



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Biológicas

TÍTULO DE LA TESIS

**Determinación de las propiedades de transferencia por
conjugación de factores de virulencia y resistencia en
*Escherichia coli uropatógena***

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIÓLOGIA

PRESENTA:

SAMUEL FUENTES QUIROZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARGARITA MARÍA DE LA PAZ ARENAS HERNÁNDEZ

Julio, 2025



Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) por el apoyo económico de una beca asignada con el folio BPV/274 y BPV/484 a través de los proyectos: “Análisis del genoma de *E. coli* patógena extraintestinal y comensal para la prevención, control y tratamiento adecuados de infección de tracto urinario”. Proyecto VIEP 2023 y “Caracterización de mecanismos, niveles de resistencia antibiótica y toxicidad en *Clostridioides difficile* y en enterobacterias asociadas a la ICD aisladas de infecciones humanas”. Proyecto VIEP 2024.

A la D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández por recibirme en su laboratorio y por su participación crítica en esta tesis, apoyo técnico y de aprendizaje.

A mi compañera, maestra y amiga del Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos: M. C. Isabel Montserrat Cortez de la Puente por los buenos momentos y enseñanzas en el laboratorio, gracias por todo tu tiempo y dedicación.

Al M. C. Oscar compañero y amigo del Laboratorio de Biología Molecular de enteropatógenos con quien pase buenos momentos, gracias.

A ti, María Monserrat, quien como yo estuviste al pendiente del avance de este trabajo, gracias.

A los chicos del laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos: Lety, Liz, Roberto, Héctor y Lucero; del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas por permitirme ser parte de su día a día y por los momentos en común.

Dedicatoria

Todo el trabajo realizado en esta tesis es dedicado a la persona más importante en mi vida, mi madre. Paty, gracias a ti se logró.

Mil Gracias.

Índice :

| | |
|--|----|
| Portada..... | 1 |
| Agradecimientos..... | 2 |
| Dedicatoria | 3 |
| Índice..... | 4 |
| Índice de figuras | 7 |
| Índice de tablas | 8 |
| Resumen | 9 |
| 1.- Introducción..... | 10 |
| 1.1.- Infección del tracto urinario | 10 |
| 1.2.- Epidemiología | 11 |
| 1.3.- Etiología..... | 12 |
| 1.4.- <i>Escherichia coli</i> | 14 |
| 1.4.1.- Patotipos..... | 14 |
| 1.4.2.- <i>Escherichia coli</i> uropatógena..... | 15 |
| 1.4.3.- Serogrupos | 15 |
| 1.4.4.- Grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> | 16 |
| 1.4.5.- Factores de virulencia..... | 16 |
| 1.4.6.- Mecanismos de patogenicidad de UPEC | 25 |
| 1.4.7.- Tratamiento..... | 27 |
| 1.4.8.- Resistencia antibiótica | 29 |
| 1.4.9.- Transferencia horizontal de genes..... | 29 |
| 1.4.10.- Conjugación..... | 29 |
| 2.- Antecedentes | 34 |
| 2.1.- Antecedentes internacionales | 34 |

| | |
|--|----|
| 2.2.- Antecedentes nacionales..... | 37 |
| 2.2.1- Antecedentes específicos | 38 |
| 3.- Justificación..... | 42 |
| 4.- Objetivo general | 43 |
| 5.- Objetivos específicos | 43 |
| 6.- Esquema de trabajo | 44 |
| 7.- Material y métodos..... | 44 |
| 7.1.- Cepas control..... | 45 |
| 7.5.1.- Electroforesis..... | 46 |
| 7.2 Determinación de resistencia a azida de sodio y ampicilina | 47 |
| 7.3.- Conjugación bacteriana | 47 |
| 7.3.1.- Conjugación bacteriana fase sólida | 47 |
| 7.3.2.- Conjugación bacteriana fase líquida..... | 48 |
| 7.3.3.- Frecuencia de conjugación..... | 48 |
| 7.4.1.- Extracción de DNA plasmídico Miniprep..... | 49 |
| 7.4.2- Extracción de DNA plasmídico Fenol-cloroformo | 49 |
| 7.4.3- Extracción de DNA genómico | 50 |
| 7.5.- Determinación de grupos filogenéticos | 51 |
| 7.6.- Determinación de fragmentos de virulencia | 52 |
| 7.6.1.- Condiciones para PCR para fragmentos de virulencia | 52 |
| 7.6.2.- Puntaje de virulencia | 54 |
| 7.6.3.- Genes <i>mob</i> y <i>tra</i> | 54 |
| 7.7.- Determinación del perfil de susceptibilidad..... | 54 |
| 7.7.1- Puntaje y clasificación de la resistencia antibiótica..... | 55 |
| 7.8.- Caracterización del perfil plasmídico | 56 |

| | |
|---|----|
| 8.- Resultados | 57 |
| 8.1.- Detección de genes <i>MOB_{F12}</i> y <i>traT</i> | 57 |
| 8.2.- Perfil de resistencia a azida de sodio..... | 59 |
| 8.3.- Ensayos de conjugación | 62 |
| 8.4.- Caracterización de transconjugantes por grupo filogenético | 63 |
| 8.5.- Análisis de factores de virulencia en clonas transconjugantes | 66 |
| 8.5.1.- Puntaje de virulencia de los genes completos en transconjugantes.... | 69 |
| 8.6.- Análisis de perfil de resistencia antibiótica en transconjugantes..... | 75 |
| 8.7.- Caracterización del perfil plasmídico de transconjugantes | 80 |
| 9.- Discusión..... | 87 |
| 9.1.- Detección de genes <i>MOB_{F12}</i> y <i>TraT</i> | 87 |
| 9.2.- Perfil de resistencia a azida de sodio..... | 88 |
| 9.3.- Ensayos de conjugación | 89 |
| 9.4.- Identificación de transconjugantes por grupo filogenético..... | 90 |
| 9.5.- Análisis de fragmentos de virulencia en transconjugantes..... | 91 |
| 9.5.1.- Puntaje de virulencia de los genes completos en transconjugantes.... | 92 |
| 9.6.- Análisis del perfil de resistencia antibiótica en transconjugantes..... | 93 |
| 9.7.- Caracterización del perfil plasmídico en transconjugantes | 95 |
| 10.- Conclusión | 97 |
| 11.- Perspectivas:..... | 97 |
| Bibliografía | 98 |

Índice de figuras

| | |
|--|-------------------------------------|
| Figura 1.- Representación de la estructura de la fimbria tipo 1..... | 18 |
| Figura 2.- Representación de la estructura de la fimbria tipo P. | 19 |
| Figura 3.- Representación de la estructura de lha. | 20 |
| Figura 4.- Representación esquemática del operon iucABCD..... | 22 |
| Figura 5.- Mecanismo de patogenicidad mediado por UPEC. | 27 |
| Figura 6.- Representación de las placas de Muller Hinton y la distribución de los sensidiscos para realizar la técnica de Kirby-Bauer..... | 55 |
| Figura 7.- Representación gráfica en porcentaje de la presencia de los genes MOB _{F12} y traT en el cepario procedente de varones cursando con ITU..... | 58 |
| Figura 8.- Representación gráfica de la presencia de los genes MOB _{F12} y traT en un cepario de E. coli aislada de varones cursando con ITU | 58 |
| Figura 9.- Selección de las transconjugantes candidatas (cepa 128-I y J53). | 62 |
| Figura 10.- Identificación filogenética de las cepas donadoras y receptora..... | 65 |
| Figura 11.- Determinación de grupo filogenético de las clonas transconjugantes..... | 65 |
| Figura 12.- Caracterización de transconjugantes de UPEC por factores de virulencia..... | 67 |
| Figura 13.- Distribución de genes de virulencia adquiridos por cada una de las transconjugantes obtenidas a partir de las cepas donadoras de UPEC. | 68 |
| Figura 14.- Distribución de genes de virulencia adquiridos por cada una de las transconjugantes obtenidas a partir de las cepas donadoras 130, 132, 154, 173. | 69 |
| Figura 15.- Distribución de los genes de virulencia de cepas UPEC transferidos por conjugación..... | 69 |
| Figura 16.- Distribución de los factores de virulencia “completos” de cada una de las transconjugantes..... | 70 |
| Figura 17.- Porcentaje de genes que codifican para 10 factores de virulencia completos en todas las clonas transconjugantes estudiadas..... | 75 |
| Figura 18.- Perfil de de resistencia antibiótica de E. coli receptora, donadoras y clonas transconjugantes..... | 77 |
| Figura 19.- Porcentaje de resistencia antibiótica en las transconjugantes | 79 |
| Figura 20.- Clasificación de resistencia de 25 transconjugantes obtenidas de 7 cepas de UPEC donadoras: Multidrogo-resistente (MDR) y no multidrogo-resistente (NMDR)..... | Error! Bookmark not defined. |
| Figura 21.- A: Obtención de bandas plasmídicas mediante electroforesis de las muestras de extracción plasmídica..... | 81 |
| Figura 22.- Número de bandas plasmídicas observadas en donadoras, receptora y transconjugantes..... | Error! Bookmark not defined. |
| Figura 23.-Tamaño (pb) y número de las bandas plasmídicas encontradas en donadoras, receptora y transconjugantes | 85 |

Índice de tablas

| | |
|--|-------------------------------------|
| Tabla 1.- sideróforos, tipos y genes que participan en su expresión y regulación | 21 |
| Tabla 2.- Genes de virulencia en UPEC..... | 25 |
| Tabla 3.- Genes tra y características generales. | 31 |
| Tabla 4.- Genes MOB, clado y patotipos, relaxasas y grupos de incompatibilidad encontrados en Enterobacteria, Pseudomonas y S. aureus | 32 |
| Tabla 5.- Factores de virulencia obtenidos de 24 cepas UPEC aisladas de varones con ITU obtenidos del Hospital Regional I.S.S.S.T.E..... | 45 |
| Tabla 6.- Cepas control..... | 46 |
| Tabla 7.- Identificación de filogrupos (A, B1, B2, C, D, E, F y clado I) en base a la determinación de los genes arpA, chuA, yjaA y tspE4.C2 | Error! Bookmark not defined. |
| Tabla 8.- Características de los fragmentos amplificados por PCR de los 11 factores de virulencia de UPEC. PCR múltiple, control positivo y temperaturas usadas en la PCR..... | 53 |
| Tabla 9.- Presencia de los genes MOB, Tra y bandas plasmídicas por cada cepa perteneciente al cepario de E. coli aislado de varones procedentes del I.S.S.S.T.E..... | 57 |
| Tabla 10.- Pruebas de crecimiento de 13 cepas de E. coli MOB ⁺ y tra ⁺ aisladas de ITU en varones en diferentes concentraciones de azida de sodio:..... | 59 |
| Tabla 11.- Crecimiento de las cepas donadoras y de la cepa receptora en ampicilina, azida de sodio y ampicilina con azida de sodio. | 60 |
| Tabla 12.- Frecuencia de conjugación mediante las diluciones (D) de las cepas de estudio. Se muestran los valores de las unidades formadoras de colinas (UFC)..... | 63 |
| Tabla 13.- Determinación de los grupos filogenéticos de las transconjugantes obtenidas | 63 |
| Tabla 14.- Distribución de los genes de virulencia observados en clonas Transconjugantes respecto de la cepas donadoras y receptora | 68 |
| Tabla 15.- Genotipo de virulencia de cepas de E. coli Donadoras, Receptora y Transconjugantes. Simbología (+). presente y ausente (-)..... | 73 |
| Tabla 16.- - Factores de virulencia completos transferidos por conjugación por cepas UPEC..... | 74 |
| Tabla 17.- Virotipo y bandas plasmídicas de las transconjugantes respecto de las cepas donadoras..... | 76 |
| Tabla 18.- - Perfil de resistencia antibiótica de E. coli receptora (J53), donadoras (103-I, 126-I, 128-I, 130-I, 132-I, 154-I y 173-I) y clonas transconjugantes..... | 77 |
| Tabla 19.- Perfil de resistencia antibiótica de las transconjugantes obtenidas.. .. | Error! Bookmark not defined. |

Resumen

Escherichia coli uropatógena es uno de los principales agentes causales de infección del tracto urinario a nivel global, al igual que uno de los microorganismos con mayor plasticidad genómica. Se ha observado una gran diversidad genética mediante sus propiedades emergentes tanto de virulencia y de resistencia antibiótica, los cuales han sido transferidos en diversos nichos bacterianos mediante procesos de transferencia horizontal mediada por plásmidos. El presente trabajo tiene por objetivo determinar las propiedades de patogenicidad transferidas por conjugación de un cepario multidrogo resistente aislado de pacientes masculinos de una comunidad hospitalaria en Puebla, usando como cepa receptora *E. coli* J53 (derivada de *E. coli* K-12). Se obtuvieron un total de 25 transconjugantes con una frecuencia de conjugación de 12 a 79.3×10^3 UFC/ml y su caracterización se realizó mediante la determinación de perfiles de resistencia, factores de virulencia y la presencia de bandas plasmídicas. Los resultados obtenidos mostraron que 1 transconjugante obtuvo el 87.5% de los genes determinados en su cepa donadora. Los genes que fueron transferidos más frecuentemente fueron: el factor de captación de hierro *iucD* en un 52% y los factores de virulencia productores de toxinas satA+satP en un 20%. Los resultados del análisis del perfil de resistencia para las 25 transconjugantes mostraron que los mayores porcentajes de resistencia fueron cefuroxima con el 100% de resistencia, ceftriaxona con el 96% de resistencia antibiótica, ampicilina con el 96% y por último cefalotina con un 96%. En la determinación del perfil plasmídico se observó que la mayoría de los plásmidos transferidos fueron plásmidos grandes (≥ 90 kb) y se encontraron en el 56% de las transconjugantes. Para concluir, los resultados mostrados en este trabajo recalcan la importancia que tiene el proceso de transferencia por conjugación, en la transferencia de características de virulencia y resistencia a fármacos aumentando el pool genético de las comunidades bacterianas de *E. coli* promoviendo el incremento de poblaciones patógenas y su adaptación.

1.- Introducción

1.1.- Infección del tracto urinario

La infección del tracto urinario (ITU) es un conjunto de procesos patológicos relacionados a una respuesta inflamatoria en las células del sistema urinario, como consecuencia de la presencia de microorganismos ajenos a este y que en su mayoría suelen ser bacterias que comprometen la salud del paciente (Jiménez et al., 2002; Vivas et al., 2011)

La ITU se clasifica en dos grupos debido a la presencia de factores o eventos que pueden alterar el tratamiento del paciente, debido a estas alteraciones surgen la ITU complicada y no complicada (Flores et al., 2015). La *ITU complicada* se asocia con factores que complican el tratamiento durante el proceso de infección y que ponen en riesgo la salud del huésped, como: la obstrucción urinaria, la retención urinaria causada por una enfermedad neurológica, inmunosupresión, insuficiencia renal, trasplante renal, embarazo y la presencia de cuerpos extraños (cálculos renales), catéteres u otros instrumentos (Nielubowicz & Mobley, 2010). Las *ITU no complicadas* afectan a personas sanas, es decir que no presentan anomalías estructurales o neurológicas en el tracto urinario durante la infección. A pesar de no mostrar cambios estructurales existen factores que pueden poner en una dificultad al hospedero y que son importantes en el desarrollo de una ITU como el género, una infección urinaria previa, actividad sexual, diabetes, obesidad y susceptibilidad genética (Zaja et al., 2007; Gupta et al., 2011). La *ITU no complicada* también se divide en dos grupos dependiendo de la zona infectada y se denominan bajas (cistitis) y altas (pielonefritis). Las *ITU bajas* se ubican en el tracto urinario bajo, más específico, en el área de la vejiga, dónde el agente infeccioso se aloja y por lo general causa malestares como la disuria y poliuriuria (micción frecuente) y la *ITU alta* se ubica en el tracto urinario superior y es señalada como la infección más grave del sistema urinario debido al daño que genera en el sistema renal y colector, además de un conjunto de síntomas que afectan la salud del paciente (Foxman, 2014). Otro de los factores de riesgo más importantes en una ITU alta es su

complicación, llegando a causar una urosepsis, proceso por el cual la bacteria pasa a la sangre y compromete la vida del paciente (Wagenlehner et al., 2011).

