**Accepted** 15 March 2024

**Published** 26 March 2024

Copyright © 2024 Ortega-Enríquez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

TABLE 1 Specific primers and PCR conditions used for molecular characterization of Ec-36.3<sup>a</sup>

Target	Sequence (5' – 3')	Tm (amplicon size)	Reference
<i>ybbW</i>	F: gtgattggcaaatctggccg R: catactggcaatcagtagcgc	60°C (667 bp)	(8, 9)
<i>bfpA</i>	F: aatggtgcttgctgctgctgc R: gccgctttatccaacctgga	67°C (326 bp)	(10)
<i>eaeA</i>	F: caggtcgtcgtgctgctaaa R: tcagcgtggttgatcaacct	67°C (570 bp)	(11)
<i>stal</i>	F: ttaatagcaccggtagaagcagg R: cttgactctcaaaagagaaaattac	60°C (147 bp)	(12)
<i>daaE</i>	F: tgactgtgaccgaagagtgctc R: ttagtctgaccgaagagtgctc	48°C (380 bp)	(13)

<sup>a</sup>All the reactions were performed using 5 μL of GoTaq MasterMix (containing reaction buffer, 400 μM of each dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, and Taq DNA polymerase 1x) (Promega Corporation, USA), 0.3 μL of 25 mM of each primer and 1 μL of template DNA to a final volume of 10 μL. The reaction was of one cycle of 94°C 4 min for denaturing, followed by 35 cycles of 94°C, 1 min; specific Tm, 30 s; and 72°C, 60 s; and one final cycle of extension of 72°C for 5 min.

## ACKNOWLEDGMENTS

The present work was supported by Universidad de Sonora under the Convocatoria para Apoyo a Proyectos Internos 2023, project number USO413008356 and by Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, BUAP through the project VIEP-2023 "Análisis del Genoma de *E. coli* Uropatógena y Comensal para la Prevención, Control y Tratamiento Adecuados de la Infección de Tracto Urinario." J.Z.O.E. received a CONACYT scholarship number 1186228.

## AUTHOR AFFILIATIONS

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Campus Caborca. Av. Universidad e Irigoyen S/N, H. Caborca, Sonora, Mexico

<sup>2</sup>Posgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Puebla, Mexico

## AUTHOR ORCIDs

Edwin Barrios-Villa  <http://orcid.org/0000-0002-7864-1292>

## FUNDING

Funder	Grant(s)	Author(s)
Universidad de Sonora (UNISON)	USO413008356	Edwin Barrios-Villa
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)	1186228	Judith Z. Ortega-Enríquez
BUAP   Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (VIEP, BUAP)	VIEP-2023	Margarita M. P. Arenas-Hernández

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Judith Z. Ortega-Enríquez, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft | Margarita M. P. Arenas-Hernández, Formal analysis, Investigation, Project administration, Writing – review and editing | Edwin Barrios-Villa, Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Resources, Supervision, Validation, Writing – review and editing

## DATA AVAILABILITY

The draft genome of this *E. coli* Ec-36.3 Whole-Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession [JAYMYX000000000](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00049-2). The version described in this paper is [JAYMYX010000000](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00049-2). The project accession number is [PRJNA1060348](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00049-2). The raw sequencing reads were deposited to the GenBank under the accession number [SRR27871076](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00049-2).

## REFERENCES

- Russo TA, Johnson JR. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect* 5:449–456. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(03\)00049-2](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00049-2)
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Donnenberg MS. 2013. Edited by M. S. Donnenberg. *Escherichia coli*, pathotypes and principles of pathogenesis. 2nd ed. Elsevier B.V, Baltimore, Maryland.
- Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF, Ferreira LCS, Martinez MB. 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol* 47 Suppl 1:3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Riley LW. 2020. Distinguishing pathovars from nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 8. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ame-0014-2020>
- Torres AG. 2016. *Escherichia coli* in the Americas. Cham.
- Méndez-Moreno E, Caporal-Hernandez L, Mendez-Pfeiffer PA, Enciso-Martinez Y, De la Rosa López R, Valencia D, Arenas-Hernández MMP, Ballesteros-Monrreal MG, Barrios-Villa E. 2022. Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from healthy donors, including a triple hybrid strain. *Antibiotics (Basel)* 11:833. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070833>
- Walker DI, McQuillan J, Taiwo M, Parks R, Stenton CA, Morgan H, Mowlem MC, Lees DN. 2017. A highly specific *Escherichia coli* QPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. *Water Res* 126:101–110. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.032>
- Carreón-León EAC. 2019. Estudio molecular de la Resistencia Y Virulencia de Cepas de *Escherichia coli* Productoras de  $\beta$ -Lactamasas de Espectro Extendido Aisladas de Vegetales Crudos. Master's Thesis, BUAP, Puebla, Mexico. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/4692>.
- Aranda KRS, Fabbricotti SH, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. 2007. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. *FEMS Microbiol Lett* 267:145–150. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00580.x>
- Bouzari S, Farhang E, Hosseini SM, Alikhani MY. 2018. Prevalence and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and Enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with acute diarrhea. *Iran J Microbiol* 10:151–157.
- Aranda KRS, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. 2004. Evaluation of Multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Clin Microbiol* 42:5849–5853. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5849-5853.2004>
- Mansan-Almeida R, Pereira AL, Giugliano LG. 2013. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC Microbiol* 13:22. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-22>
- Martin M. 2022. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j* 17:10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>

# UN RECORRIDO AL PEQUEÑO MUNDO DE LAS BACTERIAS

A JOURNEY INTO THE SMALL  
WORLD OF BACTERIA

Judith Zullim Ortega Enriquez (1,2\*)  
Edwin Barrios Villa (2)  
Margarita Ma. De la Paz Arenas Hernández (1)

judithzullim1802@gmail.com  
edwin.barrios@unison.mx  
margarita.arenas@correo.buap.mx

<https://orcid.org/0000-0002-2413-6004>  
<https://orcid.org/0000-0002-7864-1292>  
<https://orcid.org/0000-0002-1483-0510>

NÚMERO ESPECIAL POSGRADO ICUAP.  
Recibido: 20/diciembre/ 2023  
Aprobado: 26/febrero/ 2024  
Publicado: 7/marzo/ 2024

(1) Posgrado en Microbiología. Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos.  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

(2) Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Departamento de Ciencias Químico  
Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Campus Caborca. Av. Universidad e  
Irigoyen S/N, CP. 83621, H. Caborca Sonora, México.

# RESUMEN

Las bacterias son organismos unicelulares procariotas que se encuentran en todos los ambientes del planeta, siendo comensales en diferentes huéspedes (humanos y animales) y a comparación de los organismos eucariotas poseen una estructura sencilla, pese a que, contienen al menos dos elementos que les ayudan a sobrevivir como la “cápsula” y los “flagelos”, estos últimos les permiten desplazarse de un lado a otro. Además de que, las bacterias pueden convertirse en “patógenas”, es decir, son capaces de causar enfermedades, usualmente gracias a los plásmidos, que al ser elementos móviles pueden transferir fácilmente genes de virulencia implicados en la patogenicidad de las bacterias como la producción de ciertas toxinas, del mismo modo genes de resistencia a determinados antibióticos, mediante el proceso de conjugación, mecanismo importante de la transferencia genética horizontal, que ocurre de bacteria donadora a una receptora, este fenómeno de resistencia representa actualmente un problema de salud pública.

*Palabras clave:* Bacteria, plásmidos, conjugación, resistencia.

# ABSTRACT

Bacteria are small unicellular prokaryotic organisms that are found in all environments of the planet being commensals in different hosts (humans and animals) that compared to eukaryotic organisms have a simple structure; however, there are at least two elements that help them to survive, the “capsule” and “flagella”, the latter allow them to move from one side to another. In addition, bacteria may become “pathogenic” (able to cause diseases) usually through plasmids, which are mobile elements that may easily transfer virulence genes involved in the pathogenesis of bacteria such as the production of some toxins, as well as genes of resistance to antibiotics. This horizontal transfer is mediated through a process known as conjugation (important mechanism of horizontal gene transfer which occurs from donor bacteria to a recipient). The phenomenon of resistance currently represents a public health problem.

*Keywords:* Bacteria, plasmid, conjugation, resistance.

# INTRODUCCIÓN

Las bacterias son los microorganismos más abundantes del planeta, pertenecen al reino procariota, son unicelulares y se encuentran en cualquier ambiente de la tierra, agua, suelo y tierra. Su tamaño oscila entre 0.5-3  $\mu\text{m}$  (micrómetros) y presentan distintas formas, incluyendo cocos, bacilos y espirilos (figura 1), muchas de ellas son consideradas bacterias comensales porque conviven con el huésped sin causar daño, principalmente se encuentran en el tracto gastrointestinal, la piel y la boca. Sin embargo, también existen bacterias que causan enfermedades y son consideradas patógenas (Marcano, 2008; De Lucas et al., 2018).

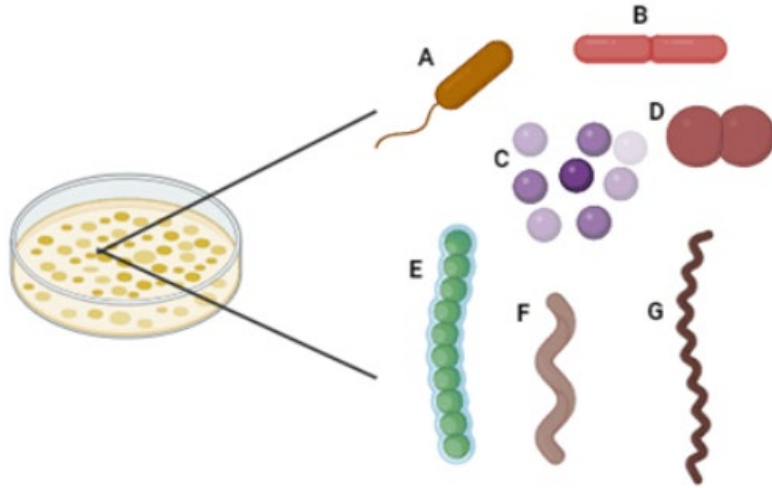


Figura 1. Morfología bacteriana. A) Bacilos. B) Diplobacilos. C) Cocos. D) Diplococo. E) Estreptococos. F) Espirilo. G) Espiroqueta. Elaboración propia en BioRender.com

## Estructura de las bacterias

A pesar de ser microorganismos poseen una estructura compleja, que les permite cumplir diferentes funciones (figura 2). Dentro de los componentes más esenciales descritos para las bacterias se encuentra el núcleo, que consiste en una estructura donde se ubica el ADN, debido a que las bacterias, al ser células procariotas, no poseen un núcleo verdadero. A diferencia de las eucariotas, su material genético está constituido por una molécula de ADN (ácido desoxirribonucleico) circular enrollada sobre sí mismo (Chávez Castillo et al., 2017).

Una gran parte de las bacterias se clasifican con base en las propiedades de su pared celular, que consiste de una capa compuesta por peptidoglicanos, un polímero complejo de moléculas alternadas de N-acetilglucosamina y de ácido N-acetilmurámico. De acuerdo con la composición de su pared celular, las bacterias se clasifican en dos grupos: Gram positivas (retienen complejos de cristal violeta) o Gram negativas (se tiñen con safranina, colorante de color rojo) esto con base en su respuesta al procedimiento de tinción de Gram. (Brooks et al., 2011).

Sin embargo, esto no influye en que un grupo de bacterias sea más patógeno que otro, tanto las Gram positivas como negativas causan un amplio espectro de enfermedades tales como infecciones urinarias, infecciones de transmisión sexual, enfermedades de transmisión alimentaria, neumonía y sepsis. Por otro lado, diversos estudios hacen énfasis en ciertas particularidades en la pared bacteriana (modificación de la permeabilidad), así como también bombas de expulsión que pueden

impedir la acción de los antibióticos para ejercer su función, de esta manera se puede incrementar la resistencia a los fármacos (Troncoso et al., 2017).

Un componente externo de importancia es la cápsula, que está conformada por cadenas de azúcares y proteínas que se encuentran unidas fuertemente a la bacteria, teniendo como función proteger a las bacterias de la desecación, así como también contribuir a la capacidad de invasión de la bacteria patógena y evadir la respuesta inmune. Sin embargo, no es una estructura vital para la célula, pues su pérdida no se relaciona con la pérdida de viabilidad celular (Brooks et al., 2011). Por otro lado las pilosidades o fimbrias son estructuras filamentosas cortas y finas que se componen de varias copias de una subunidad proteica llamada "pilina"; esta estructura no cumple funciones de movilidad, más bien su participación se encuentra en la adherencia a receptores específicos y superficiales, jugando un papel importante en la colonización de ciertos epitelios. Así también, existen otros componentes llamados pilis conjugativos, estos son más largos, se encuentran en poca cantidad (2 o 3 por célula) y tienen como función intervenir en el intercambio genético entre bacterias (Pérez et al., 2006).

Otras estructuras de importancia son los flagelos, pero estos no se encuentran en todas las bacterias, solo en aquellas que son capaces de desplazarse por sí mismas, como las que pertenecen a los géneros *Escherichia* y *Salmonella*, miembros importantes de la familia Enterobacteriales y que normalmente son comensales en el tracto gastrointestinal. Los flagelos se componen de subunidades proteicas llamadas "flagelinas" y pueden encontrarse en diferente lugar y número en el exterior de la bacteria. Si existe un solo flagelo, la bacteria se denomina monotrica; si hay un flagelo en los extremos de la bacteria, se le llama anfotrica; los grupos de flagelos presentes en uno o en los dos extremos de la bacteria se denominan lofotricos; cuando

los flagelos están distribuidos sobre toda la superficie de la célula se denominan peritricos (Chávez Castillo et al., 2017).

Por otro lado, otros componentes implicados en varios procesos vitales para las bacterias son los plásmidos (que alberga genes bacterianos que no se encuentran agrupados en el nucleóide). Estos son elementos extracromosómicos, que se pueden clasificar en no móviles, móviles y conjugativos. Los plásmidos son generalmente circulares, aunque en ciertas bacterias se pueden encontrar de forma lineal, cuentan con un ADN de doble cadena y pueden replicarse de manera autónoma, es decir, independientemente del cromosoma bacteriano.

En una célula pueden estar presentes varios tipos de plásmidos o varias copias del mismo plásmido. Muchos plásmidos tienen la capacidad de producir su propia transferencia de una célula a otra por medio de los productos de un grupo de genes que codifican las estructuras y enzimas requeridas. Tales plásmidos son considerados conjugativos y aquellos que carecen de estos genes pueden ser movilizables (mediante los elementos de un plásmido conjugativo) o no conjugativos. Su importancia radica en que muchos de ellos están implicados en la patogenia de la bacteria y al mismo tiempo poseen genes de resistencia a los antibióticos o de virulencia (Castro, 2014; Ray y Ryan, 2010).

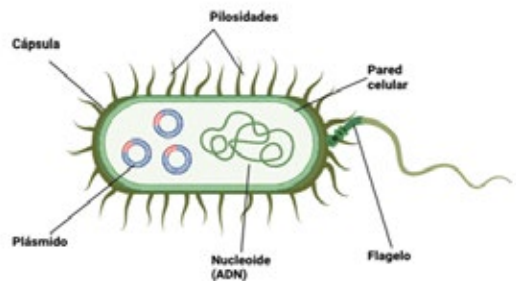


Figura 2. Representación de la estructura de una bacteria. Elaboración propia en BioRender.com

# Tipos de plásmidos

**De resistencia:** Albergan genes de resistencia a antibióticos, por ejemplo los genes que confieren resistencia a los antibióticos de la familia de las quinolonas qnrA, qnrB y qnrS (que codifican para las proteínas Qnr), además de ciertas bombas de expulsión que se encuentran en la membrana de la bacteria, como el complejo oqxAB (Mosquito et al., 2011). Si bien los genes que confieren resistencia a antibióticos betalactámicos pueden localizarse en el cromosoma bacteriano, también son capaces de movilizarse e integrarse a plásmidos, que confieren resistencia principalmente a la cefotaxima, antibiótico perteneciente a la familia de las cefalosporinas (López-Velandia et al., 2016).

**De virulencia:** Como su nombre lo indica, este tipo de plásmido posee factores de virulencia que causan que una bacteria sea más virulenta, es decir, que tenga mayor capacidad para provocar una enfermedad. Dentro de estos factores se incluye la producción de ciertas toxinas, como la toxina tetánica de la bacteria *Clostridium tetani* (Cárdenas-Perea et al., 2014).

**Degradativos:** Este tipo de plásmidos le permiten a la bacteria digerir sustancias inusuales de su entorno. Por ejemplo, el tolueno o el ácido salicílico, estos plásmidos contienen genes de enzimas que tienen la función principal de descomponer compuestos específicos (Romero, 2018).

**Plásmidos col:** Contienen genes responsables de la producción de bacteriocinas, también denominadas colicinas, proteínas que pueden defender a la bacteria huésped matando a otras bacterias (Santos López, 2016).

**De fertilidad:** Son aquellos que poseen genes de transferencia capaces de conjugarse (Romero, 2018). Este proceso de transferencia se describe a continuación.

## Transferencia Genética Horizontal (TGH)

Las bacterias pueden transferir su material genético mediante 4 diferentes mecanismos, transformación, transducción, vesiducción y conjugación. Este último consiste en la transferencia plasmídica de una célula bacteriana donadora a una receptora en un proceso que requiere un contacto estrecho. De esta forma, se establece un puente citoplasmático entre ellas para la transferencia de una parte o de todo el genoma donador a la célula receptora. La capacidad de donación está determinada por plásmidos conjugativos llamados plásmidos fértiles o plásmidos sexuales, en este proceso pueden ser transferidos genes de resistencia a antibióticos o factores de virulencia (figura 3) (Ray y Ryan 2010, Castro, 2014).

## MECANISMO DE CONJUGACIÓN

Dentro de los plásmidos fértiles se encuentran los genes tra, cuya expresión es necesaria para que se inicie de la conjugación; estas proteínas son útiles para que el plásmido se propague desde una célula donadora a una receptora (Frankel et al., 2023). Los plásmidos conjugativos suelen ser grandes, con un número de copias bajo y para ser considerados de esta manera deben de codificar cuatro elementos (figura 4): un origen de transferencia (oriT), una relaxasa (R), una proteína de acoplamiento de tipo IV (T4CP) y una sistema de secreción tipo IV (T4SS). En cambio, los plásmidos movilizables transportan sólo los componentes relaxosomales oriT, un gen de la relaxasa y una o más proteínas auxiliares, por lo que son pequeños y tienen un número de copias alto (Smillie et al., 2010).

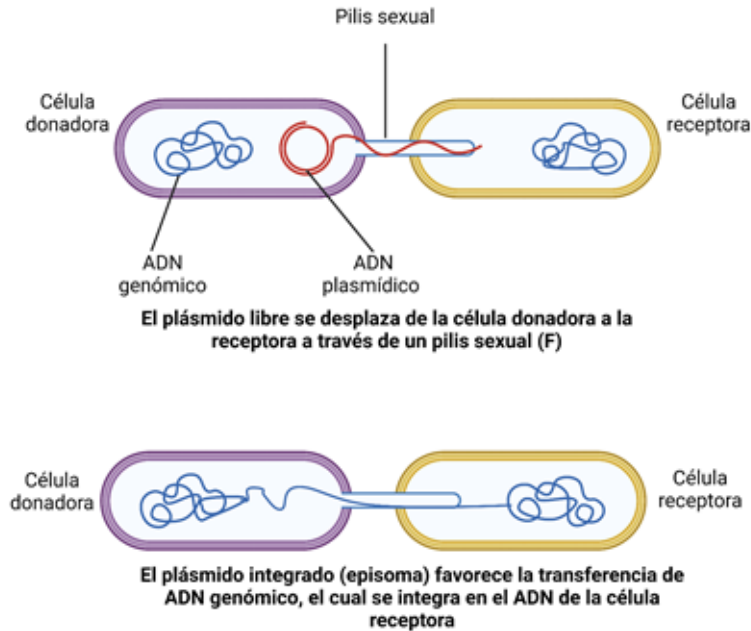


Figura 3. Esquema del mecanismo de conjugación. Elaboración propia en BioRender.com

La proteína multidominio relaxasa (MOB) término acuñado para designar a las proteínas involucradas en la movilidad de plásmidos donde la relaxasa se clasifica en 6 familias: MOB-F, MOB-P, MOB-Q, MOB-H, MOB-C y MOB-V, de las cuales existen reportes que se han encontrado tanto en plásmidos conjugativos como movilizables, por lo tanto, es el componente en común que poseen los plásmidos (Alvarado et al., 2012; Rozwandowicz et al., 2018).

El proceso de conjugación inicia cuando la relaxasa se une al oriT, puesto que corta la molécula de DNA que será transferida uniéndose de forma covalente a una sola hebra. Del mismo modo, este corte inicia una replicación del plásmido en la célula donadora presentándose al T4SS mediante la proteína T4CP, que también funciona como fuente de energía del proceso, y se transfiere el material genético a una célula receptora donde se forma en círculo (Garcillán-Barcia et al., 2009).

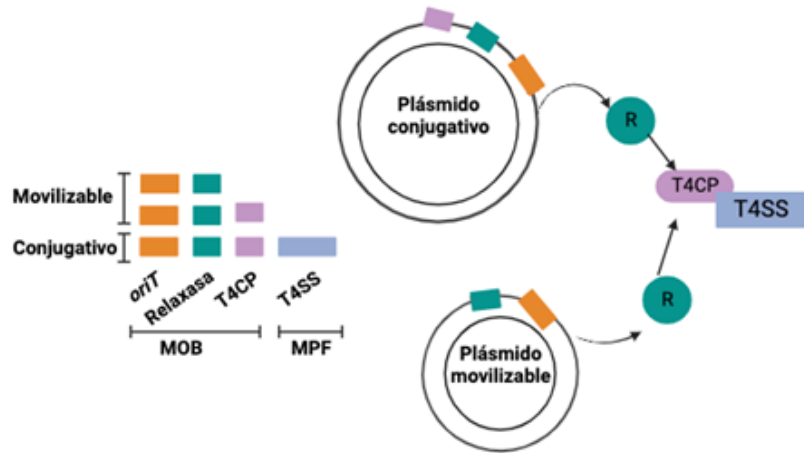


Figura 4. Componentes de los plásmidos conjugativos y movilizables. MOB: Movilizable, MPF: Formación de Pares de Apareamiento, oriT: Origen de Transferencia, R: Relaxasa, T4CP: Proteína de acoplamiento tipo 4 y T4SS: Sistema de Secreción Tipo 4. Modificado de Smillie et al., 2010. Elaborado en BioRender.com

Si bien el proceso de conjugación en las bacterias representa una ventaja para ellas, no lo es para los hospederos (seres humanos y animales), dado que se destacan diversos estudios donde, mediante este mecanismo de TGH, las bacterias patógenas han donado su material genético, que consiste generalmente en genes implicados en la virulencia y resistencia a los antibióticos incrementando así la patogenicidad a cepas comensales que normalmente se encuentran en diversas partes del cuerpo humano sin causar daño. En este sentido, una de las bacterias más estudiadas es *Escherichia coli* (*E. coli*), bacteria que es mayormente comensal en el intestino de los mamíferos, sin embargo, también es causante de infecciones diarreicas y de vías urinarias; las investigaciones realizadas en los últimos años se enfocan en el hecho de que esta bacteria transfiere genes de virulencia, como los involucrados en la producción de ciertas toxinas capaces de provocar daño al intestino, causando enfermedad a los huéspedes, así como también genes de resistencia a antibióticos principalmente a betalactámicos y quinolonas, lo cual representa un problema de salud pública según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2020), ya que cada vez es más frecuente el mal uso de estos fármacos y el intercambio de genes entre las bacterias (De Toro et al., 2014; Ayala Velasteguí, 2022; Zhang et al., 2022)

# Conclusiones

Muchas bacterias son consideradas parte de la microbiota humana y animal; a pesar de que son microorganismos que solo pueden visualizarse bajo un microscopio, resulta complejo entender su estructura celular y cómo pueden convertirse en patógenos gracias a diversos componentes, al igual que los diferentes procesos en los que participan, tales como la conjugación, que se ha descrito como uno de los principales procesos de intercambio genético entre estos microorganismos y en donde los plásmidos que portan información de virulencia y resistencia juegan un papel importante, ya que al ser móviles pueden transferirse muy fácilmente entre las células, provocando que bacterias comensales se vuelvan virulentas, incrementándose de esta manera ciertos problemas de salud pública como la resistencia a los antibióticos.