1.2.- Epidemiología

La ITU se caracteriza por ser uno de los padecimientos más comunes y de mayor morbilidad alrededor del mundo, el cual afecta a unos 150 millones de personas (Öztürk & Murt, 2020). En Estado Unidos de Norteamérica (EE. UU) los casos de ITU oscilan alrededor de los 7 millones de visitas médicas al año y esto genera gastos económicos importantes (Sheerin & Glover, 2019). Los estudios reportados en países con casos de ITU han destacado por su gran número de casos como lo describe Foxman y cols en el 2014, donde mencionan una evaluación del 2007 por parte de Schappert & Rechtsteiner, 2011 en EE. UU en el que se observó que 10 millones de visitas ambulatorias eran por ITU, y esto representaba solo el 0.9% de todos los casos ambulatorios de ese país. Junto con otro estudio en EE. UU donde las frecuencias de pielonefritis son descritas por Czaja y cols (2007) que estimaron casos anuales de pielonefritis ambulatoria en mujeres y varones, donde 12 de 13 casos en mujeres y 2 de 3 casos en varones se hacían presentes por cada 10,000 casos reportados respectivamente.

También se ha observado el desarrollo de ITU en infantes como lo menciona Lombardo (2018) quien describe un estudio con infantes en el cual se muestra que en el grupo de niños el 3.7% presentaron una ITU y después el grupo de niñas con el 2% (Simões e Silva & Oliveira, 2015). También se observó que afecta a recién nacidos, ya que el 5% de niñas presentaron este problema y el 20.3% en el grupo de niños no circuncidados, en la etapa prepuberal con un 5% en niñas y 2% en niños (Zorc et al., 2005). Otro estudio complementario reportado por Gücük *et al* (2013) en Turquía mostraron que las ITU se habían observado en los recién nacidos masculinos, durante los primeros 3 meses debido a la presencia del prepucio y alteraciones congénitas.

En Europa, los casos de urosepsis son descritos por Wagenlehner y cols en el 2011 quienes realizaron un estudio en Alemania en donde demostraron que la urosepsis

solía representar el 25% de todos los casos de sepsis, y esta lograba desarrollarse a partir de una ITU adquirida en la comunidad o de manera hospitalaria. Cabe mencionar que la bacteriuria asintomática también ha sido descrita por Bizuwork *et al* (2021) quienes reportan que la presencia de bacteriuria asintomática es prevalente en países en vías de desarrollo, los cuales logran alcanzar un 24.7% (Onu *et al.*, 2015) siendo África y Asia central los más afectados. Geerlings (2016) demostró que en los Países Bajos se encontraba una prevalencia de bacteriuria asintomática que incrementó en ancianos en un 20%. Además, las condiciones de salud previas también favorecen en el desarrollo de las complicaciones por ITU como lo descrito por Renko y *et al* (2011) que consideraron la presencia de bacteriuria asintomática en pacientes con diabetes con 12.2% de casos reportados, siendo la diabetes tipo 1 la más común en reportarse.

En México, las ITU son uno de los más grandes problemas de salud pública ya que son la tercera causa de morbilidad poblacional, con alrededor de más de 4 millones de casos en el periodo del 2019 (Cortés & Torres, 2022), en el estado de Puebla en el año 2022 se detectaron 20,050 casos de ITU, siendo estos el 4.85% de los casos nacionales (DGE, 2023). Cabe destacar que también existen otros sectores de la población con mayor susceptibilidad a contraer una ITU como: pacientes con lesiones medulares, con uso de catéteres o pacientes inmunosuprimidos (Guzmán & García-Perdomo, 2020).

Las ITU representan un riesgo a futuro para la salud pública en general, ya que el 40% de las mujeres y el 12% de los hombres presentaran una ITU al menos una vez a lo largo de su vida (Blanco *et al.*, 2016). Además, se ha observado que las ITU no complicadas suelen estar presentes en etapas con mayor actividad sexual y oscilan entre las edades de los 18 y 39 años (Medina & Castillo-Pino, 2019).

1.3.- Etiología

La ITU presenta una gran variedad de signos y síntomas clínicos causados por la presencia de microorganismos ajenos al tracto urinario, de los cuales, *Escherichia coli* es considerado el principal agente causal de las infecciones adquiridas en la

comunidad debido a la alta frecuencia de aparición en los aislados de casos reportados de ITU (McLellan & Hunstad, 2016).

Se ha reportado que *Escherichia coli* es el patógeno mayormente aislado en casos de ITU y oscila en el 75 y 90% de las infecciones no complicadas (Rizvi et al., 2011).

Se ha demostrado que las mujeres suelen ser más propensas a contraer una ITU en comparación a los varones debido a su anatomía, ya que tienen una uretra mucho más corta y una mayor proximidad entre el ano y la cavidad vaginal, facilitando el ascenso de las bacterias al tracto urinario. Sin embargo, la predisposición o susceptibilidad genética juega un papel importante en el incremento de la posibilidad de adquirir una ITU debido a la alteración de los mecanismos inmunitarios de la cavidad urogenital de la mujer y, además, cambios como la postmenopausia que afectan la secreción de estrógenos generando una atrofia vaginal (Flores-Mireles et al., 2015; Guzmán & García-Perdomo, 2020).

No obstante, aun cuando las tasas de infección por ITU suelen ser más bajas en hombres jóvenes, estas suelen aumentar con la edad (Griebing, 2005). Este tipo de infecciones suelen ser poco frecuentes en varones con un sistema urinario saludable o normal, pero esto no los excluye de adquirirlas. Las ITU de manera general son más frecuentes en varones adultos cuando existe una alteración o cambio a nivel de la próstata. La adquisición de una ITU no complicada en varones mayormente se asocia al hecho de tener a una pareja sexual activa con una ITU mediada por uropatógenos y no usar la protección debida. Las ITU complicadas en varones suelen estar relacionadas con la obstrucción de la próstata, por lo cual permite la formación de un reservorio bacteriano ya que se ha observado que el desarrollo de las ITU complicadas en varones ancianos se debe a las alteraciones prostáticas, disfunción vesical y otros padecimientos que se presentan por la edad (Wurgaft, 2010). En varones ancianos se ha observado que *E. coli* está presente en el 70% de los casos de pielonefritis aguda (Czaja et al., 2007)

1.4.- *Escherichia coli*

El género de *E. coli* recibe el nombre del pediatra alemán Theodor Escherich, y este género está formado por bacilos gramnegativos anaerobios facultativos que pertenecen a la familia de Enterobacteriaceae. *E. coli* está ampliamente distribuida, siendo el principal organismo que se encuentra en el intestino de los seres humanos y animales. Las cepas de *E. coli* comensales que están ubicadas en el tracto digestivo mantienen una simbiosis favorable con el hospedero y son en su mayoría inofensivas (Yan & Polk, 2004). Sin embargo, existen otros grupos de *E. coli* con capacidad patogénica para generar enfermedades intestinales (Gomes et al., 2016) o extraintestinales en individuos sanos e inmunodeprimidos. Ya que en estos grupos han adquirido factores de virulencia (FV) que les brindan la capacidad para desarrollarse en diferentes entornos, y así, generar una enfermedad que exponga la salud del hospedero (Kaper et al., 2004).

1.4.1.- Patotipos

Mediante procesos de identificación se ha logrado mostrar las variaciones patotípicas de *E. coli*, distinguiéndose en 2 grupos; El primer grupo es el de cepas de *E. coli* intrainestinal o diarreogénicas (IPEC o DEC) con siete categorías identificadas mediante epidemiología, interacción con el enterocito, factores de virulencia, serología y que son llamadas como: *E. coli enteropatógena* (ECEP), *E. coli enterotoxigénica* (ECET), *E. coli enteroinvasora* (ECEI), *E. coli shigatoxigénica* (ECST), *E. coli enteroagregativa* (ECEA), *E. coli adherente difusa* (ECAD) y *E. coli adherente invasora* (ECAI) (Nataro & Kaper., 1998; Farfán et al., 2016). Por otro lado, se conoce el patotipo de *Escherichia coli* extraintestinal (ExPEC) y este grupo presenta una estructura filogenética compleja, amplia presencia de factores de virulencia y una plasticidad del genoma considerable. El grupo de ExPEC está formado a partir de cuatro categorías, las cuales son: *E. coli* uropatógena (UPEC), *E. coli* meningitis neonatal (NMEC), *E. coli* asociada a sepsis (SEPEC) y *E. coli* patógeno aviar (APEC) (Sarowska et al., 2019).

1.4.2.- *Escherichia coli* uropatógena

Escherichia coli uropatógena (UPEC) es el microorganismo extraintestinal más observado en los casos de ITU (Bunduki et al., 2021). Las cepas de *E. coli* suelen adquirir características de resistencia a antibióticos y factores de virulencia mediante la adquisición de elementos genéticos móviles (EGM) ya sean por plásmidos, secuencias de inserción, transposones y casetes de genes o integrones (Calhau et al., 2015). Asimismo, un gran número de EGM presentan la capacidad de promover la resistencia antibiótica y que, mediante mecanismos de transferencia horizontal dada por plásmidos, logran su dispersión entre los miembros de la familia de enterobacterias, con lo cual, los EGM extienden o distribuyen las características de resistencia entre estos mismos (Dobrindt et al., 2003; Partridge et al., 2018). Los factores de virulencia en UPEC suelen encontrarse en islas de patogenicidad, debido a que estas los codifican en un gran número (Behzadi, 2020), además, pueden encontrarse en EGM permitiendo el aumento en la flexibilidad virulenta del microorganismo, tales factores de virulencia le brindan la capacidad a UPEC para colonizar el tracto urinario y así lograr una infección en vías urinarias siendo en su mayoría localizados en la superficie bacteriana del microorganismo (Luna-Pineda et al., 2018; Behzadi, 2020).

UPEC es el principal agente etiológico que causa ITU en la comunidad con un 80 a 90% de los casos reportados (Foxman & Brown, 2003; Terlizzi et al., 2017) y con un 40% en infecciones nosocomiales (Zilberberg et al., 2020; Islam et al., 2022).

1.4.3.- Serogrupos

Una de las clasificaciones más importantes es la serotipificación de *E. coli*, mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra estructuras bacterianas de la superficie celular, estos antígenos son nombrados de acuerdo con su ubicación y son llamados: antígeno somático (O), flagelar (H) y capsular (K) (Bessonov et al., 2021). En la actualidad existen 186 grupos del antígeno O y 53 tipos del antígeno H (Fratamico et al., 2016) y 80 antígenos K (*Escherichia* & Seruminstitut, 1992; Archer et al., 2011). Con lo cual la serotipificación de *E. coli* se vuelve muy compleja. UPEC

se encuentra conformado por un conjunto de serogrupos que comúnmente son: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25, y O75 (Sadeghi et al., 2020).

1.4.4.- Grupos filogenéticos de *E. coli*

La filogenia de *E. coli* se divide en nueve grupos: A, B1, B2, C, D, E, F, clado 1 y el G (Clermont et al., 2013; Clermont et al., 2019). Las cepas comensales de *E. coli* que no son patógenas se encuentran en la mucosa del tracto intestinal y pertenecen a los filogrupos A y B1. Las *E. coli* causantes de infecciones intestinales se encuentran en los filogrupos A, B1 y D. Y, por último, las *E. coli* que causan infecciones a nivel extraintestinal están clasificadas en los grupos B2 y D. Las del grupo E están relacionadas con el D y el grupo F con el B2. Además, las clonas de cepas *E. coli* que muestran diversidad genotípica y que son fenotípicamente irreconocibles se agrupan en el clado I (Köhler & Dobrindt, 2011; Sarowska et al., 2019). Sin embargo, se ha observado que UPEC muestra una amplia distribución en los filogrupos A, B1, B2 y D siendo B2 y D los más frecuentes en caso de ITU (Asadi Karam et al., 2019; Kot, 2019).

1.4.5.- Factores de virulencia

Los factores de virulencia brindan las características para superar y evadir el sistema inmunológico del huésped (Ejrnæs et al., 2011). En el caso de UPEC, su patogenicidad está mediada por un conjunto de factores virulencia que le brindan la capacidad de infectar zonas específicas como lo es el tracto urinario; estos factores pueden estar distribuidos en adhesinas, flagelos, sistemas de captación de hierro, toxinas y factores de evasión de la respuesta inmune (Qin et al., 2013; Terlizzi et al., 2017).

1.4.5.1- Factores involucrados en la adherencia

La adherencia es considerada como el primer paso en el proceso de colonización exitosa en el hospedero (Finlay & Falkow, 1989). Esto surge a través del reconocimiento específico de las adhesinas hacia las moléculas de la membrana del huésped. UPEC posee al menos 13 estructuras de superficie que funcionan

como adhesinas, fimbrias o pili, apéndices de superficie y proteínas de membrana que están involucrados en la adherencia, en pocas palabras, cualquier sustancia o producto génico que contribuya a esta capacidad será considerado como factor de adherencia (Nougayrède et al., 2003; Servin, 2014).

1.4.5.1.1.- Fimbria tipo 1

La fimbria tipo 1 esta codificada en el "*fim gene cluster*" (Chahales & Thanassi, 2015), figura 1. Es una de las fimbrias que se expresa hasta en un 90% de los aislados de *E. coli* ya sean cepas patógenas o comensales. La estructura se basa en la formación de subunidades de pilina FimA, proteínas adaptadoras (FimF y FimG), su afinidad está dada a residuos de manosa; siendo la subunidad FimH la encargada de la adherencia ya que reconoce a las glucoproteínas y epítopes peptídicos en el epitelio de la vejiga, lo cual, permite la adherencia bacteriana y la internalización al epitelio para formar comunidades bacterianas intracelulares (CBI) (Miranda-Estrada et al., 2017). La subunidad FimD cumple su función como proteína de ensamblaje, con lo cual permite la formación de la fimbria tipo 1 y por último la subunidad FimC (chaperona) que tiene como principal función el correcto plegamiento de las subunidades de la fimbria (pilina) (Behzadi, 2020).

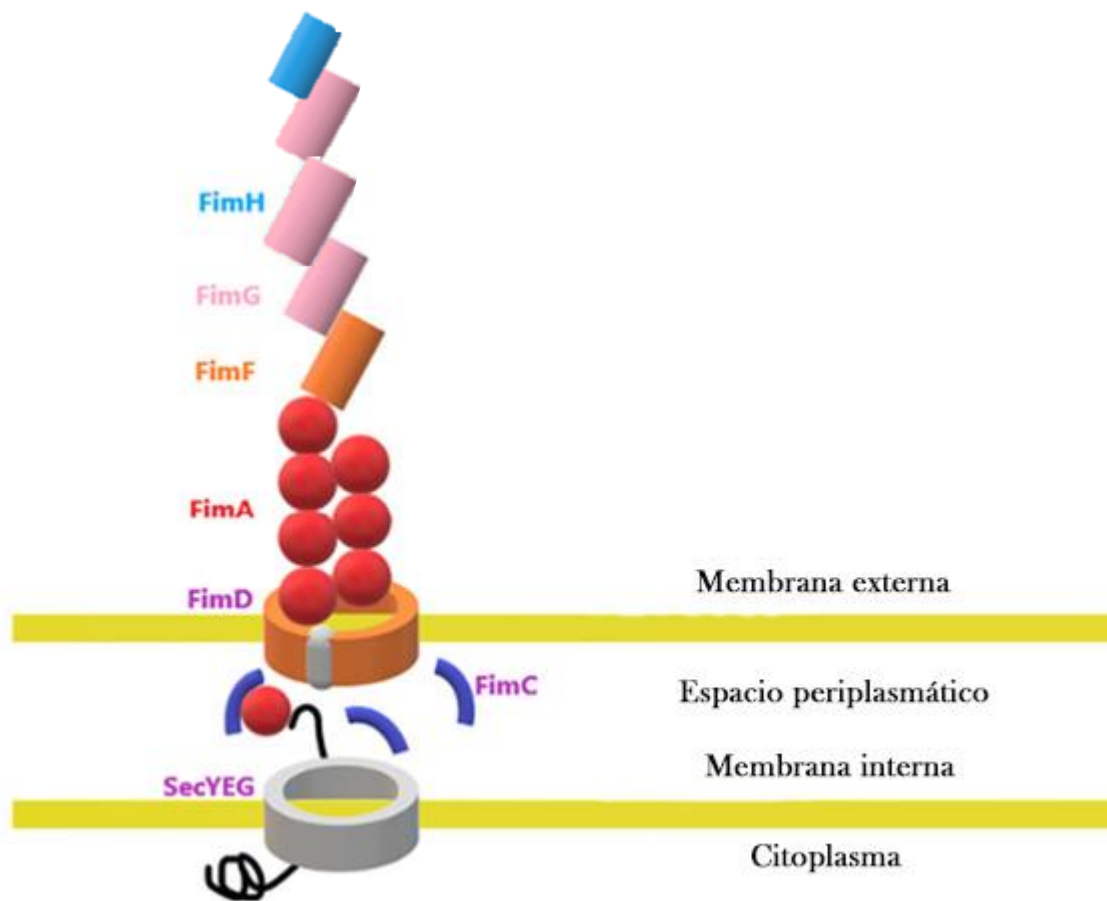


Figura 1.- Representación de la estructura de la fimbria tipo 1. Modificado de Behzadi, 2020

1.4.5.1.2.- Fimbria tipo P

La fimbria tipo P es una fimbria que se encuentra en *E. coli* mayormente en los aislados de pielonefritis y se ha identificado en el operón *pap* (Miranda-Estrada et al., 2017). La fimbria tipo P de UPEC tiene la capacidad de colonizar los riñones debido a su unión a los receptores tipo Gal ($\alpha 1-4$) presentes en los glicolípidos del riñón, además, muestra la capacidad de aglutinar eritrocitos y portar más de un grupo de genes *papG*. La adhesina PapG presenta tres tipos de alelos (clase I, II y III) de los cuales destacan los de clase II ya que se encargan de la infección renal (pielonefritis) y los de clase III encargados en promover la colonización de la vejiga (cistitis). Por último, la punta de la fimbria P está compuesta por PapE que forma una fibrilla, ya que existen entre 5 y 10 copias por fimbria. La adhesina PapG se presenta en una sola copia y se une a PapE mediante el adaptador PapF, figura 2 (Chahales & Thanassi, 2015).