## DECLARACIÓN DE PRIVACIDAD

Los datos personales facilitados por los autores a RD-ICUAP se usarán exclusivamente para los fines declarados por la misma, no estando disponibles para ningún otro propósito ni proporcionados a terceros.

## DECLARACIÓN DE NO CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de interés alguno.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen en primer lugar a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP), al Posgrado en Microbiología y al Instituto de Ciencias (ICUAP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) por el espacio brindado para esta publicación, así como también al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT). Del mismo modo, agradecemos a la M.C Isabel Montserrat Cortez de la Puente por su asistencia y apoyo en la realización de este escrito.

# REFERENCIAS

- Alvarado, A., Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2012). A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PLoS one*, 7(7), e40438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040438>
- Ayala Velasteguí, C. D. (2022). Identificación y caracterización de plásmidos conjugativos en *Escherichia coli* resistente a fosfomicina y cefalosporinas de tercera generación aisladas de infecciones en humanos y de la industria avícola (Bachelor's thesis, Quito: UCE).
- Brooks, G. F., Morse, S. A., Carroll, K. C., & Timothy A. Mietzner & Janet S. Butel. (2011). MICROBIOLOGÍA MÉDICA. MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- Cárdenas-Perea, M. E., Cruzy López, O. R., Gándara-Ramírez, J. L., & Pérez-Hernández, M. A. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la "inteligencia" de las bacterias. *Elementos*, 94, 35-43.
- Castro, Ana Marfa. (2014). Bacteriología médica basada en problemas. Editorial EL Manual Moderno.
- Chávez Castillo, A., Arreguín Espinosa, R., Cifuentes Blanco, J., & Rodríguez Bustamante, E. (2017). ¿Cómo funcionan los microbios? *Ciencia-Academia Mexicana de Ciencias*, 68(2), 26-35.
- De Lucas, E. H., Fuciños, L. C., Martín, M. A., & Giménez, N. C. (2018). Interacciones entre el huésped y la microbiota. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(52), 3059-3065.
- De Toro, M., Garcillán-Barcia, M. P., & De La Cruz, F. (2014). Plasmid Diversity and Adaptation Analyzed by Massive Sequencing of *Escherichia coli* Plasmids. *Microbiology spectrum*, 2(6), 10.1128/microbiolspec.PLAS-0031-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0031-2014>
- Frankel, G., David, S., Low, W. W., Seddon, C., Wong, J. L., & Beis, K. (2023). Plasmids pick a bacterial partner before committing to conjugation. *Nucleic Acids Research*, 51(17), 8925-8933.
- Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., & de la Cruz, F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS microbiology reviews*, 33(3), 657-687. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x>
- López-Velandia, D. P., Torres-Caycedo, M. I., & Prada-Quiroga, C. F. (2016). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Universidad y salud*, 18(1), 190-202.
- Marcano, Daniel. (2008). El lado positivo de las bacterias. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 39 (2), 63-65.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 28, 648-656.
- Organización Mundial de la Salud (2020, 31 de Julio). Resistencia a los antibióticos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- Pérez, M., & Mota, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. *Temas de bacteriología y virología médica*, 23-42.

- Ray, C. G., & Ryan, K. J. (2010). *Sherris medical microbiology* (Vol. 6). McGraw-Hill.
- Romero, J. A. L. (2018). *Síntesis, caracterización y aplicaciones de nanotransportadores formados por tensioactivos derivados de [Ru (bpy) 3] 2* (Doctoral dissertation, Universidad de Sevilla).
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(5), 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>.
- Santos López, A. (2016). *Importancia de los plásmidos cole1 en la resistencia a antibióticos* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 74(3), 434–452. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>.
- Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar, R., & Barrientos, L. (2017). Implicancias estructurales y fisiológicas de la célula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiótica. *International Journal of Morphology*, 35(4), 1214-1223.
- Zhang, X., Chen, L., Zhang, X., Wang, Q., Quan, J., He, J., ... & Li, X. (2022). Emergence of coexistence of a novel bla<sub>NDM-5</sub>-harbouring Inc11-I plasmid and an mcr-1.1-harbouring IncHI2 plasmid in a clinical *Escherichia coli* isolate in China. *Journal of Infection and Public Health*, 15(12), 1363-1369.

Communication

# Comparative Genomics of Three Hybrid-Pathogen Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy Donors' Feces

Judith Z. Ortega-Enríquez <sup>1,2</sup>, Claudia Martínez-de la Peña <sup>1</sup>, Cristina Lara-Ochoa <sup>3</sup>, Rosa del Carmen Rocha-Gracia <sup>1</sup>, Edwin Barrios-Villa <sup>1,2,\*</sup> and Margarita M. P. Arenas-Hernández <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Graduate Program in Microbiology, Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, Mexico; judithzullim1802@gmail.com (J.Z.O.-E.); claudia.martinez@correo.buap.mx (C.M.-d.l.P.); rosa.rocha@correo.buap.mx (R.d.C.R.-G.)

<sup>2</sup> Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Departamento de Ciencias Químicas Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Campus Caborca, H. Caborca, Sonora 83621, Mexico

<sup>3</sup> Centro de Detección Biomolecular, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, Mexico; cristina.laraochoa@correo.buap.mx

\* Correspondence: edwin.barrios@unison.mx (E.B.-V.); margarita.arenas@correo.buap.mx (M.M.P.A.-H.); Tel.: +52-(637)-372-65-40 (ext. 7656) (E.B.-V.); Tel.: +52-(222)-229-55-00 (ext. 2524) (M.M.P.A.-H.)

**Abstract:** The present study shows the genomic characterization of three pathogenic *Escherichia coli* hybrid strains. All strains were previously characterized as diarrheagenic pathotypes (DEC), obtained from feces. The three sequenced strains have genes that encode adhesins (*fimH* and *iha*) and iron uptake systems (*iucC* and *iutA*). Antibiotic resistance genes were also found for fluoroquinolone and aminoglycoside families in the three strains. The presence of genomic islands (GIs) in the sequenced study strains presented 100% identity (Ec-25.2) and 99% identity (Ec-36.1) with previously reported Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains. The Ec-36.4 strain shared a 99% identity with GI from the Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) pathotype of the diarrheagenic *E. coli* strain. Ec-25.2 belongs to ST69 and harbors a FimH27 variant, while Ec-36.1 and Ec-36.4 belong to ST4238 and share a FimH54 variant. Four incompatibility groups associated with conjugative plasmids were identified (IncFIB, IncF11, IncI1, and IncB/O/K/Z), as well as Insertion Sequences and MITEs elements.

**Keywords:** *Escherichia coli*; hybrid pathogens; diarrheagenic pathotype; genome; healthy donors



**Citation:** Ortega-Enríquez, J.Z.; Martínez-de la Peña, C.; Lara-Ochoa, C.; Rocha-Gracia, R.d.C.; Barrios-Villa, E.; Arenas-Hernández, M.M.P. Comparative Genomics of Three Hybrid-Pathogen Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy Donors' Feces. *Microbiol. Res.* **2024**, *15*, 1412–1424. <https://doi.org/10.3390/microbiolres15030095>

Academic Editors: Simone Filardo, Rosa Sessa and Andrea Carolina Entrocassi

Received: 7 July 2024

Revised: 23 July 2024

Accepted: 31 July 2024

Published: 2 August 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

*Escherichia coli* is a Gram-negative rod from Enterobacterales and one of the commensal gut species. However, several clones have acquired different virulence factors (VF) that enhance their abilities to trigger a wide spectrum of diseases, such as diarrheal illness or extraintestinal ones (such as urinary tract infections, neonatal meningitis, and bloodstream infections) [1].

The *E. coli* pathobionts associated with gut infections are classically known as diarrheagenic pathotypes (DEC) [2]. Within DEC, there are six well-known pathotypes: enteropathogenic (EPEC), enterotoxigenic (ETEC), enterohemorrhagic (EHEC), enteroaggregative (EAEC), enteroinvasive (EIEC), and diffusely adherent *E. coli* (DAEC) [3]. The strains belonging to these pathotypes are classified by their interaction with the enterocyte, their epidemiology, serology, and virulence properties [4].

On the other hand, the extraintestinal infections associated with *E. coli* are caused by extraintestinal pathogenic *E. coli* strains (ExPEC). The diseases associated with these strains are sepsis and bacteremia (caused by sepsis-associated *E. coli*, SEPEC), neonatal

meningitis (caused by NMEC), and urinary tract infections (caused by uropathogenic *E. coli*, UPEC) [5].

In recent years, various *E. coli* hybrid pathotypes have been described [6]: the “hetero-pathogenic” strains are those that harbor VF characteristics of two or more DEC pathotypes (properly enteropathogens), and the “hybrid-pathogenic” strains are those that show VF from DEC and from ExPEC also [6].

The conflict arises when these virulence factors are common in different *E. coli* pathogenic strains, which can cause a severe disease expanding their sites of colonization, along with other adaptative features. They can also harbor similar resistance genes present in mobile genetic elements such as plasmids, facilitating their spread and making the disease more difficult to treat. Many studies related to the occurrence of these hybrids have been reported. The most reported cases of “hybrid-pathogenic” have been ExPEC/EAEC and ExPEC/EPEC, because it is proposed that the homology between the different genes coding for the fimbriae, which allow adhesion to the epithelium [6–9], as well as the presence of different toxins of the ETEC pathotype in samples of patients with UTI (ExPEC) [10], contributes to these associations.

The best-documented example of “hetero-pathogenic” was a severe acute gastroenteritis outbreak (EAEC) and hemolytic uremic syndrome (EHEC) [11]. Another common pathotype reported more recently in clinical samples from countries such as Sweden and South Korea has been EHEC/ETEC [12,13].

Previously, our research group reported the presence of hetero-pathogenic *E. coli* strains isolated from donors’ feces. The classification was based on the presence of DEC genetic determinants [14]. In the present work, we report the comparative genomics analysis of three hetero-pathogenic genomes—one of them being a triple hybrid.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Strains and Genome Sequencing

From a collection of 40 *E. coli* strains isolated from the feces of healthy donors obtained in Sonora, Mexico, we have chosen to sequence three previously identified strains using PCR. These strains are characterized by the presence of the genes *bfpA* (bundle-forming Pilus), *LT* (heat-labile toxin), and *daaE* (fimbrial protein). They are classified as hetero-pathogenic strains, specifically Ec-25.2 (aEPEC/ETEC), Ec-36.1 (aEPEC/ETEC/DAEC), and Ec-36.4 (aEPEC/ETEC). Notably, Ec-36.1 and Ec-36.4 are clones obtained from the same donor sample [14]. The strains were inoculated in 5 mL of Luria–Bertani (LB) broth for genomic DNA extraction and grown overnight at 37 °C. Genomic DNA was extracted with the Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA extraction kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) following the manufacturer’s directions. The DNA concentration was determined with a Quantus<sup>®</sup> fluorometer (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and the QuantiFluor<sup>®</sup> dsDNA System (Promega Corporation, USA). The total genomic DNA was sequenced on an Illumina NovaSeq 6000 sequencer (Iowa City, IA, USA) producing 2 × 151 bp paired end reads with an 80× depth at SeqCenter (Pittsburgh, PA, USA) [15].

### 2.2. Assembly and Annotation

Assemblies of the draft genomes were completed using SPAdes (v3.15.4) [16] and annotated using RAST [17] and the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [18]. All the open reading frames were blasted against *E. coli* ETEC H10407 (accession number FN649414) as the reference genome and selected based on a relatedness prediction by NCBI BLAST; this is the pathotype shared by the three sequenced strains. The assembly characteristics are summarized in Supplementary Materials Table S1.

### 2.3. Bioinformatic Analysis

The genomic islands (GI) in the assemblies were determined with the IslandViewer4 tool [19], using three independent methods for island prediction (IslandPick, IslandPath-DIMOB, and SIGI-HMM), and *E. coli* ETEC H10407 was used as control strain. Then, the predicted GIs were searched in BLAST for previously reported genomic islands. The Proksee online tool was used to generate circular maps and sequence comparisons through average nucleotide identity (ANI) (accessed 7 May 2024 at <https://proksee.ca/>) [20,21].

Several services of the Center for Genomic Epidemiology were used with default settings unless otherwise noted: SeroTypeFinder [22] (for serotype prediction); *fimH* variants were determined by database matching in FimTyper [23]; the presence of antimicrobial resistance genes was analyzed by ResFinder [24–28] and the CARD database [29]; and likewise, the virulence genes (VirulenceFinder) [28,30,31]. Mobile genetic elements, such as plasmids and insertion sequences, were identified with MobileElementFinder [30] and PlasmidFinder [31]. The multiple locus sequence typing was determined with MLST 2.0 [32–37]. Finally, to infer the phylogenetic relationship, we completed the calling and filtering of single nucleotide polymorphisms (SNPs) with CSI Phylogeny (v1.4) using default settings [38] and the iTol [39] platform for generating the images. Different genomes were used to infer the phylogenetic relationship, including some belonging to DEC as well as ExPEC pathotypes (Supplementary Materials Table S2).

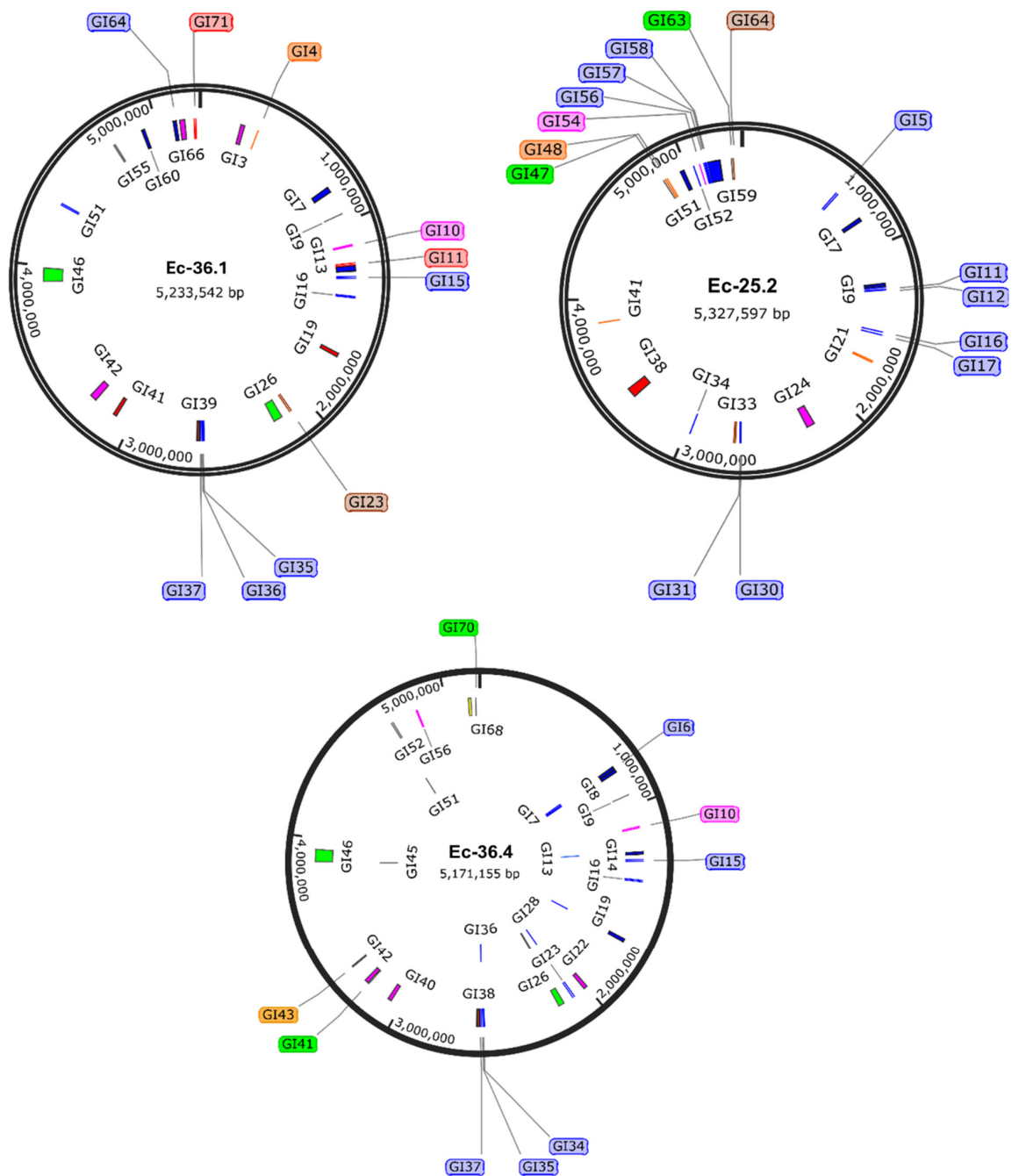
## 3. Results and Discussion

### 3.1. General Features of the Hybrid Strains

The Ec-25.2 strain belongs to phylogroup A and Ec-36.1 and Ec-36.4 to phylogroup B2. The genomic features are summarized in Supplementary Materials Table S1. The Ec-25.2 genome presented a 100% identity with the genomes UMN026 and 118UI, which are classified as ExPEC and were recovered from urine samples (accession number CU928163.2 and CP032515.1, respectively). Genomic islands were predicted using BLAST against publicly available genomes of *E. coli*. Most of the genomic islands found for the three sequenced strains correspond to genomic islands of phage origin and mobile genetic elements such as plasmids and insertion sequences (Figure 1).

In the same way, the Ec-36.1 assembly showed a 99.97% identity with the genome KE58 (accession number CP141075.1) recovered from a urine sample in Dallas, Texas of a female patient with recurrent urinary tract infections. This finding is interesting because Sonora (where the samples were isolated) has a border with the United States; these relationships in the identity of the genomes between strains may be due to the high migration that exists, causing patients who are carriers of *E. coli* to transmit the bacteria in different regions. Another strain with 99.97% identity was ETEC6329F (accession number CP122609.1), documented as ETEC, similar to our isolate. On the other hand, the Ec-36.4 genome kept a 99.97% identity with 184/2aE (accession number CP072858.1), a strain isolated in Brazil from the feces of a traveler returning from sub-Saharan Africa (Supplementary Materials Figure S1).

The in silico sequence-type analysis showed that Ec25.2 belonged to ST69; this ST has been previously reported in clinical strains associated with urinary and blood infections [40]. However, Matsui et al., 2020 showed a wide distribution of ST69 among strains recovered from the feces of healthy donors and patients with urinary tract infections [41]. On the other hand, both Ec-36.1 and Ec-36.4 belonged to ST4238, first reported in 2014 in a strain isolated from a child with diarrhea and identified as ETEC in Colombia [42]. Interestingly, when the in silico serotype was performed, we observed that the three genomes were serotyped as H4, similar to the ETEC Colombian strain, suggesting a regional distribution of *E. coli* strains belonging to ST4238 and associated with ETEC in America (Supplementary Materials Figure S2).



**Figure 1.** Map of the genomic islands (GIs) found in the analyzed genomes. GIs found in the sequenced strains (Supplementary Materials Table S1). Ec-25.2 has more GIs of phage origin and does not show the GI46 corresponding to mobile genetic elements compared to the other two strains (Ec-36.1 and 36.4). The strains Ec-36.1 and Ec-36.4 share mainly GIs of phage origin and mobile genetic elements. GIs are highlighted based on their origin or function: Phages in blue; mobile genetic elements, green; virulence GIs, pink; related to adhesion as fimbriae, orange; toxin–antitoxin systems, yellow; antibiotic resistance GIs.

### 3.2. Resistance and Virulence Features

Ec-25.2 harbors *fimH27*, which has been described in isolates from human urine and blood [43] (Table 1). In a previous study, Barrios-Villa et al., in 2020, reported the *fimH27* allele in ExPEC strains belonging to the AIEC pathotype, as well as in EIEC and K12 genomes [44]. The *fimH54* allele found in Ec-36.1 and Ec-36.4 has been previously reported in strains isolated from urine samples and from vegetables in Portugal [45,46]. The *fimH54*

allele was also found in human diarrheagenic samples identified as aEPEC/ExPEC hybrid pathotypes [47]. Likewise, other authors have associated *fimH54* with strains of avian pathogenic *E. coli* (APEC) [48,49]. This antigenic variability of the fimbria could have important implications in the colonization of different microenvironments, making these strains capable of causing different infections.