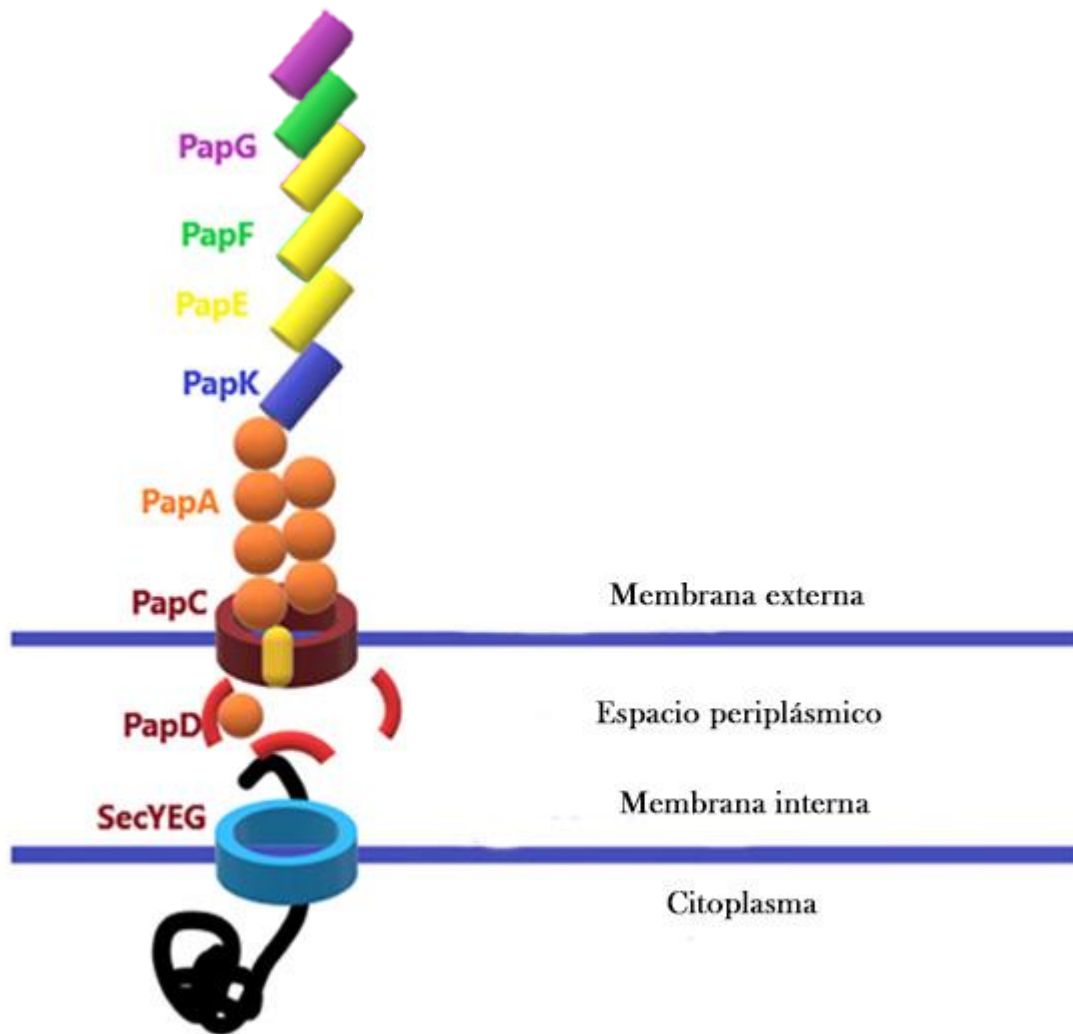


Figura 2.- Representación de la estructura de la fimbria tipo P. Modificado de Behzadi, 2020

1.4.5.1.3.- Proteína reguladora de hierro y adhesina homologa a *IrgA* (*Iha*)

Iha es una adhesina descrita en *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 y se nombró adhesina homóloga *IrgA*, debido a su similitud con el sideróforo de enterobactina (*IrgA*) de *Vibrio cholerae* y es clasificado como un factor de virulencia de ExPEC (Léveillé et al., 2006). Su frecuencia resulta alta en aislados de *E. coli* (Walaa et al., 2019). Además, el gen *iha* se encuentra en EGM que codifican para otros factores de virulencia relacionados con la patogenicidad como el plásmido pO113 que presenta toxinas y adhesinas incluyendo a *iha* (Miko et al., 2014). *Iha* se forma gracias a que es exportada por Sec (sistema secretor) para ser anclada en la

membrana externa mediante la maquinaria de ensamblaje Bam (barril β -) para luego formar un complejo BamABCDE (Ageorges et al., 2020). Se ha demostrado que en UPEC, *iha* se presenta como un sideróforo de catecolato, figura 3 (Herold et al., 2009).

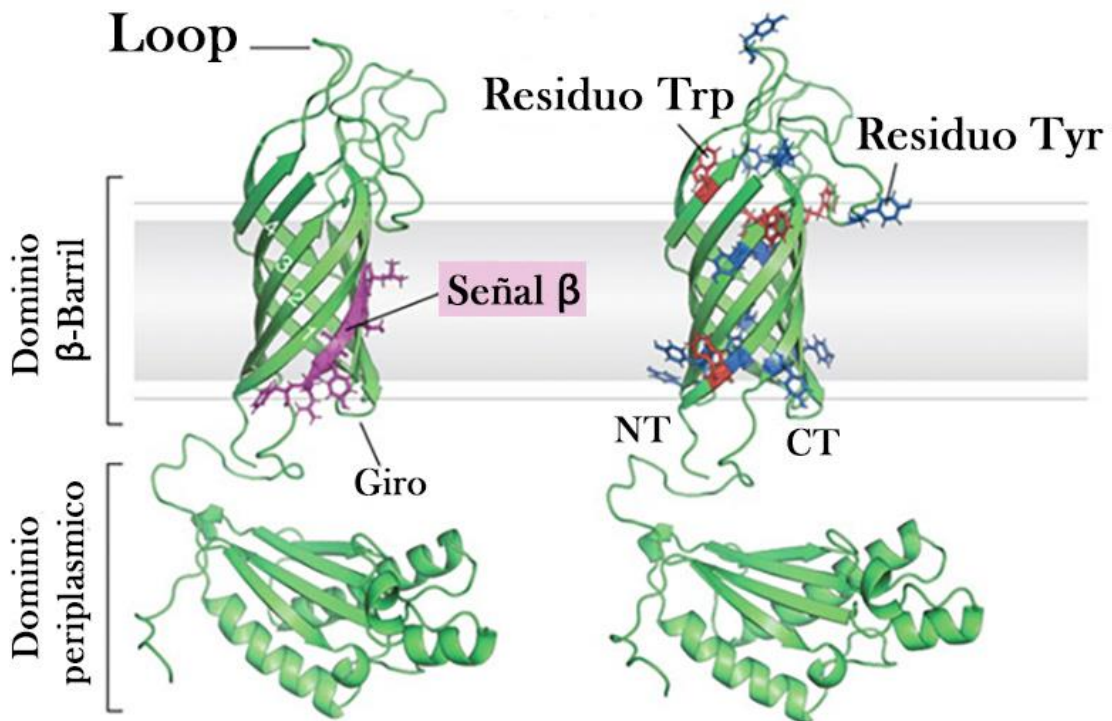


Figura 3.- Representación de la estructura de *Iha* modificado de Horne et al., 2020. De acuerdo con Ageorges et al., 2020 *iha* se encuentra secretado por un T5SS y que está integrado en la membrana externa mediante una maquinaria de ensamblaje de barril β (Bam).

1.4.5.2.- Captación de hierro

Los metales como el hierro, el zinc y el manganeso forman parte importante de los nutrientes de la mayoría de las formas de vida y esto incluye a las bacterias. Es el cuarto elemento más abundante en el planeta y este se encuentra en dos estados: Fe^{2+} y Fe^{3+} . Además, participa en muchos procesos de oxido-reducción (Andrews et al., 2013). Este elemento es esencial para el crecimiento, metabolismo y replicación de las bacterias (incluido el transporte de electrones, glucólisis, síntesis de ADN y defensa contra toxinas) (Weinberg, 1978; Schaible & Kaufmann, 2004).

El principal regulador de la adquisición de metales durante un proceso infeccioso es el sistema inmunológico de los mamíferos ya que con la ausencia de este recurso se logra retener el crecimiento de la bacteria durante la infección, este proceso es conocido como inmunidad nutricional (Obisesan et al., 2021). Ya que se ha observado que proteínas como la calprotectina y en especial la lactoferrina (61% de similitud a la transferrina) forman parte de este sistema de captación de hierro, además de que se ha observado que la lactoferrina tiene una capacidad mayor de afinidad que la transferrina y esta es secretada por neutrófilos (Robinson et al., 2018). UPEC ha desarrollado mecanismos que le permiten la obtención y captación de hierro y zinc mediante la expresión de genes de virulencia, debido a las limitantes para obtener este recurso en el tracto urinario (Alteri & Mobley, 2007; Haley & Skaar, 2013). Uno de los mecanismos más reconocidos es la expresión de sideróforos, ya que forman parte esencial en la adquisición de hierro debido a su afinidad específica por el mismo, lo cual permite la adaptación en diferentes condiciones poco favorables para el microorganismo (Qingqing et al., 2012; Martin et al., 2013).

1.4.5.2.1.- Sideróforos

Son estructuras que tienen una afinidad alta por iones metálicos y que presentan una diversidad estructural, suelen ser secretados por las bacterias para la captación de elementos metálicos como el Fe y que al final terminan siendo integrados al portador, tabla 1 (Robinson et al., 2018).

Tabla 1.- Sideróforos, tipos, genes y receptor de membrana que participan en su expresión y regulación, tomado y traducido de Robinson et al., 2018.

| Sideróforos | Tipo | Genes | Receptor de membrana |
|-----------------------|-------------|--|-------------------------------|
| <i>Enterobactina</i> | Catecolato | <i>entABCDEFS</i> | <i>fepABCDEG</i> y <i>fes</i> |
| <i>Salmoquelina</i> | Catecolato | <i>iroB</i> , <i>iroC</i> e <i>iroE</i> | <i>iroD</i> y <i>iroN</i> |
| <i>Aerobactina</i> | Hidroxamato | <i>iucABCD</i> | <i>iutA</i> |
| <i>Yersinobactina</i> | Mixto | <i>ybtASDUET</i> , <i>irp1</i> e <i>irp2</i> | <i>fyuA</i> e <i>ybtPQ</i> |

1.4.5.2.1.- Aerobactina

La aerobactina es un sideróforo de tipo hidroxamato, que fue aislado de *Aerobacter aerogenes* (Magrath, 1969). La formación de aerobactina está codificada por el operon *iucABCD* (figura 4) y genes como *iutA* (receptor de membrana externa) que se ubican en plásmidos de UPEC (De Lorenzo & Neilands, 1986). *iucABCD* es el operon encargado en la regulación de la expresión del sideróforo de aerobactina y mediante proteínas de regulación de captación de hierro (Fur box) controlan los niveles de homeostasis de este en la célula, ya que en un estudio se observó que el organismo *Vibrio cholerae* activa la producción de aerobactina cuando el hierro no es suficiente y mediante esto, se ha observado que la presencia de la Fur box mantiene la regulación debido a que presenta regiones promotoras en la expresión de aerobactina (*hatC*, *iucA* e *iutA*) (Baichoo & Helmann, 2002; Suzuki et al., 2006). La captación de hidroxamatos férricos está mediada por genes conservados de *E. coli* como *fhuBCD* y, además, este sideróforo tiene la capacidad de eliminar el metal de forma no destructiva y de conservar la aerobactina libre (Williams & Carbonetti, 1986). También se ha mencionado que este tipo de sideróforos está asociado con la resistencia a fluoroquinolonas en cepas aisladas de pacientes masculinos (Parker et al., 2016; Robinson et al., 2018).

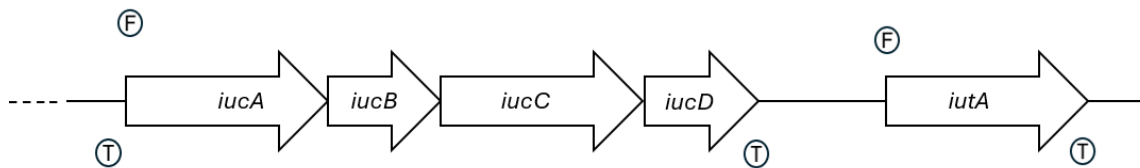


Figura 4.- Representación esquemática del operon *iucABCD*, que codifica la expresión del sideróforo de aerobactina modificado de Suzuki et al., 2006.

1.4.4.3.- Factores de daño al hospedero

De acuerdo con Casadevall & Pirofski, 2003 el concepto de "daño" se refiere a las alteraciones en la normalidad de mecanismos homeostáticos de un hospedero que alteran el funcionamiento de las células, tejidos u órganos. En UPEC existen varias clases de toxinas que interfieren con el metabolismo celular del hospedero mediante su activación debido a su unión a un receptor (Mainil, 2013).

1.4.4.3.1.- Factor necrotizante citotóxico tipo 1 (CNF 1)

Es una toxina de 115 kDa que se expresa en los aislados de UPEC (Garcia et al., 2013). Esta toxina se une a los receptores (p67/LR) de la célula del hospedero, al grupo sanguíneo (Lu) y a moléculas de adhesión celular (BCAM y Lu/BCAM) (Piteau et al., 2014). CNF 1 muestra una actividad celular enfocada a las Rho-GTPasas Rho, Rac y Cdc42, ya que tienen un papel importante en el control de citoesqueleto, en el funcionamiento transcripcional de genes, en el desarrollo del ciclo celular y en la actividad enzimática celular (Etienne-Manneville & Hall, 2002). CNF 1 a nivel celular desamida las Rho GTPasas mediante la glutaminación en la región del interruptor II, siendo importante debido a que esto afecta la capacidad de hidrolisis de GTP (Flatau et al., 1997) y a nivel de sistema genera modificaciones morfológicas que aumentan el contenido de filamentos de actina causando modificaciones en varios tipos de células (Boquet, 2001; Fabbri & Bracci, 2022). Estas modificaciones pueden verse reflejadas en inflamación, daño e incluso apoptosis celular y en otros casos metástasis y cáncer (Herrera-Vázquez et al., 2023)

1.4.4.3.2.- Toxina autotransportadora secretada (Sat)

Es una proteína serina proteasa autotransportadora de *Enterobacteriaceae*. Este tipo de proteínas muestra características típicas, como; una región N-terminal, un dominio extracelular y un barril β C-terminal que está implicado en la translocación de proteínas en la membrana (Dautin, 2010). Las proteínas autotransportadoras han sido clasificadas en 2 grupos; las de clase I que son las del grupo principal con actividad citotóxica y las de clase II que abarcan más una gran diversidad de sustratos y participan en procesos de colonización e inmunomodulación (Ruiz-Perez & Nataro, 2014). Sus funciones han sido estudiadas mediante la cepa UPEC CFT073, tales estudios mostraron actividad proteolítica en caseína, espectrina, fodrina y el factor de coagulación V y también promueve efectos citotóxicos que incluyen vacuolización, autofagia y desprendimiento de células (Maroncle et al., 2006; Toloza et al., 2015).

1.4.4.3.3.- Toxina autotransportadora vacuolizante (Vat)

Vat es una proteína serina proteasa autotransportadora de *Enterobacteriaceae* de clase II, su gen fue originalmente identificado en una isla de patogenicidad conocida como VAT-PAI de *E. coli* (APEC) Ec222 (Nichols et al., 2016). Vat es una toxina de 110 kDa exportada por un sistema de secreción de tipo V identificado tanto en agentes aviáres como en UPEC (tabla 2), siendo su principal efecto la formación de vacuolas en los fibroblastos del embrión de pollo, actualmente el mecanismo de Vat y su desarrollo en ITU no se conoce del todo, pero las secuencias que codifican para la toxina Vat lograron ser censadas en los casos de UPEC (Díaz et al., 2020; Millán et al., 2020). Cabe resaltar que Vat ha sido reportada en un gran número de casos de cistitis, pielonefritis, prostatitis y septicemia (Díaz et al., 2020).

1.4.4.3.4.- Alfa-hemolisina

Alfa hemolisina (hlyA) pertenece a una familia de toxinas llamadas RTX (Repeat in toxins), sus principales características son: la presencia de nanopéptidos ricos en residuos de glicina y ácido aspártico ubicados en la región C-terminal, la secreción mediada por el sistema de secreción de tipo I. Este tipo de proteínas comprenden toxinas con la capacidad de formar poros (Muller et al., 1983 y Welch, 1991). La síntesis HlyA está determinada por el operon *hlyCABD*, *hlyA* codifica para un polipéptido de 110 kDa y este polipéptido denominado proHlyA, es su forma activa (Bakás et al., 2013). Esta toxina actúa sobre distintos tipos celulares como; glóbulos rojos, fibroblastos embrionarios, granulocitos, linfocitos y macrófagos (Cavalieri et al., 1984). Las funciones de HlyA son relacionadas a la destrucción celular facilitando la obtención de nutrientes como el hierro; el mecanismo de acción lítica es un proceso relacionado con el reconocimiento de la célula blanco, la inserción y la oligomerización para finalizar con una lisis celular (Lally et al., 1997). Se ha mostrado información acerca del tipo de receptor que actúa con HlyA en neutrófilos siendo una integrina (CD11a/CD18; $\alpha 1\beta 2$), esto da una idea de que el reconocimiento ocurre con la interacción de glicosilados de la membrana como: glicoproteínas y gangliósidos (Cortajarena et al., 2001).

Tabla 2.- Genes de virulencia en UPEC (modificado de Sarowska et al., 2019).

| DESCRIPCIÓN | GENES DE VIRULENCIA | FUNCIÓN | PATOTIPO EXPEC |
|---|---------------------|--|-------------------------|
| Fimbria tipo 1 | <i>fim</i> | Factor de colonización en infecciones extraintestinales y formación de biopelículas | UPEC, NMEC, SEPEC, APEC |
| Fimbria P | <i>pap</i> | Estimula la producción de citocinas por los linfocitos T y factor de colonización en infecciones extraintestinales | UPEC, SEPEC, APEC |
| Adhesina homologa a Irg A de <i>V. cholerae</i> | <i>iha</i> | Adhesina homóloga a IrgA de <i>V. cholerae</i> regulada por hierro | UPEC |
| Aerobactina | <i>iuc</i> | Sideroforo para la adquisición de Fe ⁺² / ⁺³ en el sistema hospedero | UPEC, APEC |
| FliC | <i>fliC</i> | Permite el movimiento y la expresión de subunidades de flagelina | UPEC |
| TOXINAS | | | |
| Toxina secretada autotransportadora | <i>sat</i> | Toxina proteolítica con efecto citotóxico: influye en la vacuolización celular | UPEC |
| Toxina vacuolizante autotransportadora | <i>vat</i> | Toxina proteolítica que induce la vacuolización de la célula hospedero | UPEC, APEC |
| Hemolisina A | <i>hlyA</i> | Creación de poros en las membranas de las células hospedero (lisis celular) | UPEC |
| Factor necrotizante citotóxico | <i>cnf</i> | Participa en la necrosis celular | UPEC, SEPEC |

1.4.6.- Mecanismos de patogenicidad de UPEC

El mecanismo comienza con la contaminación del área periuretral (figura 5.- a) logrando invadir la uretra (cistitis), siendo paso crucial para el comienzo de su migración hacia la vejiga, y en conjunto con la expresión de fimbrias y adhesinas fimbriales que promueven la adherencia para la colonización e invasión en células sombrilla del sistema urinario, todo esto, lleva a una respuesta del sistema inmunológico del huésped mecanismos de inflamación y de liberación de neutrófilos; esta última siendo de vital importancia, pues logran eliminar bacterias extracelulares aunque se ha observado que algunos organismos infecciosos logran escapar del sistema inmunológico mediante la invasión de las células huésped o cambios morfológicos que generan resistencia a los neutrófilos del hospedero con lo cual, logran multiplicarse y formar biopelículas, que a su paso les permite la generación de toxinas y proteasas de daño celular con lo cual obtienen nutrientes

que benefician a estos y que promueven su desarrollo y migración a nivel de riñones. Una vez invadiendo el riñón se secretan toxinas que dañan el tejido, con lo cual se puede llegar a generar una pielonefritis. Otra forma de infección es mediante la implementación del cateterismo, debido a que el fibrinógeno se acumula en el catéter con lo cual genera un ambiente favorable para la unión de organismos uropatógenos que presentan la capacidad de adherirse a este, generando con el tiempo la liberación de neutrófilos como respuesta inmune, evasión inmunitaria, multiplicación celular, formación de biopelículas, daño celular y colonización renal (figura 5.- b) (Flores -Mireles et al., 2015).

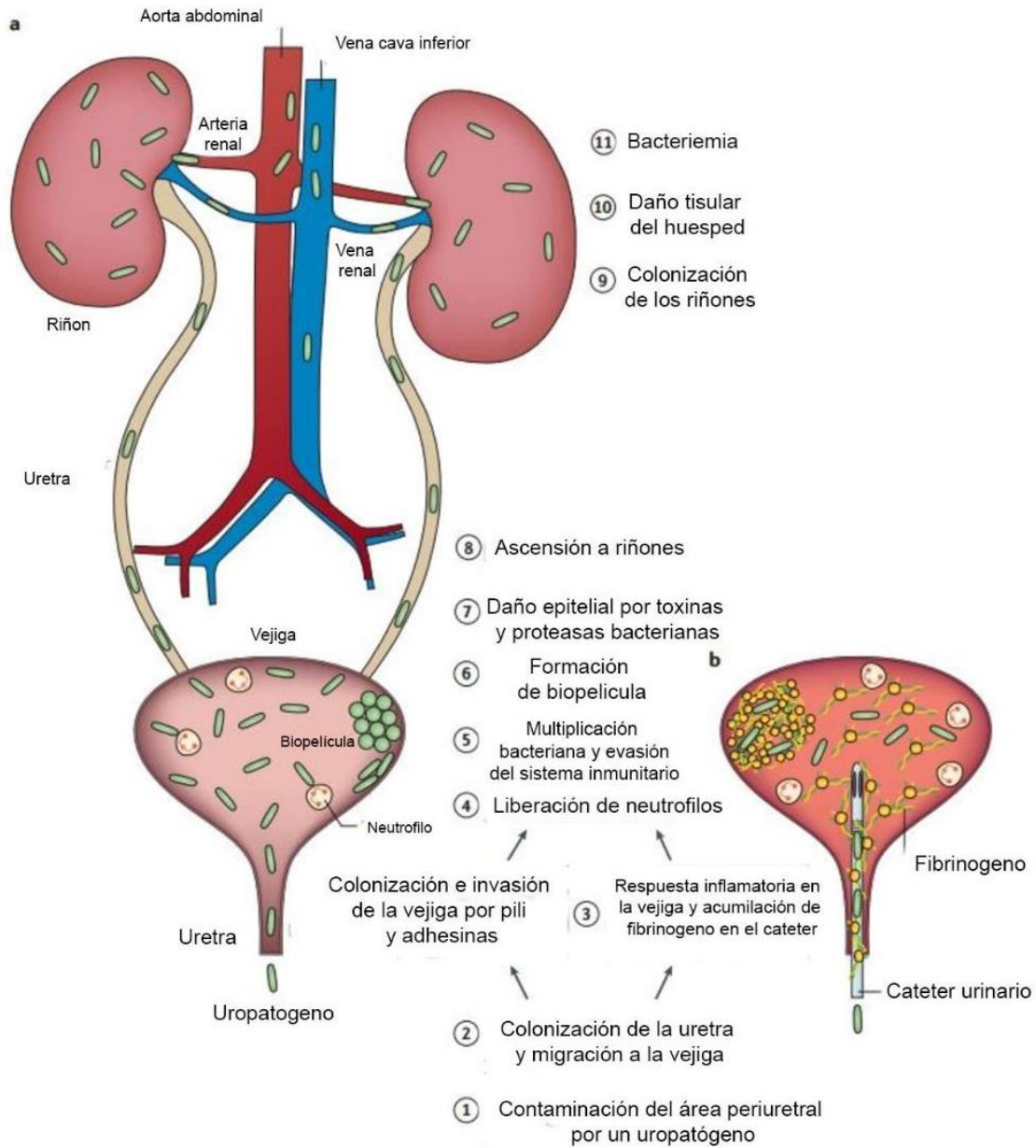


Figura 5.- Mecanismo de patogenicidad mediado por UPEC (modificado de Flores-Mireles et al., 2015).

1.4.7.- Tratamiento

1.4.7.1.- Tratamiento en infantes

Para el tratamiento teórico se debe tener en cuenta el uso de antibióticos de amplio espectro basados en un análisis de cultivo. En infantes se sugiere que la duración del tratamiento deba ser de un lapso de 7 a 10 días, dada la alta resistencia

mostrada en *E. coli* a ampicilina y al trimetoprim, para estos casos se sugiere el uso de ceftibuten (cefalosporina de tercera generación) en dosis de 9mg por kg al día o cefixime (cefalosporina de tercera generación) a 10 mg por kg al día durante 7 días. En menores de 2 años con ITU alta y que no presenten fiebre se recomienda el uso de nitrofurantoína a 7 mg por kg al día en 3 o 4 dosis a la semana, y la dosis de fosfomicina es una opción si el paciente se encuentra controlado (Calderón-Jaimes et al., 2013). También se puede recomendar el uso de gentamicina de acuerdo con la sensibilidad del microorganismo y de las concentraciones adecuadas para el infante (Ramírez et al., 2022).

1.4.7.2.- Tratamiento general a embarazadas

En el tratamiento en embarazadas se ha recomendado el uso de nitrofurantoína, fosfomicina y cefalosporina exceptuando las de primera generación, debido a la alta resistencia que presente *E. coli*. Debido a esto no se recomienda el uso de ampicilina como elección empírica (Romero-Nava et al., 2009; Bonkat et al., 2023).

1.4.7.2.1- Tratamiento a embarazadas en México

Para las mujeres embarazadas se recomienda el manejo de antibióticos en bacteriuria asintomática (ABU) e ITU no complica sin necesidad de un urocultivo, debido a que *E. coli* suele ser el agente causal o en caso de que los síntomas persistan deberá de realizar un análisis clínico. Debido a las repercusiones que pueden generar tales tratamientos al desarrollo del feto no se recomienda el uso de trimetoprim por su acción perjudicial al metabolismo del ácido fólico, las quinolonas por sus efectos en el cartílago fetal y las sulfas no deben emplearse por su unión a la albúmina y bilirrubina, lo cual incrementa el riesgo de hiperbilirrubinemia fetal (Krcmery et al., 2001 y Calderón-Jaimes et al., 2013).

1.4.7.3.- Tratamiento en adultos

Para la población adulta el tratamiento se basa en las tasas de resistencia de aislamiento en la comunidad por parte de *E coli*. Debido a su resistencia antibiótica

a ampicilina, amoxicilina, trimetoprim y quinolonas. Por lo anterior, se recomienda el uso de nitrofurantoína o cefalosporina de segunda o tercera generación. Otra opción es la fosfomicina en caso de mostrar complicaciones con la expresión de betalactamasas de espectro extendido (Guajardo-Lara et al., 2009; Chávez-Valencia et al., 2010 y Calderón-Jaimes et al., 2013).

1.4.8.- Resistencia antibiótica

La resistencia antibiótica es un factor de gran importancia durante una ITU. Ya que es la capacidad que tiene un microorganismo para crecer en un determinado antibiótico y esto puede estar dado por diferentes mecanismos que le permiten su desarrollo en estas condiciones, como mecanismos encontramos: la inactivación enzimática, cambios en la permeabilidad de la membrana y bombas de eflujo, alteración del sitio blanco y creación de un proceso alternativo al proceso inhibido (Gómez et al., 2008). Una de las características más representativas en estos mecanismos es la hidrólisis de β -lactámicos mediante enzimas degradadoras, además de que existe otro tipo de enzima β -lactámica conocida como betalactamasa de espectro extendido (BLEE) que son capaces de degradar en su mayoría a los antibióticos β -lactámicos (Bush & Jacoby, 2010).

1.4.9.- Transferencia horizontal de genes

Es uno de los procesos más comunes que le permite al patógeno la adquisición de material genético entre diferentes especies y géneros de bacterias, existiendo tres tipos de mecanismos, conocidos como: transformación, transducción y conjugación.

1.4.10.- Conjugación

La conjugación es el mecanismo más extenso y que mejor contribuye al "pool" de transferencia horizontal de procariotas (Llosa & De La Cruz, 2005), ya que consiste en la transferencia genética de una célula donadora a una célula receptora a través de una maquinaria de conjugación codificada en un plásmido (Panicker & Minkley, 1985). De acuerdo con Norman y cols. (2009) la conjugación de plásmidos contribuye significativamente a la propagación horizontal de la virulencia y de la

resistencia a los antibióticos, porque los genes de virulencia y de resistencia se localizan con frecuencia en los plásmidos. La conjugación también muestra mecanismos que se encargan de la distribución de genes para la degradación de contaminantes orgánicos, dando una ventaja en las condiciones que le permiten acelerar los procesos de transferencia a nivel de plásmidos y en el proceso de adaptación bacteriana sujeto a cambios externos que no le favorezcan (Rozo & Dussán, 2010).

1.4.10.1.- Sistema de secreción de tipo IV.

La conjugación en bacterias gran negativas ocurre cuando se presenta el mecanismo de secreción de tipo IV (T4SS), donde el DNA plasmídico de una hebra se transporta entre dos células apareadas (unidas). La transferencia plasmídica se da por la activación de un complejo multiproteico que atraviesa la envoltura celular de la célula donadora y la receptora (Goessweiner-Mohr et al., 2013 y Christie et al., 2014). Normalmente este tipo de procesos se compone de ATPasas, proteínas de traslocación, proteínas de membrana interna, proteínas centrales de la envoltura celular y proteínas de pili (Koraimann & Wagner, 2014). Los plásmidos llamados IncF son los modelos conjugativos, y este grupo, presenta más de 25 genes de transferencia (genes *tra*) y están organizados en una región continua de transferencia, además, la conjugación solo se presenta cuando las condiciones son propicias para este proceso (Singh & Meijer, 2014; Møller et al., 2017).

1.5.10.2.- Genes *Tra*

Son un conjunto de genes encargados de la propagación del plásmido por conjugación mediante la interacción de una célula huésped a una receptora compatible. El locus se conforma de un gen regulador de pilina y genes encargados de formar el pili conjugativo en la superficie celular. El pili está conformado por proteínas poliméricas que le permiten a la bacteria que lo expresa en su superficie, adherirse a la bacteria receptora (F-) para iniciar la conjugación, (tabla 3) (Grohmann et al., 2003).