**Table 1.** Resistance genes, virulence, and MGEs in the genomes of sequenced hybrid strains.

Strain	Ec-25.2	Ec-36.1	Ec-36.4
<i>fimH</i> variant	<i>fimH27</i>	<i>fimH54</i>	<i>fimH54</i>
Resistance genes	<b>Fluoroquinolones</b> ( <i>qnrB19</i> ); <b>Aminoglycosides</b> ( <i>aadA5</i> ; <i>aac</i> (6′)- <i>lb-cr</i> ); <b>Sulfonamides</b> ( <i>sul1</i> ); <b>Sulfamethoxazole-Trimethoprim</b> ( <i>dfra17</i> );	<b>Aminoglycosides</b> ( <i>aac</i> (6′)- <i>lb-cr</i> ); <b>Fluoroquinolones</b> ( <i>qnrB</i> )	<b>Aminoglycosides</b> ( <i>aac</i> (6′)- <i>lb-cr</i> ); <b>Fluoroquinolones</b> ( <i>qnrB</i> )
Disinfectant	<i>sitABCD</i> (hydrogen peroxide), <i>qacE</i> (benzylconium chloride, ethidium bromide, chlorhexidine, cetylpyridinium chloride)	NF	NF
Efflux pumps associated with antibiotic resistance	<b>Fluoroquinolones</b> ( <i>evgA</i> , <i>mdtH</i> , <i>marA</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> ); <b>Tetracycline</b> ( <i>emrY</i> , <i>evgA</i> , <i>marA</i> ); <b>Macrolides</b> ( <i>evgA</i> ); <b>Monobactams</b> ( <i>marA</i> ); <b>Carbapenems</b> ( <i>marA</i> ); <b>Cephalosporins</b> ( <i>marA</i> ).	<b>Macrolides</b> ( <i>tolC</i> , <i>evgA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> ); <b>Tetracyclines</b> ( <i>evgA</i> , <i>emrY</i> ); <b>Nitroimidazole</b> ( <i>msbA</i> ); <b>Fluoroquinolones</b> ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); <b>Aminoglycosides</b> ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); <b>Carbapenems</b> ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); <b>Cephalosporins</b> ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> , <i>evgA</i> , <i>evgS</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>acrE</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); <b>Phenicol</b> ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrA</i> , <i>emrB</i> , <i>evgS</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>acrE</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> )	<b>Macrolides</b> ( <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> ); <b>Tetracyclines</b> ( <i>evgA</i> , <i>emrY</i> ); <b>Streptogramin b</b> ( <i>msr(A)</i> ); <b>Nitroimidazole</b> ( <i>msbA</i> ); <b>Fluoroquinolones</b> ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); <b>Aminoglycosides</b> ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); <b>Carbapenems</b> ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); <b>Cephalosporins</b> ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrB</i> , <i>evgS</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>acrE</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> ); <b>Phenicol</b> ( <i>tolC</i> , <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtH</i> , <i>emrR</i> , <i>emrA</i> , <i>emrB</i> , <i>evgS</i> , <i>evgA</i> , <i>acrS</i> , <i>acrE</i> , <i>marA</i> , <i>gadX</i> , <i>mdtE</i> , <i>kdpDE</i> , <i>cpxA</i> )
Virulence genes	<i>chuA</i> , <i>cia</i> , <i>eilA</i> , <i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>gad</i> , <i>hlyE</i> , <i>iha</i> , <i>irp2</i> , <i>iss</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>kpsE</i> , <i>kpsMII_K52</i> , <i>lpfA</i> , <i>ompT</i> , <i>papA</i> , <i>papC</i> , <i>sat</i> , <i>senB</i> , <i>sitA</i> , <i>terC</i> , <i>traJ</i> , <i>traT</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i> <b>Plasmids:</b> Col156, Col440I, Col(pHAD28), IncFIB, IncF11, Inc11-1. <b>Insertion Sequences:</b> IS629, ISEc46, ISEc38, ISKpn26, ISEc45. <b>Miniature Inverted Repeat:</b> MITEEc1.	<i>afaD</i> , <i>capU</i> , <i>cea</i> , <i>colE5</i> , <i>csgA</i> , <i>fimH</i> , <i>hlyE</i> , <i>iha</i> , <i>ireA</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>shlB</i> , <i>sigA</i> , <i>traT</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i> <b>Plasmids:</b> IncB/O/K/Z. <b>Insertion Sequence:</b> IS609, IS5, ISEc38, ISSf3. <b>Miniature Inverted Repeat:</b> MITEEc1	<i>afaD</i> , <i>capU</i> , <i>cea</i> , <i>colE5</i> , <i>csgA</i> , <i>fimH</i> , <i>hlyE</i> , <i>iha</i> , <i>ireA</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>shlB</i> , <i>sigA</i> , <i>traT</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i> <b>Plasmids:</b> IncB/O/K/Z. <b>Insertion Sequences:</b> ISEc18, IS609, IS5, ISSso4, ISEc38, IS256, ISSf3, ISSha1. <b>Miniature Inverted Repeat:</b> MITEEc1.

**MGE:** Mobile genetic element; *chuA*: Outer membrane hemin receptor; *cia*: Colicin; *eilA*: *Salmonella* HilA homolog; *fimH*: Type 1 fimbriae; *fyuA*: Yersiniabactin siderophore receptor; *gad*: Glutamate decarboxylase; *hlyE*: Avian *E. coli* haemolysin; *ireA*: Siderophore receptor; *iha*: Adherence protein; *irp2*: High molecular weight protein 2 non-ribosomal peptide synthetase; *iss*: Increased serum survival; *iucC*: Aerobactin synthetase; *iutA*: Ferric aerobactin receptor; *kpsE*: Capsule polysaccharide export inner-membrane protein; *kpsMII\_K52*: Polysialic acid transport protein; Group 2 capsule; *lpfA*: Long polar fimbriae; *ompT*: Outer membrane protease (protein protease 7); *papA*: Major pilin subunit F16; *papC*: Outer membrane usher P fimbriae; *sat*: Serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATE); *senB*: Plasmid-encoded enterotoxin; *shlB*: Homologs of the *Shigella flexneri* SHI-2 Pathogenicity island gene *shlA*; *sigA*: Serine protease autotransporters of *enterobacteriaceae* (SPATE); *sitA*: Iron transport protein; *terC*: Tellurium ion resistance protein; *traJ*: Positive regulator of conjugal transfer operon; *traT*: Outer membrane protein complement resistance; *yehA*: Outer membrane lipoprotein, YHD Fimbrial cluster; *yehB*: Usher, Yhd fimbrial cluster; *yehC*: Chaperone, YHD fimbrial cluster; *yehD*: Major pilin subunit YHD fimbrial cluster; *afaD*: Afimbrial adhesion; *capU*: Hexosyltransferase homolog; *cea*: Colicin E1; *colE5*: Colicin E5 lysis protein Lys; *sitABCD*: System mediates the transport of iron and manganese; *qacE*: Detection of biocide resistance genes; *evgA*: Positive regulator for efflux protein complexes EmrKY and MdtEF; *mdtH*: Multidrug resistance protein; *emrR*: Negative regulator for the EmrAB-TolC multidrug efflux pump; *emrB*: Translocase in the EmrB-TolC efflux protein; *qnrB19*: Plasmid-mediated quinolone resistance protein; *emrY*: Multidrug transport that moves substrates across the inner membrane of the gram-negative; *aadA5*: Aminoglycoside nucleotidyltransferase Gene; *sul1*: Sulfonamide resistant dihydropteroate synthase; *dfra17*: Integron-encoded dihydrofolate reductase; *tolC*: Protein subunit of many multidrug efflux complexes; protein subunit of AcrA-AcrB-TolC multidrug efflux complex. *acrA*: Represents the periplasmic portion of the transport protein; *acrB*: Functions as a heterotrimer which forms the inner membrane component; *acrE*: Membrane fusion protein, similar to *acrA*; *acrS*: Repressor of the AcrAB efflux complex and is associated with the expression of AcrEF; *gadX*: AraC-family regulator that promotes *mdtE* expression to confer multidrug resistance; *mdtE*: Membrane fusion protein of the *mdtE* multidrug efflux complex; *kdpDE*: Two-component regulatory system in *Escherichia coli*. role in potassium transport and homeostasis; *cpxA*: Membrane-localized sensor kinase that is activated by envelope stress; *marA*: Transcriptional activator of genes involved in the multiple antibiotic resistance; *msbA*: Member of the MDR-ABC transporter group, transports lipid A; *msr(A)*: Methionine sulfoxide reductase A; *mph(C)*: Macrolide phosphotransferases; **NF:** Not found.

The Ec-25.2 genome showed the presence of genetic resistance determinants to fluoroquinolone, aminoglycosides, sulfonamides, carbapenems, and cephalosporines. Ec-36.1 and Ec-36.4 genomes presented genes associated with resistance to fluoroquinolones, macrolides, aminoglycosides, cephalosporins, tetracyclines, nitroimidazole, and phenicol; it is important to note that both strains were recovered from the same sample. It was found that all three genomes show mechanisms of antibiotic resistance, including reduced antibiotic permeability, altered antibiotic fate, and a suggested antibiotic efflux pump which is also involved in other functions such as detoxification and permeability modification (Table 1).

On the other hand, the Virulence Finder tool revealed the presence of genes involved in iron uptake, fimbriae, non-fimbrial adhesins, and toxins involved in *E. coli* pathogenicity. The common virulence genes for the three strains were *fimH* (Type 1 fimbriae), *iucC* (aerobactin synthetase), *iutA* (ferric aerobactin receptor), *iha* (adherence protein), *traT* (outer membrane protein involved in complement resistance) and *hlyE* (Avian *E. coli* haemolysin), but also presented homologous genes present in other genera such as *eilA* (*hilA* homolog from *Salmonella*) and *shiB* (homologs of the *Shigella flexneri* SHI-2 pathogenicity island gene *shiA*), which can represent an important horizontal gene transfer mechanism among enterobacteria coexisting in the host, causing more severe signs and symptoms, complicating the disease (Table 1).

### 3.3. Mobilizable Genetic Elements (MGEs)

Based on replicon typing, Plasmid Finder showed four plasmid incompatibility groups in the Ec-25.2 genome [Col(pHAD28), IncFIB, IncF11, IncI1-1]. On the other hand, plasmids with Col(pHAD28) have been previously reported in *Salmonella* strains obtained from dairy farm samples in Mexico, as well as from poultry in Nigeria [50,51]. These plasmids have been reported in strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Cronobacter sakazakii*, and *E. coli* carrying resistance genes to aminoglycosides [52,53]. On the other hand, the plasmids IncFIB, IncF11, and IncI1-1 are the most common in *E. coli*; these plasmids are conjugative and usually harbor resistance and virulence genes [54]. In addition, it has been reported that plasmid IncB/O/K/Z might be found in strains of both clinical and food origin in the *Enterobacteriaceae* family, as reported by Balbuena-Alonso et al., 2022, and carries resistance genes to azithromycin in strains of *K. pneumoniae*, which agrees with our results, suggesting that this plasmid is distributed within the *Enterobacteriaceae* family [55,56].

Other MGEs, such as transposons, integrons, and insertion sequences (*IS*), can collect or move genes within the host genome and jump across genomes, molding and coevolving with chromosomes [57]. *IS* are small mobile elements (~0.7 to ~2.5 kbp) and are found in most bacterial genomes, they are the simplest type of bacterial transposable element and generally contain a gene necessary for its transposition. Insertions inside or between genes have the potential to create a mutation, alter promoter function, also create hotspots for genome recombination events, or even induce positive regulation of neighboring genes [58]. In our study, we found *IS629* inside the Ec-25.2 genome, a member of the *IS3* family whose mobility mechanism is believed to be a replicative transposition (“copy and paste”). This *IS* contains genes associated with VF as adhesins and fimbriae (*iha*, *papC*, and *papA*). *IS629* has been reported in verotoxin-producing *E. coli* (VTEC) serotype O157:H7 and is considered the main cause of severe gastrointestinal infections [59]. Additionally, Ec-25.2 also harbors *ISKpn26*, with the *yehABCD* fimbrial operon, this *IS* has been reported in *K. pneumoniae* and is mostly associated with IncFII and IncFIB plasmids [60]. *ISEc45* (VF as *iucC*, *sat*, and *iutA*) and *ISEc46* (VF as *irp2* and *fyuA*) were also found. These findings show that despite being commensal bacteria, they have an important virulence and resistance background that makes them potentially pathogenic.