Tabla 3.- Genes *tra* y características generales. C: citoplasma, ME: membrana externa y MI: membrana interna. Tomado y modificado de Komano et al., 2000 y Virolle et al., 2020.

| Gen | No. de aminoácidos | Localización | Acción | Gen | Origen |
|-------------|---------------------------|---------------------|-------------------------------------|--------------------|-----------------------|
| <i>traE</i> | 274 | C | Proteína de ensamble de pili | <i>virE1</i> | Ti |
| <i>traF</i> | 400 | ME | Señal de péptido | - | - |
| <i>traG</i> | 194 | ME | Señal de péptido | <i>afrS</i> | <i>E. coli</i> |
| <i>traH</i> | 152 | ME | Proteína de extensión del pili | <i>dotD</i> | <i>L. pneumophila</i> |
| <i>traI</i> | 272 | ME | Lipoproteína/relaxosoma | <i>dotC</i> | <i>L. pneumophila</i> |
| <i>traG</i> | - | MI | Proteína de regularización | - | - |
| <i>traB</i> | - | MI | Proteína de extensión del pili | - | - |
| <i>traJ</i> | 382 | C | Regulación | <i>dotB</i> | <i>L. pneumophila</i> |
| <i>traC</i> | - | MI | Proteína de ensamble de pili | - | - |
| <i>traK</i> | 96 | MI | Proteína de ensamble de pili | <i>icmT</i> | <i>L. pneumophila</i> |
| <i>traD</i> | - | MI | T4CP | - | - |
| <i>traL</i> | 115 | ME | Proteína de ensamble de pili | - | - |
| <i>traM</i> | 230 | MI | Relaxosoma | <i>cmL (dotI)</i> | <i>L. pneumophila</i> |
| <i>traN</i> | 327 | ME | Proteína de regulación | <i>icmK (dotH)</i> | <i>L. pneumophila</i> |
| <i>traA</i> | - | MI | Pili | - | - |
| <i>traP</i> | 234 | MI | Proteína de extensión del pili | - | - |
| <i>traQ</i> | 175 | MI | Proteína chaperona | - | - |
| <i>traR</i> | 134 | MI | Proteína reguladora | - | - |
| <i>traS</i> | 62 | C | Proteína de entrada de exclusión | - | - |
| <i>traT</i> | 266 | C | Proteína de superficie de exclusión | - | - |
| <i>traU</i> | 1014 | C | Proteína de unión-nucleótido | <i>cmB</i> | <i>L. pneumophila</i> |
| <i>traV</i> | 204 | C | Proteína de extensión del pili | - | - |
| <i>traW</i> | 400 | ME | Proteína de extensión del pili | - | - |
| <i>traX</i> | 194 | MI | Proteína de maduración de pili | - | - |
| <i>traY</i> | 745 | MI | Regulación del relaxosoma | <i>dotA</i> | <i>L. pneumophila</i> |

1.5.10.2.1.- *traT*

Es un gen característico de exclusión, codifica para una proteína que se encuentra en gran cantidad alrededor de la membrana externa (Manning et al., 1980). La proteína TraT inhibe la formación de agregados de apareamiento, al interferir en la interacción entre el pili conjugativo y los receptores de superficie celular (Virolle et al., 2020).

1.5.10.3.- Genes *MOB*

Son un conjunto de genes que codifican para relaxasas junto con otros elementos encargados de la movilidad de los plásmidos conjugativos e identificados en 6 familias: *MOB_F*, *MOB_H*, *MOB_Q*, *MOB_C*, *MOB_P* y *MOB_V*, tabla 4 (Garcillán-Barcia et al., 2009 & Smillie et al., 2010).

Tabla 4.- Genes *MOB*, clado y patotipos, relaxasas y grupos de incompatibilidad encontrados en *Enterobacteria*, *Pseudomonas* y *S. aureus*. Tomado y modificado de Garcillán-Barcia et al., 2009

| Genes <i>MOB</i> | Clado | Patotipos-relaxasas y plásmidos (grupo de incompatibilidad) |
|-------------------------------|-------|--|
| <i>MOB_F</i> | F11 | TrwC_R388 (IncW) |
| | | TraI_R46 (IncN) |
| | | pWVO (IncP9) |
| | F12 | TraI_F (IncFI) |
| <i>MOB_H</i> | H11 | TraI_R1 (IncFII) |
| | | TraI_pED208 (IncFV) |
| | | TraI_R27 (IncHI1) |
| | H12 | raI_R478 (IncHI2) |
| | | TraI_pIP1202 (IncA/C) |
| | | traI_R391 (IncJ) |
| | | TraI_Rts1 (IncT) |
| <i>MOB_C</i> | H2 | TraI_Neigo (chromosomal GI) |
| | C1 | MobC_CloDF13 (mobilizable) |
| | C2 | TraX_pAD1 |
| <i>MOB_Q</i> | Q1 | MobA_RSF1010 (IncQ1/IncP4) |
| | | TraA_pTiC58 |

| | | |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| MOB_P | Q2 | TraA_p42d |
| | Q3 | TraA_pIP501 (Inc18) |
| | P11 | Tral_RP4 (IncP1a) |
| | P12 | Tral_R751 (IncP1b) |
| | | NikB_R64 (Incl1) |
| | P13 | NikB_R387 (IncK) |
| | | pCTX-M3 (InclM) |
| | P14 | MobA_pTF-FC2 (IncQ2a) (mobilizable) |
| | | MobA_pTC-F14 (IncQ2b) (mobilizable) |
| | | MobA_Rms149 (IncG/IncP6) |
| | P2 | VirD2_pTiC58 (T-DNA transport) |
| | P3 | TaxC_pOLA52 (IncX1) |
| | | TaxC_R6K (IncX2) |
| | P4 | VirD2_pFBAOT6 (IncU) |
| TraS_pSB102 | | |
| P5 (MOB _{HEN}) | MbeA_CoIE1 (mobilizable) | |
| P6 | NikB_R721 (Incl2) | |
| P7 | PcfG_pCF10 | |
| | MobA_pC221 (Inc4) | |
| | MobA_pC223 (Inc10) | |
| MOB_V | V1 | MobM_pMV158 |
| | | pE194 (Inc11) |
| | | pUB110 (Inc13) |
| | V2 | Mob_pBBR1 |
| | V3 | BmpH_Tn5520 (chromosomal Tn) |
| | V4 | MobA_Tn4555 (chromosomal Tn) |
| | | Orf20_Tn916 (chromosomal Tn) |

1.5.10.4.- Tipos de plásmidos

Los plásmidos poseen una amplia maquinaria de proteínas de acoplamiento conjugativo y de relaxasas, siendo estas de vital importancia en la conjugación de plásmidos. Junto con lo antes mencionado se ha observado que en total un cuarto de todo los plásmidos son conjugativos, al igual que la cantidad de plásmidos movilizables y la mitad sobrante son no movilizables. Esto se debe a que con el paso del tiempo los elementos de conjugación divergen entre los sistemas de movilidad, con las relaxasas y proteínas de acoplamiento de tipo IV o mejor conocidas como T4CP y separados del otro conjunto secretor conocido como T4SS (Smillie et al., 2010). En pocas palabras los plásmidos que portan un sistema de proteínas de acoplamiento (T4CP), relaxasas (*MOB*), un sistema de secreción de

tipo IV (T4SS) y el punto de origen de replicación (*oriT*) son catalogados como conjugativos. Aquellos que solo presentan un sistema de proteínas de acoplamiento (T4CP), relaxasas (*MOB*) y el punto de origen de la replicación (*oriT*) serán nombrados como plásmidos movilizables (dependientes de un plásmido conjugativo) y los no movilizables son considerados aquellos que no entran en alguna de estas categorías (Alvarado et al., 2012).

2.- Antecedentes

2.1.- Antecedentes internacionales

En un estudio realizado por Javed y cols. en 2019 se evaluó *E. coli* DH5 α para determinar su concentración mínima de azida de sodio y se expuso continuamente al aumento de este, y con una concentración mínima inhibitoria de 23 a 256 $\mu\text{g/ml}$. La conjugación se realizó con aislados de UPEC MDR como donadoras procedentes del hospital de Karachi, Pakistán y la *E. coli* DH5 α resistente a azida de sodio como receptora. Los transconjugantes se recuperaron con placas de azida de sodio a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ y 4 $\mu\text{g/ml}$ de cefotaxima. El resultado mostró 4 transconjugantes con fenotipos de resistencia para cefalosporinas de tercera generación y genotipos CTX-M, TEM y genes de integrón de clase 1 (*intl1*, *sul1* y *qacE Δ 1*) excepto una cepa que no logró transferir el gen *intl1* (Javed et al., 2019).

De acuerdo con Pérez y cols. en 2020 seleccionaron 150 cepas de *E. coli* aisladas de humanos (13 de pacientes sanos y 36 de casos clínicos), 48 productos alimenticios, 20 de granjas (piensos) y 33 de ríos y plantas de tratamiento de aguas residuales). La conjugación se realizó seleccionando 70 cepas sensibles a estreptomicina y el proceso de conjugación se llevó mediante el uso del medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) donde se cultivaron las cepas donadoras y receptora y estas se mezclaron 1:1 y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Los transconjugantes se seleccionaron en agar Tripteína Soya Agar TSA con estreptomicina (100 g/ml) y ampicilina (30 g/ml) para inhibir el crecimiento de la cepa donadora y receptora. Los resultados de conjugación mostraron que la transferencia

de BLEE fue del 100% hacia las clonas de la receptora (*E. coli* DSM 9036) generando resistencia a ampicilina, además se observó que las cepas de ríos tenían un mayor valor de conjugación con respecto al resto fue de $1.15 \times 10^{-1} \pm 5 \times 10^{-1}$, el más observado fue de $2.35 \pm 8.51 \times 10^{-2}$ y se demostró que 18 cepas MDR eran del filogrupa B2. En el análisis de resistencia antibiótica de transconjugantes se observó que 4 clonas (3 de granjas y 1 de río) obtuvieron la resistencia mediada por *bla*_{TEM}, además de que otras 5 (2 de río y 3 de aguas residuales) adquirieron características de resistencia mediada por *bla*_{CTX-M}. Los resultados de virulencia mostraron que todas las transconjugantes (n=70) fueron positivas para uno, dos o tres genes de virulencia y la presencia de varios factores de virulencia en la misma cepa. Los genes estudiados en este trabajo fueron *fimH* (Fimbria tipo 1), *aer* (sideroforo), *papC* (fimbria P), *papGIII* (fimbria P), *cnf-1* (factor necrotizante citotóxico tipo I) y *hlyA* (α -hemolisina) y de estos el perfil de virulencia más pequeño fue el de *papC* y *fimH* y el más grande fue el de *fimH*, *aer*, *papC*, *cnf-1* y *hlyA* (Pérez et al., 2020).

Mientras que Zangane y cols. en 2021 realizaron un estudio en octubre de 2018 a diciembre de 2019, obteniendo 427 aislados de *E. coli* procedentes de pacientes con ITU de hospitales y laboratorios de la ciudad de Ahvaz, Irán. De los cuales 406 aislados son cepas confirmadas de UPEC mediante la identificación de colonias fermentadoras de lactosa en medio Mac Conkey o la presencia de colonias de color verde metálico en EMB. Además, se realizaron pruebas bioquímicas de lisina descarboxilasa, oxidasa, SIM, citrato de Simmon y rojo de metilo. Por último, se detectó el gen *uspA* para *E. coli*. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad a estas cepas mostraron los siguientes porcentajes de resistencia: Ampicilina con 82.3%, cefazolina con 80%, la tetraciclina con 59.4%, el ácido nalidíxico con 59.1% y el 3.2% de los aislados fueron susceptible a todos los antimicrobianos probados y el resto fue resistente a al menos uno o más antimicrobianos. Se encontró un perfil multidrogo-resistente (MDR) en el 92% aislados (377). El proceso de conjugación se llevó a cabo con aislados productores de MBL o carbapenemasas y fueron conjugados con un microorganismo enteroinvasivo lactosa negativo de *E. coli* (EIEC) y posteriormente se analizaron para determinar la presencia de genes de resistencia. La conjugación mostró que el imipenem y el meropenem fueron

transferidos a las transconjugantes por conjugación. En este estudio se observó el resultado del proceso de transferencia de la resistencia a carbapenémicos proveniente de las 12 cepas donadoras, dado que estas crecieron en un medio adicionado con carbapenémicos (Zangane et al., 2021). Además, los perfiles plasmídicos mostraron variaciones en los tamaños de los plásmidos ya que oscilaban entre los 5 kb y los 50 kb además de que se observaron diferentes distribuciones plasmídicas además de que se comparó la carga plasmídica de las donadoras y se observó que no todos los plásmidos fueron transferidos.

Kuznetsova y cols. en 2022 trabajaron con una colección de 93 cepas de UPEC aislada de pacientes con reportes de infección en las vías urinarias proveniente de la clínica hospital "Urban" No.4 en Perm, Rusia entre los años de 2015 y 2017, y que, mediante criterios de conjugación que consistieron en la selección de la cepa donadora y la cepa receptora para mezclarlas en un placa de LB e incubarlas durante una noche a 37 °C, para después colocarlas en una placa de medio con presión de selección usando Gm y Cm e incubándolas toda la noche a 37 °C. En este trabajo sólo 29 cepas fueron candidatas para ser utilizadas como receptoras y como donadora la cepa N41 pOX38:Cm ya que porta un gen de resistencia a Gm cromosómicamente y un plásmido con resistencia a Cm. Las frecuencias más alta de conjugación que se observó fue en la cepa R32 ($1,26 \pm 0,21 \times 10^{-1}$) y la más baja en la R55 ($1,28 \pm 1,03 \times 10^{-5}$). El resultado de los filogrupos obtenidos de las cepas transconjugantes fue de 41.4% (12) pertenecientes al filogrupo B2, 17.2% (5) al A, 10.3% (3) al grupo B1, 10.3% (3) al E, 6.9% (2) al C, 3.4% (1) al F, 3.4% (1) al clado I o II y 6.9% (2) no tipificables (NT). Acerca de los genes de virulencia se observó que el gen *fimH* se encontraba en el 72.4% (21), *papC* en el 34.5% (10), *iroN* en 27.6% (8) *cnf*, *hlyA*, *sfaDE* y *afa/draBC* en el 20.7% (6) e *ibeA* en solo 3.4% (1). Para los resultados obtenidos de la resistencia antibiótica se observó que el 20.69% (6) de las transconjugantes fueron resistentes a ampicilina y el 79.31% (23) eran resistentes a otros grupos de antibióticos, pero mayormente a fluoroquinolonas con el 62.07% (18) (Kuznetsova et al., 2022).

2.2.- Antecedentes nacionales

El estudio realizado por Hernández y cols. en el 2016 donde obtuvieron 131 muestras clínicas de *E. coli* de pacientes ambulatorios durante inicios de Enero hasta el mes de Agosto del 2014, procedentes de la clínica del I.S.S.S.T.E en Chilpancingo, Guerrero, México. En donde solo se examinó un aislado por paciente y se realizaron las pruebas de susceptibilidad a ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefazolina, ceftriaxona, cefepima, aztreonam, amikacina, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacina, moxifloxacino, nitrofurantoína y trimetoprima/sulfametoxazol. Los aislados resistentes a 3 o más antibióticos fueron catalogados como multirresistentes. Para realizar el ensayo de conjugación Hernández y cols. utilizaron el método descrito por Miller (1992) junto con 5 cepas portadoras de BLEE. La cepa J53 se utilizó como cepa receptora y las transconjugantes fueron seleccionadas en medios selectivos con azida de sodio (150 µg/ml) más ampicilina o ceftazidima teniendo un total de 5 transconjugantes donde los filogrupos estaban representados de la siguiente manera: 3 para el filogrupo B2, 1 al D y 1 al C, además tres transconjugantes recibieron todos los genes descritos en este trabajo bla_{CTX-M} , bla_{SHV} y bla_{TEM} , otras dos no recibieron el gen bla_{CTX-M} pero si el resto y fueron sensibles a CAZ y CTX (Hernández et al., 2016).

Durante el 2018, Ramírez y cols. realizaron un estudio con ciento diez muestras recolectados de pacientes con una ITU procedentes del Hospital Miguel Hidalgo, en Aguascalientes, México durante el periodo de Junio a Noviembre de 2012 y el rango de edad oscilo desde recién nacidos y adultos de 91 años. En el estudio se trabajaron con 86 muestras de mujeres (78.2%) y 24 muestras procedentes de varones (21.8%) siendo en total 110 cepas *E. coli*. 79 de las muestras fueron obtenidas de comunidades (71.8%) y 31 de hospitales (28.2%). La distribución de los filogrupos de las cepas estudiadas fue la siguiente: D (23.6%), A (19.1%), B1 (15.5%), C (13.6%), B2 (11.8%), F (10%), Clado no definido (5.5%) y E (0.9%). La alta frecuencia de resistencia se observó en Trimetoprima- sulfametoxazol (72,7%), ampicilina (70,9%), ampicilina-sulbactam (55,5%), piperacilina-tazo-bactam (55,5%), ciprofloxacina (47,3%) y levofloxacina (43,6%). El 87% de los aislados

fueron resistentes a un antibiótico y el 63.3% (70) fueron multidrogo resistentes, y estos, presentaron resistencias a ampicilina (85,7%), trimetoprim-sulfametoxazol (84,3%), ampicilina-sulbactam (77,1%), piperacilina-tazobac-tam (77,1%) y ciprofloxacino (70%). En la presencia de factores de virulencia se observó la siguiente distribución: *fimH* (71.8%), *fyuA* (68.2%), y *agn43* (54.5%) estos siendo lo más altos en los aislados de estudio y los más bajos *afa/dra* (8.2%) y *cnf1* (2.7%) y *chuA*, (49.1%), También se detectó la presencia de otros factores de virulencia como: *papC*, (42.7%), *kpsM-TII* (37.3%), *vat* (20%), *yfcV* (20%) *sfaS* (10%), y *hlyA* (9.1%) estos factores fueron mayormente encontrados en cepas clínicas. La presencia de *chuA* se identificó mayormente en aislados de UPEC en niños ($p=0.0483$). y en cuestión de las cepas multidrogoresistentes, se analizó la expresión de los siguientes factores de virulencia: *fmH* (72.9%), *fyuA* (65.7%), *agn43* (55.7%) y *chuA* (45.7%). Y por último se determinó que la expresión de genes de virulencia es mayor en cepas de mujeres con un 21.5% y en varones se observó en un 7.9% (Ramírez et al., 2018).

2.2.1- Antecedentes específicos

Ixtepan en 2013, analizó 116 cepas de *E. coli*, 51 procedentes de la ciudad de Puebla en el 2016 del hospital I.S.S.S.T.E y 65 del sector hospitalario público y privado durante el periodo del 2011-2015. Se estudió la resistencia a 24 antibióticos y 10 familias de antibióticos. Los resultados del cepario del I.S.S.S.T.E mostraron resistencia a los siguientes antibióticos: β - lactámicos 95.2%, quinolonas 94.9% y aminoglucósidos 52.2%, siendo más puntuales: ampicilina y cefuroxima 100%, norfloxacina y ofloxacina, 98%, ceftriaxona 97%, amoxicilina-ácido clavulánico, ciprofloxacina, cefalotina y levofloxacina 96%, ceftazidima, cefotaxima, cefepime y aztreonam 92%, ácido nalidíxico y tetraciclina 86%, gentamicina 78%, amikacina 63%, netilmicina 16%, fosfomicina y colistina 12%. Las cepas del periodo del 2011-2015, son resistentes a β -lactámicos de primera generación (96.9%), quinolonas de segunda generación (81.1%) y aminoglucósidos (53.8%). Siendo la resistencia a ampicilina del 97%, cefalotina 96%, amoxicilina y ácido clavulánico 80%, ácido nalidixico 85%, norfloxacina 80%, ciprofloxacina 83%, ofloxacina 80%, levofloxacina

82%, gentamicina 68%, amikacina 66%, trimetropim/sulfametoxazol 66% colistina 23% y fosfomicina 3%. Los genes de virulencia solo fueron llevados para las cepas del I.S.S.S.T.E y los más frecuentes fueron; *fimH* (96%) y *iucD* (65%), *iha* 35%, *hlyA* 19% y *cnf-1* 11% y en menor porcentaje *papA+papG*, *sat*, *fliC* con 8%, el rango de genes estuvo en 1 a 9 en el 96%, de 2 en 25%, de 1 en 16%, de 3 a 6 en 14% y 5 con 12% de las cepas, además de no presentarse el gen *vat*. Para el perfil plasmídico se describe que el mayor tamaño de los plásmidos que se encontraron fue 10.5 kb y el menor fue 0.25 kb, además de que el 56.8% de las cepas no presento plásmidos. Se obtuvieron en los ensayos de conjugación 4 clonas de las cuales poseen los mismos factores de virulencia, *fimH*, *sat*, *iucD* e *iha*, que la cepa donadora y receptora, además de que la resistencia estaba dada en genes codificantes *bla*_{TEM+} (Ixtapan, 2013).

García, 2017 trabajo con 66 aislados de UPEC procedentes de la ciudad de Puebla en el 2010 (I.S.S.S.T.E). De los cuales 35 eran de varones y 43 de mujeres. Los rangos de edad van desde 1 a 89 años. Los filogrupos más prevalentes fueron: A (33%) y el B2 (32%). Para D, C, F, y B1 se presentaron en 12%, 9%, 6%, y 3%. Los genes de virulencia se distribuyeron en: *iucD* (100%), *vatA* (98%), *vatP* (94%), *fimH* (91%), *satP* (79%), *papGII* (61%), *satA* (61%), *fliC* (55%), *iha* (44%), *papGIII* (9%), *papA* (2%), *hlyA* (5%), y *cnf-1* (5%). Se realizó un conteo de genes completos para el cepario, siendo los siguientes porcentajes: *iucD* (100%), *fimH* (91%), *vat* (92%) *sat* (56%) *iha* (44%) *cnf-1* (5%) *hlyA* (5%), *fliC* (55%) *papA+papGII+papGIII* (2%) *papA+papGII* (0%) y *papA+papGIII* (0%). Se evaluaron 24 antibióticos de 10 familias según Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017), obteniendo el siguiente porcentaje de resistencia: gentamicina (36%), netelmicina (6%), amikacina (45%), ampicilina (97%), cefalotina (97%), cefuroxima (97%), ceftriaxona (61%), ceftazidima (82%), cefotaxima (64%), cefepime (27%), aztreonam (29%), amoxicilina/ácido clavulánico (85%), ácido nalidíxico (85%), norfloxacin (67%), ciprofloxacina (67%), ofloxacina (67%), levofloxacina (65%), trimetoprim/sulfametoxazol (73%), cloranfenicol (50%), nitrofurantoina (53%), tetraciclina (70%), ertapenem (0%), fosfomicina (9%), colistina (9%), además las cepas presentaron resistencia multidrogo resistente y el 3% como extremadamente

resistentes. Por último, el 24% de las cepas presentaron producción de betalactamasas de espectro extendido (García, 2017).

Huelgas, 2020 trabajo con 24 aislados de varones procedentes del I.S.S.S.T.E de la ciudad de Puebla durante el periodo del 2015 al 2016. Donde la edad media fue de 71 años. Los rangos de edad van desde 46 a 91 años. Los filogrupos más prevalente fueron: B2 (60%), C (17%) y el A (9%). Los filogrupos D, E y clado I e indeterminados representaron el 4%. Los genes de virulencia más frecuentes fueron *FimH* (92%) e *iucD* (88%), el resto de los genes se encontraron en los siguientes porcentajes *lha* (65.5%), *pap* (54%), *sat* (50%), *vat* (12%), *hyla* (30%), *cnf-1* (30%), y *fliC* (0%). Los genes *papGII* y *fliC* no se encontraron. Las cepas mostraron resistencia a las quinolonas (100%), betalactámicos (90%), las tetraciclinas (83%), inhibidores de la vía folato (80%), aminoglucósidos (50%), fenicoles (33%) polimixinas (30%), nitrofuranos (20%) y ácidos fosfóricos (4%). El 70% (19) de las cepas mostraron resistencia MDR y el 30% (5) mostró un patrón XDR (extremo drogo-resistente) y el perfil más frecuente fue bla_{CTX-M} (62.5%). Para el perfil de los plásmidos se encontró que el 60% presento al menos una banda plasmídica y de estas al menos tuvieron en promedio 2 bandas y la mayoría presentaban de 1 a 3 con pesos que oscilaban de 1 Kb a 10 Kb (Huelgas, 2018).

Cortez, 2020 estudio un total de 51 cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, durante los años 2015-2016 de paciente femeninos con edades de 21 a 84 años. De las cuales se obtuvieron 10 transconjugantes y se les realizaron pruebas de adquisición de factores de resistencia y virulencia. En los resultados de resistencia se observaron los siguientes porcentajes a los distintos fármacos empleados: Iniciando por el uso de amoxicilina con ácido clavulánico con un porcentaje de resistencia de 100%, luego de ampicilina 100%, y así sucesivamente para el resto de antibióticos, cefalotina 100%, ceftazidima 88%, cefotaxima 75%, tetraciclina 60%, cloranfenicol 57%, Gentamicina 56%, cefuroxima 50%, ciprofloxacina 50%, ceftriaxona 40%, ofloxacina 38%, cefepime 25%, ácidonalidíxico 20% y norfloxacina con un 10%. En los factores de virulencia se

observó la siguiente distribución: *iha* (100%), *iucD* (80%) y *satA* (70%) (Cortez, 2020).

Las cepas estudiadas por Huelgas en el 2020 mostraron que los filogrupos más prevalente fueron el filogrupo B2 con el 60% de las cepas, el C con el 17% y por último el A con 9% y para el resto de los filogrupos D, E y clado I e indeterminados representaron el 4%. Para los genes de virulencia se observó que los más frecuentes fueron *FimH* con 92% de las cepas e *iucD* con el 88%, el resto de los genes se encontraron en los siguientes porcentajes: *lha* con el 63% de presencia, 63% para *traT*, *kpsMT-II* en un 58%, *pap* con 54%, *sat* con 50%, *vat* con el 12%, *hlyA* con 30% y por último el gen *cnf-1* con 30% de presencia en el cepario y para los genes *papGII* y *fliC* no se encontraron. Las cepas mostraron 4 resistencias principales siendo la resistencia a las quinolonas del 100%, betalactámicos (90%), las tetraciclinas (83%), inhibidores de la vía folato (80%) (Huelgas, 2020).

3.- Justificación

Los estudios actuales han desarrollado un enfoque terapéutico para el tratamiento y la prevención de las infecciones del tracto urinario, estos tratamientos han sido dirigidos tanto a los grupos patógenos como a los grupos hospederos, sin embargo, uno de los problemas más recientes a los que se enfrentan estos procedimientos es la presencia de microorganismos con factores de virulencia y resistencia antibiótica cada vez más persistentes y de fácil propagación en la comunidad bacteriana.

Esto ha generado que se compliquen los métodos clínicos actuales comprometiendo la estabilidad económica sanitaria de las comunidades y países alrededor del mundo, ya que las infecciones en vías urinarias se han descrito como uno de los principales problemas existentes en el área de la salud. De los agentes etiológicos de ITU destaca principalmente UPEC, ya que ocupa el primer lugar como agente causal de las infecciones en el tracto urinario a nivel mundial; debido a que es capaz de evadir los tratamientos mediante la expresión de factores de virulencia, resistencia antibiótica y complementarse con procesos de transferencia genética mediada por plásmidos que permite la diseminación de factores de virulencia y/o resistencia mediante el proceso de conjugación, incrementando estos rasgos en las comunidades bacterianas, con lo cual, complica aún más su tratamiento. Por este motivo, existe una necesidad de estudiar estos procesos para determinar la capacidad de transferencia por conjugación de los factores de resistencia antibiótica y de virulencia que han sido observados en UPEC con la finalidad de mejorar la comprensión de estas características emergentes mediadas por conjugación, y así, aportar en el entendimiento de estos mecanismos de transferencia codificados por plásmidos.

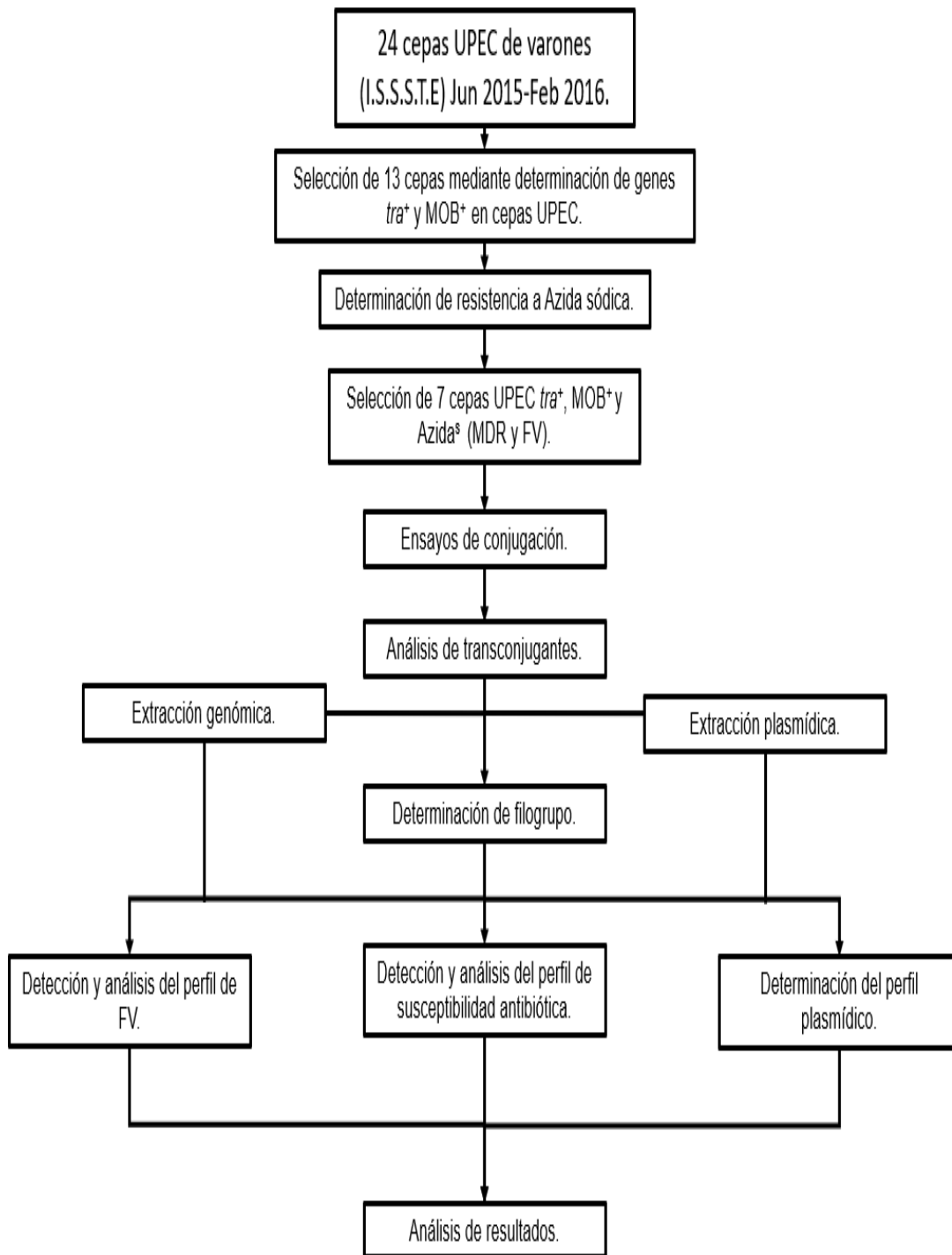
4.- Objetivo general

Determinar las propiedades de transferencia por conjugación de factores de virulencia y resistencia de un cepario UPEC aisladas de varones del Hospital Regional I.S.S.S.T.E.

5.- Objetivos específicos

1. Determinar los genes *MOB* y *tra* de 24 cepas de *E. coli* aisladas de varones cursando con ITU.
2. Determinar la susceptibilidad a azida de sodio del cepario de *E. coli*.
3. Realizar ensayos de conjugación de cepas de UPEC MDR y sensibles a azida de sodio.
4. Analizar las clonas transconjugantes para determinar la adquisición de factores de virulencia y resistencia.
5. Determinar el perfil de bandas plasmídicas en las clonas transconjugantes.

6.- Esquema de trabajo



7.- Material y métodos

En el presente trabajo se usó un cepario de 24 cepas aisladas de varones con ITU obtenidos del Hospital Regional I.S.S.S.T.E en el periodo de Junio del 2015 a Febrero del 2016. Dichas cepas se encuentran almacenadas en criopreservación a -70°C. En la Tabla 5 se muestran las características del cepario.

Tabla 5.- Factores de virulencia determinados a 24 cepas UPEC aisladas de varones con ITU obtenidos del Hospital Regional I.S.S.S.T.E Huelgas, 202

| Cepa | Factores de virulencia |
|-------|---|
| 102-I | <i>iucD, fimH y vatP.</i> |
| 103-I | <i>iucD, satA, fimH, iha, vatA, papGII, papA, satP, traT y kpsMII.</i> |
| 108-I | <i>fimH, traT y kpsMII.</i> |
| 110-I | <i>iucD, satA, fimH, iha, vatA, papGII, papA, satP y kpsMII.</i> |
| 115-I | <i>iucD, satA, fimH, iha, vatA, papGII, papA, satP, hlyA, cnf-1 y traT.</i> |
| 117-I | <i>iucD, fimH y traT.</i> |
| 118-I | <i>iucD, satA, fimH, iha, vatA, papGII, papa y satP.</i> |
| 125-I | <i>iha y papGII.</i> |
| 126-I | <i>iucD, satA, fimH, iha, papGII, papA, satP, traT y kpsMII.</i> |
| 127-I | <i>iucD, fimH y papGII.</i> |
| 128-I | <i>iucD, satA, fimH, iha, vatA, papGII, papA, satP, hlyA, cnf-1, traT y kpsMII.</i> |
| 129-I | <i>iucD, satA, fimH, iha, papGII, papA, satP, hlyA, vatP, cnf-1, traT y kpsMII.</i> |
| 130-I | <i>iucD, fimH, iha, vatA, papGII, papA, satP, vatP, traT y kpsMII.</i> |
| 132-I | <i>traT.</i> |
| 144-I | <i>iucD, fimH, vatA y vatP.</i> |
| 154-I | <i>iucD, fimH, iha, vatA, vatP, satP, traT y kpsMII.</i> |
| 155-I | <i>iucD, satA, fimH, vatP, satP y traT.</i> |
| 159-I | <i>iucD, satA, fimH, iha, papGII, papA, satP y kpsMII.</i> |
| 161-I | <i>iucD, satA, fimH, iha, papGII, papA, satP, hlyA, cnf-1 y kpsMII.</i> |
| 162-I | <i>iucD, satA, fimH, iha, papGII, papA, satP, hlyA, cnf-1, traT y kpsMII.</i> |
| 167-I | <i>iucD, satA, fimH, iha, papGII, papA, satP, hlyA, cnf-1, traT y kpsMII.</i> |
| 168-I | <i>iucD, fimH, iha, papGII, papA, satP, hlyA, cnf-1, traT y kpsMII.</i> |
| 173-I | <i>iucD, fimH, papGII, traT y kpsMII.</i> |
| 174-I | <i>iucD, satA y fimH.</i> |

7.1.- Cepas control

Se utilizaron los siguientes microorganismos como cepas control (tabla 6).