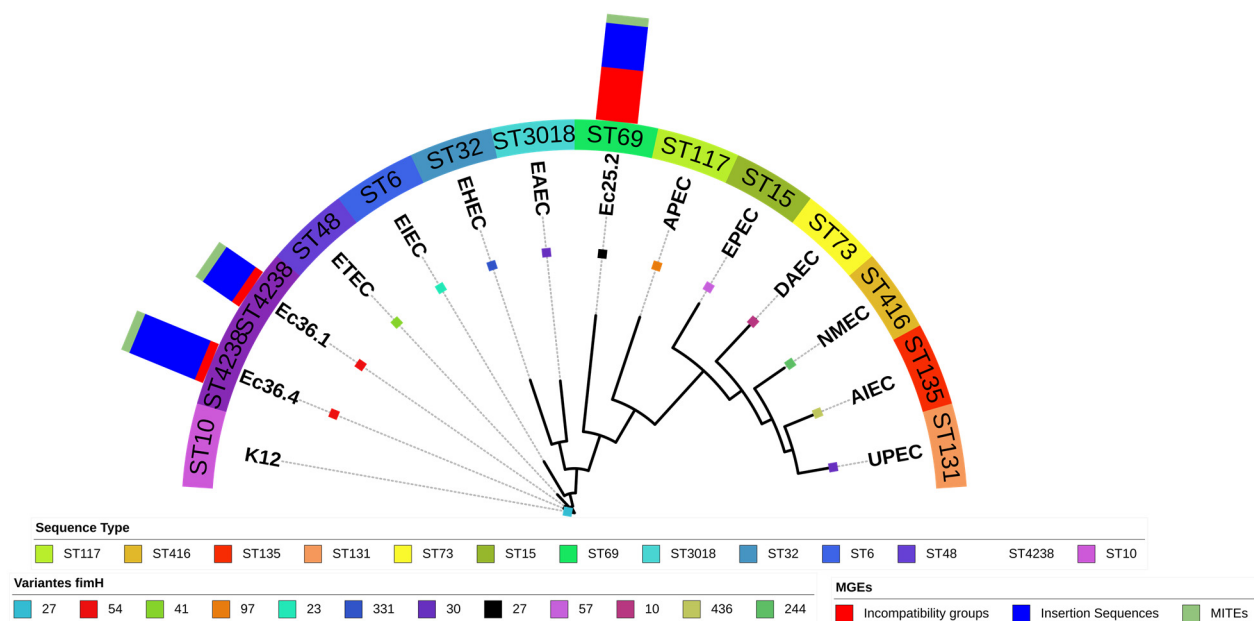
The *ISEc18* belongs to the *IS481* family, found in the genomes Ec-36.1 and Ec-36.4, and has been reported in plasmids encoding for the LT (heat-labile enterotoxin) and ST (heat-stable enterotoxin) enterotoxin characteristic of the ETEC pathotype; this finding is

consistent with previous characterization of these hybrid strains [61]. In our study, the *afaD* gene (encoding for a fimbrial adhesin) was observed close to *ISEc18*.

Other mobile genetic elements found in our genomes were the miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs). The first prokaryotic MITE was discovered in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* [62]. MITEs are a group of non-autonomous class II transposons abundant in eukaryotic genomes, mainly in plants, and are structurally characterized by their relatively small size (generally 50–500 bp long), high copy number, tendency to integrate into AT-rich intergenic regions of the genome, a lack of coding capacity, and are often found close to or within genes where they may affect gene expression [63–66]. It is suggested that these elements have influenced the evolution of individual genomes and genes [65]. The MITEEc1 was found in the three genomes sequenced and this MITE has also been reported in other bacteria, such as *Salmonella* [66].

### 3.4. Phylogeny

A phylogenetic tree based on UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) was constructed according to the SNPs found for each strain, the SNPs variant calling, and phylogeny showed that the Ec-36.1 and Ec-36.4 genomes are part of a clade next to ETEC (Figure 2). This is an expected finding since these strains were characterized by Méndez-Moreno et al. as hybrid pathogens showing genetic determinants associated with ETEC [14]. The Ec25.2 genome belongs to a clade closely related to APEC (Avian Pathogenic *E. coli*), corresponding to the ExPEC pathotype, but also related to EPEC, which is one of the pathotypes with which it was previously associated (Figure 2) [14].



**Figure 2.** UPGMA SNP-based phylogenetic tree. Graphic representation of the SNPs variant calling of the genomes Ec-25.2, Ec-36.1, and Ec-36.4 and compared against those obtained from the reference genomes (Supplementary Materials Table S3). Squares at branch tips represent the *fimH* variant; colored strips indicate the ST (sequence type) to which the genome belongs; the multiple chart bar represents the number of MGEs (Mobile Genetic Elements). EPEC (enteropathogenic *E. coli* E2348/69), ETEC (enterotoxigenic *E. coli* H10407), EHEC (enterohemorrhagic *E. coli* 10942), EAEC (enteroaggregative *E. coli* SAMEA7457016), EIEC (enteroinvasive *E. coli* 53638), and DAEC (diffusely adherent *E. coli* SK1144), UPEC (uropathogenic *E. coli* CFT073), APEC (Avian Pathogenic *E. coli* 102026), AIEC (adherent-invasive *E. coli* LF82), NMEC (neonatal meningitis *E. coli* NMEC O18) and *E. coli* K12 (commensal).

Bioinformatic analysis suggested that the three analyzed genomes belong to hybrid pathotypes. The Ec-25.2 genome, previously reported as (aEPEC/DEC), includes virulence factors defining ExPEC (UPEC), as well as the presence of GI with a BLAST 100% identity from UPEC genomes. On the other hand, the phylogeny showed that genome assemblies of Ec-36.1 (aEPEC/ETEC/DAEC) and Ec-36.4 (aEPEC/ETEC) are grouped in a clade including genomes belonging to diarrheagenic pathotypes. Interestingly, BLAST analysis showed 99% identity between the genomes of Ec-36.1 and Ec-36.4 with those of strains isolated from feces classified as ETEC, in agreement with the classification by Méndez-Moreno et al. in 2022 [14]. These results suggest that these strains must be considered as heteropathogenic-hybrid *E. coli*.

The strains Ec-36.1 and Ec-36.4 were isolated from the same patient, which makes it logical that they share virulence and resistance characteristics, as well as the presence of markers of the diarrhoeagenic pathotypes aEPEC/ETEC; however, the strain Ec-36.1 has the *daaE* adhesin gene corresponding to the DAEC pathotype, which may have been acquired during the horizontal gene transfer.

This work contributes to understanding the genetic diversity and adaptability of hybrid-pathogenic *E. coli* strains. The findings highlight the potential public health risks posed by these strains, particularly in regions with high migration rates. By identifying key resistance and virulence determinants, the study underscores the necessity for continuous monitoring and development of effective treatment protocols to manage infections caused by such multidrug-resistant pathogens. Moreover, this comparative genomics approach provides a valuable framework for future research on the evolution and spread of pathogenic *E. coli* strains. The data generated can inform public health policies and help devise strategies to mitigate the spread of these bacteria. Overall, this report contributes significantly to the field of microbiology and epidemiology understanding the dynamics of multidrug-resistant *E. coli* in human populations.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microbiolres15030095/s1>, Figure S1: Maps constructed in Proksee, showing the comparison between the genomes of the present study with reference genomes previously reported in NCBI, Figure S2: Regional distribution of *E. coli* Sequence Types (STs) and Serotypes in America; Table S1: General Features of Sequenced Strains of pathogenic-hybrid *E. coli*, Table S2: Genomes used as control for phylogenetic analysis, Table S3: Representative Genes of The Different Genomic Islands Found in the Sequenced Strains of pathogenic-hybrid *E. coli* (IslandViewer) [67–90].