Tabla 6.- Cepas control

| Cepa | Característica | Referencia |
|----------------------------------|--|---|
| UPEC-CFT073 | <i>iucD+</i> , <i>sat+</i> , <i>fliC+</i> <i>fimH+</i> , <i>papGII+</i> | Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos |
| <i>E. coli</i> 0591 | <i>vat+</i> , <i>sat+</i> y <i>papGIII+</i> | Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos |
| <i>E. coli</i> GAG1 | <i>sat+</i> , <i>hlyA</i> , <i>cnf+</i> y <i>papA+</i> (virulencia) | Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos |
| <i>E. coli</i> J53 | Cepa receptora para conjugación resistente a azida de sodio | Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> | Cepa control para antibiograma | (CLSI, 2023) |
| <i>E. coli</i> ATCC | Cepa control para antibiograma | (CLSI, 2023) |
| <i>E. coli</i> MC4100 | <i>arpA+</i> | Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos |
| <i>E. coli</i> GAGI | <i>chuA+</i> , <i>yjaA+</i> y <i>tspE4.C2+</i> (filogenia) | Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos |
| <i>E. coli</i> EDL933 | Perfil plasmídico (92kb) | Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos |
| <i>E. coli</i> 0581 | <i>traT+</i> | Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos |
| <i>E. coli</i> C3304 | MOB _{F12} ⁺ | Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos |

7.5.1.- Electroforesis

Se realizaron geles de agarosa al 0.7% para la visualización de las extracciones genómicas, plasmídicas y productos de PCR, usando un volumen de 50 ml de TAE 1X como buffer de corrida. Para cargar las muestras en los pocillos se utilizó 2 µl de buffer de carga y 4 µl de DNA de cada cepa para homogenizar y se colocaron dentro de sus respectivos pocillos del gel. Se utilizó un voltaje de 63 a 73 Volts para el corrimiento electroforético, se revelaron los geles usando BET durante 20 minutos, y en agua 2 minutos y se fotodocumento usando el transiluminador.

7.2 Determinación de resistencia a azida de sodio y ampicilina

Para la determinación de susceptibilidad a azida de sodio y a ampicilina se sembró una colonia crecida en agar MacConkey de cada una de las cepas de *E. coli* en 5 ml de caldo LB y se incubó a 37°C a 2 500 rpm hasta alcanzar una densidad similar al 0.5 del Nefelometro De MacFarlan (1×10^8 UFC/ml). Posteriormente se sembraron 100 μ l del precultivo en 3ml de LB conteniendo diferentes concentraciones de azida de sodio: 100, 125, 150 y 200 μ g/ml o 100 μ g/ml de ampicilina por separado.

7.3.- Conjugación bacteriana

7.3.1.- Conjugación bacteriana fase sólida

Para la conjugación bacteriana se realizó un precultivo añadiendo 20 μ l del criovial de cada cepa en 3 ml de LB se incubó a 37°C con agitación durante toda la noche. Posteriormente se tomaron 50 μ l del precultivo de cada una de las cepas en 5 ml de caldo LB conteniendo 100 μ g/ml de ampicilina. Los tubos se incubaron en agitación orbital durante 4 a 5 h hasta alcanzar una DO_{600nm} . Una vez alcanzada, se tomó 1 ml de cada tubo de ensayo para pasar a microtubos estériles de 1.8 ml de los cuales se centrifugaron por un minuto a 12,000 rpm para formar el pellet, después se decantó y resuspendió con 1 μ l de LB estéril (esto se realizó por dos ocasiones más y utilizando el vortex para resuspender antes de cada centrifugación). Una vez terminado se resuspendió con 20 μ l de LB cada pellet para realizar el pase de la cepa donadora con la receptora. Se tomó una caja de LB estéril por cada conjugación y se colocaron los 40 μ l con gota al centro de la caja Petri, las cuales se dejaron por un día en incubación con 37 °C. Se realizaron los controles respectivos de cada cepa en cajas Petri de LB con ampicilina, LB con azida de sodio, y, LB con ampicilina y azida de sodio. Pasado el día se tomó toda la muestra del primer contacto (gota en centro) de las cajas de LB y se pasaron a sus respectivos microtubos, y, se realizaron las siguientes soluciones seriadas: 10^0 a 10^{-4} . Se procedió a cultivar cada una de las soluciones seriadas con asa de cristal estéril en cajas de LB con ampicilina y azida de sodio (presión selectiva), agregando 100 μ l al medio. Una vez terminado se colocaron en incubación con 37 °C durante

1 día. Se contaron sus respectivas colonias y seleccionaron para colocarlas en una caja de LB con ampicilina y azida de sodio. Terminando se dejaron las cajas en incubación por un día a 37 °C. Se revisaron las cajas para seleccionar 4 colonias de las transconjugantes de cada cepa y resembrarlas en medios de cultivo con antibiótico (ampicilina y azida de sodio).

7.3.2.- Conjugación bacteriana fase líquida

Se preparó un precultivo en 5 ml de caldo LB añadiendo 10 µl del tubo almacenado en crioconservación a -70°C de la cepa donadora y de la cepa receptora por separado, incubando en una temperatura de 37°C a 200 rpm con antibiótico de selección (100µg/ml ampicilina o 150µg/ml azida de sodio respectivamente) hasta una DO₆₀₀ de 0.5 a 0.7. Se transfirieron 500 µl del precultivo a microtubos, se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 2,000 rpm durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se lava el precipitado celular con 1 ml de la solución salina y se resuspendió. Se centrifuga el microtubo a 2,000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 20 µl de la solución salina isotónica, enseguida mezclar los 20 µl de la cepa donadora con los 20 µl de la receptora en el microtubo con 400 µl de caldo LB. La mezcla se incubó a 37 °C durante toda la noche (sin movimiento/cultivo estacionario). Al día siguiente se añadieron 500 µl de la solución salina en cada tubo y se pasó al vortex para homogeneizar a una baja velocidad. Se realizaron diluciones seriadas (10^0 a 10^{-5}) a partir de los tubos y se colocaron 100 µl en placas de agar LB con presión de selección (100 µg/L de ampicilina y 150 µg/L de azida de sodio). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 a 48 h después de lo cual se verificó el crecimiento y las clonas fueron mantenidas en placas de agar LB con presión de selección (100 µg/L de ampicilina y 150 µg/L de azida de sodio) por separado.

7.3.3.- Frecuencia de conjugación

La frecuencia de conjugación se obtuvo multiplicando el número de unidades formadoras de colonias por el inverso de la dilución.

7.4.1.- Extracción de DNA plasmídico Miniprep

Se realizó la extracción de DNA plasmídico de las transconjugantes del "Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos ICUAP" de las cuales se tomaron 25 µl del criovial para cultivar en tubos de LB de 5 ml, los cuales se quedaron en incubación a 37 °C por un día. Pasado el periodo de incubación, se tomó de los precultivos 1 µl para colocarlos en sus respectivos microtubos y así centrifugarlos durante 5 minutos a 12,000 rpm hasta terminar con todo el precultivo (ir decantando) para así lograr formar el paquete bacteriano. Una vez terminado los tubos se resuspendieron agregando la solución I (200 µl de TDE por muestra, lisozima con 0.0002 gramos por ml y RNAsa con 2 µl por muestra). Terminando se resuspendió y fue llevado a la cámara de incubación por 15 minutos a una temperatura de 37 °C. Después del centrifugado se colocó a cada muestra la solución II (SDS al 2% 200 µl por muestra y 200 µl de NaOH al 0.4 N) para homogeneizar de manera suave 5 veces, luego fueron colocadas en hielo durante cinco minutos. Terminando el tiempo se agregó la solución III (acetato de potasio al 7.5 M) con una cantidad de 300 µl por muestra, para después homogeneizar suave tres veces, y luego, se colocó durante 15 minutos al hielo. Terminando el tiempo de cada muestra se centrifugó por 15 minutos a 12,000 rpm. Terminando de centrifugar se cambió el sobrenadante a otros tubos. Se agregó isopropanol (500 µl) por muestra, se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó durante 15 minutos por 12,000 rpm. Se agregó 1.5 ml de etanol al 70% por muestra, se homogenizo suave y se centrifugó durante 5 minutos a 12,000 Después se decantó y secaron los tubos colocándolos en el termoblock a 37 °C. Una vez secos se resuspendieron con 40 µl de Tris 10 mM pH 8 para así llevarlos a su refrigeración a -20 °C (Green y Sambrook, 2012).

7.4.2- Extracción de DNA plasmídico Fenol-cloroformo

Se realizó la extracción de DNA plasmídico de las transconjugantes del "Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos ICUAP" se obtuvo el paquete bacteriano cómo se menciona en los pasos anteriores de la extracción mediante Miniprep y a este se le adiciono 150 µL de la solución I (sacarosa, EDTA-TRIS, lisozima y

RNAsa) para resuspender e incubar a 15 minutos a temperatura ambiente. Terminado se agregaron 300 μ L de solución II (NaOH 0.4 M y SDS al 2%) para mezclar 10 veces (girar con la mano) y mantener en hielo por 5 minutos. Se agrego 225 μ L de solución III (acetato de potasio 3 M), y se mezcló por 10 veces para colocar en hielo por 15 minutos, una vez terminado se centrifugo por 15 minutos a 12,000 rpm con 4°C. El sobrenadante se decantó a un tubo con 300 μ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para invertirlo 30 veces más y centrifugar a 12,000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se pasó a tubos con 300 μ L de cloroformo-alcohol (24:1) y se invirtió 50 veces. Se realizó una centrifuga a 12,000 rpm por 5 min a 4°C, se extrajo el sobrenadante y se pasó a un microtubo nuevo, se le agrego etanol absoluto 2 veces de su volumen hasta alcanzar los 1.5 mL. Las muestras se dejaron a -4°C toda la noche. Se centrifugo a 12,000 rpm por 5 min a 4°C, se le retiró el sobrenadante, se añadió etanol al 70% hasta alcanzar un volumen de 1.5 mL y se mezcló por 5 veces, se volvió a centrifugar a las mismas revoluciones por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Una vez seca, se resuspendió en 60 μ L de Tris al 10 mM, pH 8, finalmente homogenizo.

7.4.3- Extracción de DNA genómico

Se realizó la extracción genómica de las cepas del "Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos ICUAP" del instituto de microbiología. Se tomarán 20 microlitros del criovial de cada una de las cepas para cultivarlas en tubos de ensayo con 3 ml de caldo Luria Bertani (LB) estéril, los cuales se quedaron en incubación a 37 °C por un día. Una vez pasado el periodo de incubación, se tomaron 200 μ l del precultivo de LB de cada una de las cepas para colocarlos en su respectivo tubo conteniendo 5 ml de caldo LB etiquetado con la número de cada cepa respectiva y dejarlos en incubación a 37 °C durante un periodo de 4 a 5 horas. Pasado el tiempo se tomaron los tubos para una medición de la densidad óptica (DO) mediante espectrofotómetro; se preparó el blanco colocando en una celdilla 1 ml de LB estéril y en otras celdillas 1 ml del cultivo de las respectivas cepas. Se procedió a medir la DO a 600nm (DO_{600nm}) en el espectrofotómetro, una vez alcanzada la DO se colocaron 500 μ l de cada cepa en microtubos de 1.5 ml

rotulados bajo condiciones estériles. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 minutos. Una vez formado el pellet se procedió a eliminar el sobrenadante de cada microtubo en un recipiente. Se colocaron 570 μ l de la solución I (200 μ l de TDE por muestra, lisozima con 0.0002 gramos por ml y RNAsa con 2 μ l por muestra). a cada tubo, se resuspendió la pastilla mediante vortex durante 30 segundos, se agregaron 60 μ l de SDS al 20% a cada microtubo, y, se invirtió suavemente durante 10 segundos para resuspender en vortex por 20 segundos. Se colocaron los tubos en el termoblock a una temperatura de 80 °C por 5 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, y una vez fríos, se les agregó 2 microlitros de RNAsa. Los microtubos se llevaron a incubación por 45 minutos a una temperatura de 37 °C. Se adicionaron 200 μ l de solución de sal y así se invirtió de manera suave 20 segundos, luego se dejaron de manera estática 60 segundos, luego se resuspendió en vortex durante 60 segundos, por último, se dejaron de manera estática durante 60 segundos. Una vez terminada, las muestras se colocaron en hielo durante 5 minutos, pasado el tiempo se llevaron a centrifugar durante 10 minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante se pasó a los microtubos nuevos para cada cepa y, luego, en condiciones estériles se agregarán 800 μ l de isopropanol para invertir suavemente durante 1 minuto, se centrifugó a 12,000 rpm por 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante de cada microtubo y se agregaron 800 μ l de etanol al 70%, se centrifugó y se decantó el sobrenadante (este paso se repitió dos veces más). Finalmente, la pastilla de DNA se resuspendió en 75 μ l de Tris 10 mM pH 8 y se homogenizó con vortex durante 5 segundos, luego se dió un spinning durante 15 segundo a cada muestra para luego almacenarlo en refrigeración a -20 °C (Green y Sambrook, 2012).

7.5.- Determinación de grupos filogenéticos

La determinación filogenética se llevó a cabo de acuerdo con Clermont *et al.*, 2013 a través de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Quadruplex, usando DNA genómico obtenido de las cepas de estudio, para después realizar su respectiva electroforesis y posterior interpretación con respecto a la tabla 7.

Tabla 7.- Identificación de filogrupos (A, B1, B2, C, D, E, F y clado I) en base a la determinación de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y *tspE4.C2* (modificado de Clermont et al., 2013).

| Genotipo cuádruple | | | | Filogrupo | Siguiete paso |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------|--|
| <i>arpA</i> (400 pb) | <i>chuA</i> (288 pb) | <i>yjaA</i> (211 pb) | <i>TspE4.C2</i> (400 pb) | | |
| + | - | - | - | A | |
| + | - | - | + | B1 | |
| - | + | - | - | F | |
| - | + | + | - | B2 | |
| - | + | + | + | B2 | |
| - | + | - | + | B2 | Podría confirmarse mediante pruebas del gen <i>ibeA</i> |
| + | - | + | - | A o C | Utilizando cebadores específicos de C. Si C+ entonces C, en caso contrario A |
| + | + | - | - | D o E | Utilizando cebadores específicos de E. Si E+ entonces E, en caso contrario D |
| + | + | - | + | D o E | Utilizando cebadores específicos de E. Si E+ entonces E, en caso contrario D |
| + | + | + | - | E o clado I | Utilizando cebadores específicos de E. Si E- entonces el clado I, confirmar usando cebadores de clado |
| - | - | + | - | Clado I o II | Confirmar usando cebadores de clado |
| - | (476) | - | - | Clado III, IV o V | Confirmar usando cebadores de clado críptico |
| - | - | - | + | Desconocido | Realizar MLST |
| - | - | + | + | Desconocido | Realizar MLST |
| + | - | + | + | Desconocido | Realizar MLST |
| + | + | + | + | Desconocido | Realizar MLST |
| - | - | - | - | Desconocido | Confirme la identificación de <i>Escherichia</i> usando <i>uidA</i> <i>ogadA/Bd</i> , si la pantalla es positiva usando un clado críptico cebadoresb y/o realizar MLST |

7.6.- Determinación de fragmentos de virulencia

7.6.1.- Condiciones para PCR para fragmentos de virulencia

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo para cada uno de los 15 fragmentos que corresponden a 11 genes que codifican a factores de virulencia (tabla 8). Los

productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis y fotodocumentación.