**Author Contributions:** J.Z.O.-E., Data Curation, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing—Original Draft. C.M.-d.I.P., Methodology, Visualization, Writing—Review & Editing. C.L.-O., Methodology, Visualization, Writing—Review & Editing. R.d.C.R.-G., Methodology, Visualization, Validation, Writing—Review & Editing. E.B.-V., Conceptualization, Funding acquisition, Project Administration, Resources, Visualization, Writing—Review & Editing. M.M.P.A.-H., Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing—Review & Editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by Universidad de Sonora under the Convocatoria para Apoyo a Proyectos Internos 2023, project number USO413008356, and by Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP), BUAP through the project VIEP-2023 “Análisis del Genoma de *E. coli* Uropatógena y Comensal para la Prevención, Control y Tratamiento Adecuados de la Infección de Tracto Urinario”. JZOE received a CONAHCYT scholarship number 824608.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The authors confirm all supporting data, code, and protocols have been provided within the article or through Supplementary Data Files. The draft genome of *E. coli* Ec-36.1, *E. coli* Ec-36.4, and Ec-25.2 has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession JAYMYX000000000, JAYSGM000000000, and JAYSGN000000000, respectively. The versions described in this paper are versions JAYMYX010000000, JAYSGM010000000, JAYSGN010000000.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank M.C. Isabel Montserrat Cortez de la Puente for her help, guidance, and support in preparing this paper.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Erjavec, M.S. *The Universe of Escherichia coli*; IntechOpen: London, UK, 2019. Available online: <https://www.intechopen.com/books/6970> (accessed on 25 February 2024).
2. Águila Sánchez, A.; Rodríguez, A.; Fernández Abreu, A.; Cruz Infante, Y.; Bravo Fariñas, L.; Hernández Martínez, J.L. *Escherichia coli* diarreogénicos, identificación de patotipos y fenotipos de resistencia antimicrobiana en aislados cubanos. *Rev. Cuba. Med. Trop.* **2020**, *72*, 1–19.
3. Torres, A.G. *Escherichia coli in the Americas*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2016.
4. Farfán-García, A.E.; Ariza-Rojas, S.C.; Vargas-Cárdenas, F.A.; Vargas-Remolina, L.V. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev. Chil. Infectología* **2016**, *33*, 438–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Geurtsen, J.; De Been, M.; Weerdenburg, E.; Zomer, A.; McNally, A.; Poolman, J. Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **2022**, *46*, fuac031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. De Mello Santos, A.C.; Fernandez Santos, F.; Silva, R.M.; Gomes, T.A.T. Diversity of hybrid-and hetero-pathogenic *Escherichia coli* and their potential implication in more severe diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 339. [[CrossRef](#)]
7. 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. Frequency and diversity of hybrid *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections. *Microorganisms* **2021**, *9*, 693. [[CrossRef](#)]
8. Tanabe, R.H.S.; Dias, R.C.B.; Orsi, H.; de Lira, D.R.P.; Vieira, M.A.; dos Santos, L.F.; Ferreira, A.M.; Rall, V.L.M.; Mondelli, A.L.; Gomes, T.A.T.; et al. Characterization of Uropathogenic *Escherichia coli* Reveals Hybrid Isolates of Uropathogenic and Diarrheagenic (UPEC/DEC) *E. coli*. *Microorganisms* **2022**, *10*, 645. [[CrossRef](#)]
9. Nunes, K.O.; Santos, A.C.P.; Bando, S.Y.; Silva, R.M.; Gomes, T.A.T.; Elias, W.P. Enteroaggregative *Escherichia coli* with uropathogenic characteristics are present in feces of diarrheic and healthy children. *Pathog. Dis.* **2017**, *75*, ftx106. [[Cross-Ref](#)] [[PubMed](#)]
10. Salmani, H.; Azarnezhad, A.; Fayazi, M.R.; Hosseini, A. Pathotypic and Phylogenetic Study of Diarrheagenic *Escherichia coli* and Uropathogenic *E. coli* Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Jundishapur J. Microbiol.* **2016**, *9*, e28331. [[CrossRef](#)]
11. Frank, C.; Werber, D.; Cramer, J.P.; Askar, M.; Faber, M.; an der Heiden, M.; Krause, G. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 outbreak in Germany. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 1771–1780. [[CrossRef](#)]
12. Bai, X.; Zhang, J.; Ambikan, A.; Jernberg, C.; Ehrlich, R.; Scheutz, F.; Matussek, A. Molecular characterization and comparative genomics of clinical hybrid Shiga toxin-producing and enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) strains in Sweden. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 5619. [[CrossRef](#)]
13. Lee, W.; Kim, M.H.; Sung, S.; Kim, E.; An, E.S.; Kim, S.H.; Kim, S.H.; Kim, H.Y. Genome-Based Characterization of Hybrid Shiga Toxin-Producing and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Strains Isolated in South Korea, 2016–2020. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Méndez-Moreno, E.; Caporal-Hernandez, L.; Méndez-Pfeiffer, P.; Enciso-Martínez, Y.; De la Rosa López, R.; Valencia, D. Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy Donors, including a Triple Hybrid Strain. *Antibiotics* **2022**, *11*, 833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ortega-Enríquez, J.Z.; Arenas-Hernández, M.M.; Barrios-Villa, E. Draft genome sequence of a triple hybrid *Escherichia coli* strain isolated from a healthy donor feces. *Microbiol. Resour. Announc.* **2014**, *13*, e00113-24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* **2012**, *19*, 455–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Aziz, R.K.; Bartels, D.; Best, A.A.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, R.A.; Formsma, K.; Gerdes, S.; Glass, E.M.; Kubal, M.; et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genom.* **2008**, *9*, 75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Tatusova, T.; DiCuccio, M.; Badretdin, A.; Chetvernin, V.; Nawrocki, E.P.; Zaslavsky, L.; Lomsadze, A.; Pruitt, K.D.; Borodovsky, M.; Ostell, J. NCBI Prokaryotic Genome Annot. Pipeline. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 6614–6624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Bertelli, C.; Laird, M.R.; Williams, K.P.; Simon Fraser University Research Computing Group; Lau, B.Y.; Hoad, G.; Winsor, G.L.; Brinkman, F.S.L. IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W30–W35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Grant, J.R.; Enns, E.; Marinier, E.; Mandal, A.; Herman, E.K.; Chen, C.Y.; Graham, M.; Van Domselaar, G.; Stothard, P. Proksee: In-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, W484–W492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Jain, C.; Rodriguez-R, L.M.; Phillippy, A.M.; Konstantinidis, K.T.; Aluru, S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5114. [[CrossRef](#)]
22. Joensen, K.G.; Tetzschner, A.M.; Iguchi, A.; Aarestrup, F.M.; Scheutz, F. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* using whole genome sequencing (WGS) data. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 2410–2426. [[CrossRef](#)]
23. Roer, L.; Tchesnokova, V.; Allesøe, R.; Muradova, M.; Chattopadhyay, S.; Ahrenfeldt, J.; Thomsen, M.C.F.; Lund, O.; Hansen, F.; Hammerum, A.M.; et al. Development of a Web Tool for *Escherichia coli* Subtyping Based on fimH Alleles. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 2538–2543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. 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.; et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 3491–3500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zankari, E.; Allesøe, R.; Joensen, K.G.; Cavaco, L.M.; Lund, O.; Aarestrup, F.M. PointFinder: A novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *72*, 2764–2768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Camacho, C.; Coulouris, G.; Avagyan, V.; Ma, N.; Papadopoulos, J.; Bealer, K.; Madden, T.L. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinform.* **2009**, *10*, 421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Alcock, B.P.; Huynh, W.; Chalil, R.; Smith, K.W.; Raphenya, A.R.; A Wlodarski, M.; Edalatmand, A.; Petkau, A.; A Syed, S.; Tsang, K.K.; et al. CARD 2023: Expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, D690–D699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Joensen, K.G.; Scheutz, F.; Lund, O.; Hasman, H.; Kaas, R.S.; Nielsen, E.M.; Aarestrup, F.M. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 1501–1510. [[CrossRef](#)]
29. Malberg Tetzschner, A.M.; Johnson, J.R.; Johnston, B.D.; Lund, O.; Scheutz, F. In Silico Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, e01269–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Johansson MH, K.; Bortolaia, V.; Tansirichaiya, S.; Aarestrup, F.M.; Roberts, A.P.; Petersen, T.N. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *J. Antimicrob. Chemother.* **2021**, *76*, 101–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Carattoli, A.; Zankari, E.; Garcia-Fernandez, A.; Voldby Larsen, M.; Lund, O.; Villa, L.; Aarestrup, F.M.; Hasman, H. PlasmidFinder and pMLST: In silico detection and typing of plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 3895–3903. [[CrossRef](#)]
32. Larsen, M.; Cosentino, S.; Rasmussen, S.; Rundsten, C.; Hasman, H.; Marvig, R.; Jelsbak, L.; Sicheritz-Pontón, T.; Ussery, D.; Aarestrup, F.; et al. Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **2021**, *50*, 1355–1361. [[CrossRef](#)]
33. Bartual, S.; Seifert, H.; Hippler, C.; Luzon, M.; Wisplinghoff, H.; Rodríguez-Valera, F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 4382–4390. [[CrossRef](#)]
34. Griffiths, D.; Fawley, W.; Kachrimanidou, M.; Bowden, R.; Crook, D.; Fung, R.; Golubchik, T.; Harding, R.; Jeffery, K.; Jolley, K.; et al. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 770–778. [[CrossRef](#)]
35. Lemee, L.; Dhalluin, A.; Pestel-Caron, M.; Lemeland, J.; Pons, J. Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 2609–2617. [[CrossRef](#)]
36. Wirth, T.; Falush, D.; Lan, R.; Colles, F.; Mensa, P.; Wieler, L.; Karch, H.; Reeves, P.; Maiden, M.; Ochman, H.; et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* **2006**, *60*, 1136–1151. [[CrossRef](#)]
37. Jauregui, F.; Landraud, L.; Passet, V.; Diancourt, L.; Frapy, E.; Guigon, G.; Carbonnelle, E.; Lortholary, O.; Clermont, O.; Denamur, E.; et al. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* Strains. *BMC Genom.* **2008**, *9*, 560. [[CrossRef](#)]
38. Kaas, R.S.; Leekitcharoenphon, P.; Aarestrup, F.M.; Lund, O. Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104984. [[CrossRef](#)]
39. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W293–W296. [[CrossRef](#)]
40. Doumith, M.; Day, M.; Ciesielczuk, H.; Hope, R.; Underwood, A.; Reynolds, R.; Wain, J.; Livermore, D.M.; Woodford, N. Rapid identification of major *Escherichia coli* sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 160–166. [[CrossRef](#)]
41. Matsui, Y.; Hu, Y.; Rubin, J.; de Assis, R.S.; Suh, J.; Riley, L.W. Multilocus sequence typing of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infection patients and from fecal samples of healthy subjects in a college community. *MicrobiologyOpen* **2021**, *9*, 1225–1233. [[CrossRef](#)]
42. Guerra, J.A.; Romero-Herazo, Y.C.; Arzuza, O.; Gómez-Duarte, O.G. Phenotypic and genotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* clinical isolates from northern Colombia, South America. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 236260. [[CrossRef](#)]
43. Liu, C.M.; Stegger, M.; Aziz, M.; Johnson, T.J.; Waits, K.; Nordstrom, L.; Gauld, L.; Weaver, B.; Rolland, D.; Statham, S.; et al. *Escherichia coli* ST131-H22 as a Foodborne Uropathogen. *mBio* **2018**, *9*, e00470-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Barrios-Villa, E.; Martínez de la Peña, C.F.; Lozano-Zaraín, P.; Cevallos, M.A.; Torres, C.; Torres, A.G.; del Carmen Rocha-Gracia, R. Comparative genomics of a subset of Adherent/Invasive *Escherichia coli* strains isolated from individuals without inflammatory bowel disease. *Genomics* **2020**, *112*, 1813–1820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Yasir, M.; Farman, M.; Shah, M.W.; Jiman-Fatani, A.A.; Othman, N.A.; Almasaudi, S.B.; Alawi, M.; Shakil, S.; Al-Abdullah, N.; Ismaeel, N.A.; et al. Genomic and antimicrobial resistance genes diversity in multidrug-resistant CTX-M-positive isolates of *Escherichia coli* at a health care facility in Jeddah. *J. Infect. Public Health* **2020**, *13*, 94–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Manageiro, V.; Jones-Dias, D.; Ferreira, E.; Caniça, M. Plasmid-Mediated Colistin Resistance (*mcr-1*) in *Escherichia coli* from Non-Imported Fresh Vegetables for Human Consumption in Portugal. *Microorganisms* **2020**, *8*, 429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Díaz-Jiménez, D.; García-Meniño, I.; Herrera, A.; García, V.; López-Beceiro, A.M.; Alonso, M.P.; Blanco, J.; Mora, A. Genomic Characterization of *Escherichia coli* Isolates Belonging to a New Hybrid aEPEC/ExPEC Pathotype O153:H10-A-ST10 eae-beta1 Occurred in Meat, Poultry, Wildlife and Human Diarrheagenic Samples. *Antibiotics* **2020**, *9*, 192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Jørgensen, S.L.; Stegger, M.; Kudirkiene, E.; Lilje, B.; Poulsen, L.L.; Ronco, T.; Dos Santos, T.P.; Kiil, K.; Bisgaard, M.; Pedersen, K.; et al. Diversity and Population Overlap between Avian and Human *Escherichia coli* Belonging to Sequence Type 95. *mSphere* **2019**, *4*, e00333-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Hayashi, W.; Tanaka, H.; Taniguchi, Y.; Iimura, M.; Soga, E.; Kubo, R.; Matsuo, N.; Kawamura, K.; Arakawa, Y.; Nagano, Y.; et al. Acquisition of *mcr-1* and Cocarriage of Virulence Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Municipal Wastewater Influent in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e01661-19. [[CrossRef](#)]
50. Barrera, S.; Vázquez-Flores, S.; Needle, D.; Rodríguez-Medina, N.; Iglesias, D.; Sevigny, J.L.; Gordon, L.M.; Simpson, S.; Thomas, W.K.; Rodolfo, H.; et al. Serovars, Virulence and Antimicrobial Resistance Genes of Non-Typhoidal *Salmonella* Strains from Dairy Systems in Mexico. *Antibiotics* **2023**, *12*, 1662. [[CrossRef](#)]
51. Jibril, A.H.; Okeke, I.N.; Dalsgaard, A.; Menéndez, V.G.; Olsen, J.E. Genomic analysis of antimicrobial resistance and resistance plasmids in *Salmonella serovars* from poultry in Nigeria. *Antibiotics* **2021**, *10*, 99. [[CrossRef](#)]
52. Shelenkov, A.; Mikhaylova, Y.; Voskanyan, S.; Egorova, A.; Akimkin, V. Whole-Genome Sequencing Revealed the Fusion Plasmids Capable of Transmission and Acquisition of Both Antimicrobial Resistance and Hypervirulence Determinants in Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1314. [[CrossRef](#)]
53. Mousavi, Z.E.; Koolman, L.; Macori, G.; Fanning, S.; Butler, F. Comprehensive Genomic Characterization of *Cronobacter sakazakii* Isolates from Infant Formula Processing Facilities Using Whole-Genome Sequencing. *Microorganisms* **2023**, *11*, 2749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Rozwandowicz, M.; Brouwer MS, M.; Fischer, J.; Wagenaar, J.A.; Gonzalez-Zorn, B.; Guerra, B.; Mevius, D.J.; Hordijk, J. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 1121–1137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Balbuena-Alonso, M.G.; Cortés-Cortés, G.; Kim, J.W.; Lozano-Zarain, P.; Camps, M.; Del Carmen Rocha-Gracia, R. Genomic analysis of plasmid content in food isolates of *E. coli* strongly supports its role as a reservoir for the horizontal transfer of virulence and antibiotic resistance genes. *Plasmid* **2022**, *123–124*, 102650. [[CrossRef](#)]
56. Yang, X.; Liu, X.; Xu, Y.; Chan, E.W.; Zhang, R.; Chen, S. An IncB/O/K/Z conjugative plasmid encodes resistance to azithromycin and mediates transmission of virulence plasmid in *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2022**, *60*, 106683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Vale, F.F.; Lehours, P.; Yamaoka, Y. The role of Mobile genetic elements in bacterial evolution and their adaptability. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 849667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Heieck, K.; Brück, T. Localization of Insertion Sequences in Plasmids for L-Cysteine Production in *E. coli*. *Genes* **2023**, *14*, 1317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Loftsdóttir, H.; Söderlund, R.; Jinnerot, T.; Eriksson, E.; Bongcam-Rudloff, E.; Aspán, A. Dynamics of insertion sequence element IS629 inactivation of verotoxin 2 genes in *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, *364*, fnx074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Fordham, S.M.E.; Mantzouratou, A.; Sheridan, E. Prevalence of insertion sequence elements in plasmids relating to *mgrB* gene disruption causing colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *MicrobiologyOpen* **2022**, *11*, e1262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Shepard, S.M.; Danzeisen, J.L.; Isaacson, R.E.; Seemann, T.; Achtman, M.; Johnson, T.J. Genome sequences and phylogenetic analysis of K88- and F18-positive porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 395–405. [[CrossRef](#)]
62. Minnick, M.F. Functional Roles and Genomic Impact of Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements (MITEs) in Prokaryotes. *Genes* **2024**, *15*, 328. [[CrossRef](#)]
63. Fattash, I.; Rooke, R.; Wong, A.; Hui, C.; Luu, T.; Bhardwaj, P.; Yang, G. Miniature inverted-repeat transposable elements: Discovery, distribution, and activity. *Genome* **2013**, *56*, 475–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Klai, K.; Zidi, M.; Chénais, B.; Denis, F.; Caruso, A.; Casse, N.; Mezghani Khemakhem, M. Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements (MITEs) in the Two Lepidopteran Genomes of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa Zea*. *Insects* **2022**, *13*, 313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Momose, M.; Abe, Y.; Ozeki, Y. Miniature inverted-repeat transposable elements of Stowaway are active in potato. *Genetics* **2010**, *186*, 59–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Wang, Y.; Liu, Y.; Lyu, N.; Li, Z.; Ma, S.; Cao, D.; Zhu, B. The temporal dynamics of antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* and predominant serovars in China. *Natl. Sci. Rev.* **2023**, *10*, nwac269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Núñez-Samudio, V.; Pimentel-Peralta, G.; De La Cruz, A.; Landires, I. Genetic Diversity and New Sequence Types of *Escherichia coli* Coharboring  $\beta$ -Lactamases and PMQR Genes Isolated from Domestic Dogs in Central Panama. *Genes* **2022**, *14*, 73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Magaña-Lizárraga, J.A.; Ahumada-Santos, Y.P.; Parra-Unda, J.R.; de Jesús Uribe-Beltrán, M.; Vega-López, I.F.; Prieto-Alvarado, R.; Báez-Flores, M.E. Draft genome sequence of *Escherichia coli* M51-3: A multidrug-resistant strain assigned as ST131-H30 recovered from infant diarrheal infection in Mexico. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2019**, *19*, 311–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Núñez-Samudio, V.; Pecchio, M.; Pimentel-Peralta, G.; Quintero, Y.; Herrera, M.; Landires, I. Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Clinical Isolates from Central Panama. *Antibiotics* **2021**, *10*, 899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

70. Iqbal, J.; Malviya, N.; Gaddy, J.A.; Zhang, C.; Seier, A.J.; Haley, K.P.; Doster, R.S.; Farfán-García, A.E.; Gómez-Duarte, O.G. Enteroinvasive *Escherichia coli* O96:H19 is an Emergent Biofilm-Forming Pathogen. *J. Bacteriol.* **2022**, *204*, e0056221. [[CrossRef](#)]
71. Vogt, N.A.; Hetman, B.M.; Pearl, D.L.; Vogt, A.A.; Reid-Smith, R.J.; Parmley, E.J.; Janecko, N.; Bharat, A.; Mulvey, M.R.; Ricker, N.; et al. Using whole-genome sequence data to examine the epidemiology of Salmonella, *Escherichia coli* and associated antimicrobial resistance in raccoons (*Procyon lotor*), swine manure pits, and soil samples on swine farms in southern Ontario, Canada. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0260234. [[CrossRef](#)]
72. Vasconcelos, P.C.; Leite, E.L.; Araújo, W.J.; Silva, N.M.V.; Saraiva, M.M.S.; Santos Filho, L.; Freitas Neto, O.C.; Givisiez, P.E.N.; Oliveira, C.J.B. Draft genome sequence of *mcr-1*-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* ST359 from chicken carcasses in Northeastern Brazil. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2020**, *23*, 135–136. [[CrossRef](#)]
73. Boyd, E.; Trmcic, A.; Taylor, M.; Shyng, S.; Hasselback, P.; Man, S.; Tchao, C.; Stone, J.; Janz, L.; Hoang, L.; et al. *Escherichia coli* O121 outbreak associated with raw milk Gouda-like cheese in British Columbia, Canada, 2018. *Can. Commun. Dis. Rep.* **2021**, *47*, 11–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Papa-Ezdra, R.; Grill Diaz, F.; Vieytes, M.; García-Fulgueiras, V.; Caiata, L.; Ávila, P.; Brasesco, M.; Christophersen, I.; Cordeiro, N.F.; Algorta, G.; et al. First three *Escherichia coli* isolates harbouring *mcr-1* in Uruguay. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2020**, *20*, 187–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Orsi, H.; Guimarães, F.F.; Leite, D.S.; Guerra, S.T.; Joaquim, S.F.; Pantoja, J.C.F.; Hernandez, R.T.; Lucheis, S.B.; Ribeiro, M.G.; Langoni, H.; et al. Characterization of mammary pathogenic *Escherichia coli* reveals the diversity of *Escherichia coli* isolates associated with bovine clinical mastitis in Brazil. *J. Dairy Sci.* **2023**, *106*, 1403–1413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Anderson, R.E.V.; Chalmers, G.; Murray, R.; Mataseje, L.; Pearl, D.L.; Mulvey, M.; Topp, E.; Boerlin, P. Characterization of *Escherichia coli* and Other Enterobacteriales Resistant to Extended-Spectrum Cephalosporins Isolated from Dairy Manure in Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* **2023**, *89*, e0186922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Loayza-Villa, F.; Salinas, L.; Tijet, N.; Villavicencio, F.; Tamayo, R.; Salas, S.; Rivera, R.; Villacis, J.; Satan, C.; Ushiña, L.; et al. Diverse *Escherichia coli* lineages from domestic animals carrying colistin resistance gene *mcr-1* in an Ecuadorian household. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2020**, *22*, 63–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Hernández-Fillor, R.E.; Brillhante, M.; Marrero-Moreno, C.M.; Baez, M.; Espinosa, I.; Perreten, V. Characterization of Third-Generation Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Pigs in Cuba Using Next-Generation Sequencing. *Microb. Drug Resist.* **2021**, *27*, 1003–1010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Silva-Sánchez, J.; Duran-Bedolla, J.; Lozano, L.; Reyna-Flores, F.; Bacterial Resistance Consortium; Barrios-Camacho, H. Molecular characterization of *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-14 and CTX-M-28 in Mexico. *Braz. J. Microbiol.* **2024**, *55*, 309–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Liao, N.; Borges, C.A.; Rubin, J.; Hu, Y.; Ramirez, H.A.; Chen, J.; Zhou, B.; Zhang, Y.; Zhang, R.; Jiang, J.; et al. Prevalence of  $\beta$ -Lactam Drug-Resistance Genes in *Escherichia coli* Contaminating Ready-to-Eat Lettuce. *Foodborne Pathog. Dis.* **2020**, *17*, 739–742. [[CrossRef](#)]
81. Espinoza, L.L.; Huamán, D.C.; Cueva, C.R.; Gonzales, C.D.; León, Y.I.; Espejo, T.S.; Monge, G.M.; Alcántara, R.R.; Hernández, L.M. Genomic analysis of multidrug-resistant *Escherichia coli* strains carrying the *mcr-1* gene recovered from pigs in Lima-Peru. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2023**, *99*, 102019. [[CrossRef](#)]
82. Aworh, M.K.; Thakur, S.; Gensler, C.; Harrell, E.; Harden, L.; Fedorka-Cray, P.J.; Jacob, M. Characteristics of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from retail meat products in North Carolina. *PLoS ONE* **2024**, *19*, e0294099. [[CrossRef](#)]
83. Weiler, N.; Martínez, L.J.; Campos, J.; Poklepovich, T.; Orrego, M.V.; Ortiz, F.; Alvarez, M.; Putzolu, K.; Zolezzi, G.; Miliwebsky, E.; et al. First molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from clinical samples in Paraguay using whole-genome sequencing. *Rev. Argent. Microbiol.* **2023**, *55*, 111–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Furlan, J.P.R.; Savazzi, E.A.; Stehling, E.G. Widespread high-risk clones of multidrug-resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* B2-ST131 and F-ST648 in public aquatic environments. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2020**, *56*, 106040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Ballash, G.A.; Mollenkopf, D.F.; Diaz-Campos, D.; van Balen, J.C.; Cianciolo, R.E.; Wittum, T.E. Pathogenomics and clinical recurrence influence biofilm capacity of *Escherichia coli* isolated from canine urinary tract infections. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0270461. [[CrossRef](#)]
86. Calero-Cáceres, W.; Tadesse, D.; Jaramillo, K.; Villavicencio, X.; Mero, E.; Lalaleo, L.; Welsh, C.; Villacís, J.E.; Quentin, E.; Parra, H.; et al. Characterization of the genetic structure of *mcr-1* gene among *Escherichia coli* isolates recovered from surface waters and sediments from Ecuador. *Sci. Total Environ.* **2022**, *806 Pt 2*, 150566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Liao, J.; Bergholz, P.; Wiedmann, M. Adjacent Terrestrial Landscapes Impact the Biogeographical Pattern of Soil *Escherichia coli* Strains in Produce Fields by Modifying the Importance of Environmental Selection and Dispersal. *Appl. Environ. Microbiol.* **2021**, *87*, e02516-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Aristizábal-Hoyos, A.M.; Rodríguez, E.A.; Arias, L.; Jiménez, J.N. High clonal diversity of multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a wastewater treatment plant. *Let. Appl. Microbiol.* **2019**, *69*, 431–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- 
89. Rasko, D.A.; Del Canto, F.; Luo, Q.; Fleckenstein, J.M.; Vidal, R.; Hazen, T.H. Comparative genomic analysis and molecular examination of the diversity of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from Chile. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007828. [[CrossRef](#)]
  90. Martins, J.C.L.; Pintor-Cora, A.; Alegría, Á.; Santos, J.A.; Herrera-Arias, F. Characterization of ESBL-producing *Escherichia* spp. and report of an *mcr-1* colistin-resistance *Escherichia fergusonii* strain from minced meat in Pamplona, Colombia. *Int. J. Food Microbiol.* **2023**, *394*, 110168. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.