Tabla 7.- Características de los fragmentos amplificados por PCR de los 11 factores de virulencia de UPEC. PCR múltiple, control positivo y temperaturas usadas en la PCR

| DESCRIPCIÓN | PCR/Control | FUNCIÓN | Tamaño (pb) | TM (C°) |
|---|--------------------|--|-------------|---------|
| ADHESINAS | | | | |
| Fimbria tipo 1 <i>fimH</i> | PCRM1/CFT073 | Factor de colonización en infecciones extraintestinales y formación de biopelículas | 210 | 57.7 |
| Fimbria P <i>papGII</i> y <i>III</i> | PCRM2/CFT073+O59-I | Estimula la producción de citocinas por los linfocitos T y factor de colonización en infecciones extraintestinales | 562 y 412 | 61.4 |
| Fimbria P <i>papA</i> | GAG1 | Estimula la producción de citocinas por los linfocitos T y factor de colonización en infecciones extraintestinales | 641 | 61.4 |
| <i>lha</i> | PCRM2/CFT073+O59-I | Adhesina homóloga a IrgA de <i>V. cholerae</i> regulada por hierro | 150 | 61.4 |
| CAPTACIÓN DE HIERRO | | | | |
| Aerobactina <i>iucD</i> | PCRM1/CFT073 | Sideroforo para la adquisición de Fe ⁺² / ⁺³ en el sistema hospedero | 512 | 57.7 |
| FLAGELO | | | | |
| FliC | PCRM1/CFT073 | Permite el movimiento y la expresión de subunidades de flagelina | 304 | 57.7 |
| TOXINAS | | | | |
| Toxina secretada autotransportadora <i>satA</i> | PCRM1/CFT073 | Región autotransportadora de la Toxina proteolítica con efecto citotóxico: influye en la vacuolización celular | 384 | 57.7 |
| Toxina secretada autotransportadora <i>satP</i> | GAG1 | Región peptidasa de la Toxina proteolítica con efecto citotóxico: influye en la vacuolización celular | 880 | 61.4 |
| Toxina vacuolizante autotransportadora <i>vatA</i> y <i>vatP</i> | PCRM2/CFT073+O59-I | Toxina proteolítica que induce la vacuolización de la célula hospedero | 330 y 226 | 61.4 |
| Hemolisina A <i>hlyA</i> | PCRM3/GAG1 | Creación de poros en las membranas de las células hospedero (lisis celular) | 1280 | 61.4 |
| Factor necrotizante citotóxico <i>cnf-1</i> | PCRCNF/GAG1 | Participa en la necrosis celular | 3100 | 61.4 |
| MOB Y TRA | | | | |
| Mob | PCRS/O58I | - | 739 | - |
| Tra | PCRS/C3304 | Lipoproteína de membrana externa de resistencia al complemento. | 243 | - |

7.6.2.- Puntaje de virulencia

Para determinar el puntaje de virulencia se realizó la suma de todos los genes de virulencia presentes en cada cepa, teniendo en cuenta que los genes de *pap* (*papA*, *+papGII* y *papA*, *+papGIII*), *sat* (*satA*+ *satP*) y *vat* (*vatA* y *vatP*) fueron considerados como un solo factor de virulencia cuando amplificaban todos los fragmentos pertenecientes al mismo factor (Johnson et al., 2006). Así, los fragmentos que codifican para el pili P fueron medidos a través de dos fragmentos el que codifica la adhesina *papGII* o *papGIII* y el gen de la pilina *papA* (*papA+papGII* y *papA+papGIII*), la toxina Sat con sus dos regiones autotransportadoras y peptidasa (*satA+satP*), al igual que para Vat con su región autotransportadora y peptidasa (*vatA+vatP*). Además, no se tomará en cuenta el valor del factor de virulencia *fimH* en el puntaje de virulencia, pero si se mostrara en los valores de la gráfica ya que es un factor de virulencia encontrado en la receptora (J53) y como distinción de sus transconjugantes.

7.6.3.- Genes *MOB* y *tra*

Se llevaron a cabo PCR individual de los genes *traT* y *MOB_{F12}*, para luego realizar electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, el revelado del gel usando luz UV y fotodocumentación.

7.7.- Determinación del perfil de susceptibilidad

La determinación del perfil de susceptibilidad antibiótica se realizó por el método de Kirby-Bauer, donde se evaluaron 24 antibióticos pertenecientes a 16 categorías distintas y de acuerdo con las especificaciones marcadas y concentraciones establecidas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2023).

Se realizaron cultivos en agar soya tripticaseína (TSA) de las cepas de trabajo mediante siembra por estría cruzada, los cuales se dejaron en incubación a 37 °C durante 24 horas. Terminado el periodo, se tomó mediante un asa una colonia de las diferentes placas de TSA para sembrarlas en caldo soya tripticaseína (TSB), los cuales se dejaron en incubación hasta tener un valor del 0.5 en escala de

McFarland. Una vez listos, se utilizaron isopos estériles para el sembrado masivo en placas de Müller Hinton, después de 5 minutos, se colocaron los sensibilizadores de los respectivos fármacos mediante el uso de pinzas estériles, la agrupación y los fármacos utilizados aparecen en la figura 6.

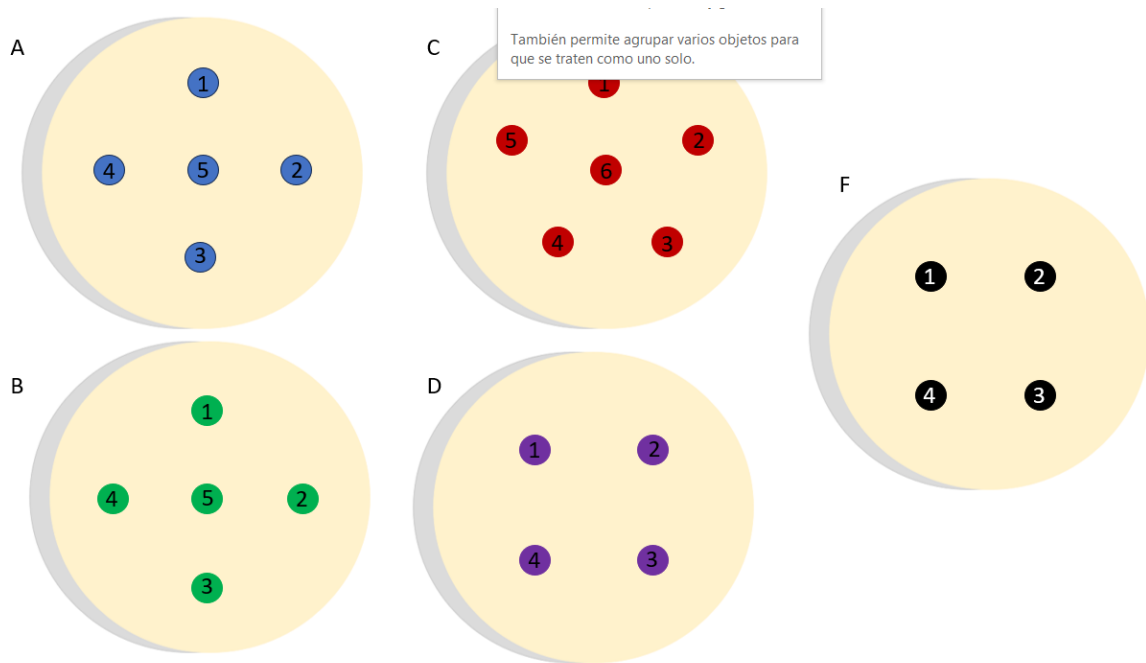


Figura 6.- Representación de las placas de Muller Hinton y la distribución de los sensibilizadores para realizar la técnica de Kirby-Bauer. Panel A) Azul: ampicilina (1), levofloxacina (2), nitrofurantoina (3), norfloxacin (4) y amoxicilina y ácido clavulánico (5). Panel B) Verde: gentamicina (1), netilmicina (2), ofloxacina (3), trimetoprim/sulfametoxazol (4) y amikacina (5) Panel C) Rojo: ceftriaxona (1), cefotaxima (2), ceftazidima (3), aztreonam (4), cefepime (5) y amoxicilina con ácido clavulánico (6). Panel D) Morado: ceftazidima (1), cloranfenicol (2), ácido nalidixico (3) y ciprofloxacino (4) y Panel F) Negro: ertapenem (1), tetraciclina (2), fosfomicina (3) y colistina (4).

7.7.1- Puntaje y clasificación de la resistencia antibiótica

Para el puntaje de resistencia se tomó en consideración la resistencia observada de cada una de las transconjugantes a cada uno de los antibióticos empleados en este estudio (Kudinha et al., 2013).

Para la clasificación de categoría de resistencia antibiótica para cada cepa transconjugante analizada se interpretó de acuerdo con los criterios de Magiorakos y cols, 2012, en No multidrogo-resistente (NMDR) como aquellas cepas que solo presentan resistencia ≤ 2 grupos de antibióticos. Multidrogo-resistente (MDR) en

donde se presenta una resistencia ≥ 3 grupos. Los extremo-drogo resistentes (XDR) que presentan solo susceptibilidad a 2 grupos del total estudiados y por último, los Pandrogoresistentes (PDR) que son resistentes a toda la lista de categorías empleadas (Magiorakos et al., 2012).

7.8.- Caracterización del perfil plasmídico

Para el análisis del perfil plasmídico de cada una de las cepas donadora y transconjugantes se realizó la extracción plasmídica y se verifico por electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, su revelado con BET y posteriormente el conteo y determinación del tamaño de bandas, teniendo como controles la extracción plasmídica de la cepa control *E. coli* enterohemorrágica EDL 933 (con un plásmido de 92 kb y un plásmido criptico de 2 kb) y el marcador de peso molecular de 1kb Plus de Thermo Fisher Scientific.

8.- Resultados

8.1.- Detección de genes MOB_{F12} y $traT$

Se determinó la presencia de genes $traT$ y MOB_{F12} en las 24 cepas aisladas de varones con ITU obtenidos del Hospital Regional I.S.S.S.T.E, tabla 9.

Tabla 8.- Presencia de los genes MOB , Tra y bandas plasmídicas por cada cepa perteneciente al cepario de *E. coli* aislado de varones procedentes del I.S.S.S.T.E.

| CEPA | FECHA DE AISLAMIENTO | $traT$ | MOB_{F12} | BANDAS PLASMÍDICAS (Huelgas, 2018) |
|-------|----------------------|--------|-------------|------------------------------------|
| 102-I | 43800 | 0 | 0 | Sí |
| 103-I | 1/17/2019 | 1 | 1 | Sí |
| 108-I | 1/17/2019 | 1 | 1 | Sí |
| 110-I | 43739 | 0 | 0 | Sí |
| 115-I | 2/22/2019 | 1 | 1 | Sí |
| 117-I | 3/13/2019 | 1 | 1 | Sí |
| 118-I | 1/22/2019 | 0 | 0 | Sí |
| 125-I | 1/22/2019 | 0 | 0 | Sí |
| 126-I | 1/22/2019 | 1 | 1 | Sí |
| 127-I | 1/16/2019 | 0 | 0 | Sí |
| 128-I | 1/22/2019 | 1 | 1 | Sí |
| 129-I | 1/18/2019 | 1 | 1 | Sí |
| 130-I | 43618 | 1 | 1 | Sí |
| 132-I | 3/13/2019 | 1 | 1 | Sí |
| 144-I | 43618 | 0 | 0 | Sí |
| 154-I | 1/18/2019 | 1 | 1 | Sí |
| 155-I | 43558 | 1 | 1 | Sí |
| 159-I | 1/18/2019 | 0 | 0 | Sí |
| 161-I | 1/22/2019 | 0 | 0 | Sí |
| 162-I | 3/13/2019 | 1 | 1 | NO |
| 167-I | 2/22/2019 | 1 | 0 | Sí |
| 168-I | 3/13/2019 | 1 | 0 | NO |
| 173-I | 1/22/2019 | 1 | 1 | Sí |
| 174-I | 1/22/2019 | 0 | 0 | Sí |

Con la finalidad de iniciar estudios de conjugación bacteriana, las 24 cepas de *E. coli* fueron sometidas a la determinación de los genes MOB_{F12} y $traT$. El gen $traT$ se encontró en el 62.5% (15 de las 24) de las cepas estudiadas y el gen MOB_{F12} se encontró en un 54.16% (13 de las 24) (figura 7).

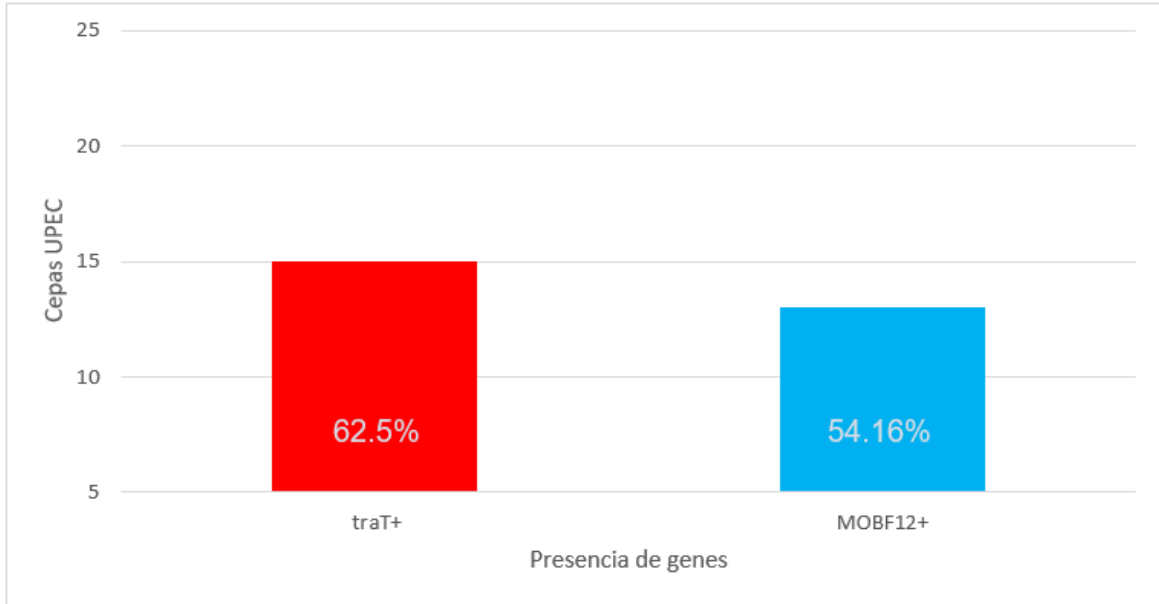


Figura 7.- Representación gráfica en porcentaje de la presencia de los genes MOB_{F12} y $traT$ en el cepario procedente de varones cursando con ITU del I.S.S.S.T.E. N=24.

Además, se analizó la presencia de ambos genes por cada cepa estudiada y se encontró que de las 24 (100%) cepas de *E. coli*, 13 cepas (54.16%) presentaron ambos genes, 9 (38%) no presentaron ninguno de los dos genes y 2 (8%) mostraron solo $traT$, figura 8.

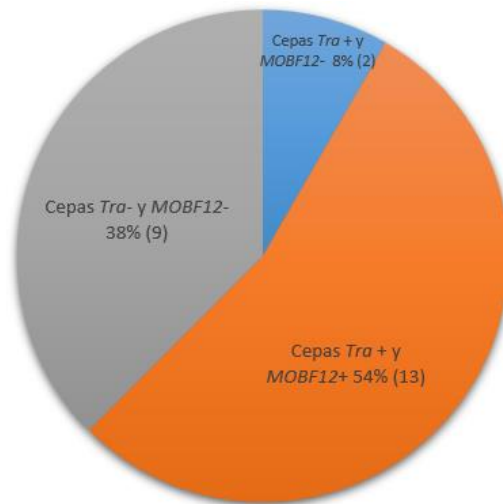


Figura 8.- Representación gráfica de la presencia de los genes MOB_{F12} y $traT$ en un cepario de *E. coli* aislada de varones cursando con ITU.

De las 13 cepas MOB_{F12}^+ y $traT^+$, en trabajos previos de Huelgas, 2020 se conoce que son resistentes a ampicilina y solo una (162-l) no posee bandas plasmídicas.

Menciona que el 60% del cepario presentó al menos una banda plasmídica, aquellas que presentaban bandas plasmídicas tuvieron en promedio 2, con pesos de 1 kb y mayores de 10 kb fueron las más frecuentes.

8.2.- Perfil de resistencia a azida de sodio

Como cepa receptora se eligió a la *E. coli* J53 que es resistente a azida de sodio (Yi et al., 2012) en un rango de concentración de 100-200 µg/ml, por lo que a las 13 cepas positivas para *MOB* y *traT* se les determinó la resistencia a la azida de sodio. 3 de las 13 cepas de *E. coli* *MOB*_{F12}⁺ y *traT*⁺ (126,132 y 154) no crecieron en concentraciones de 100 µg/ml de azida de sodio, 6 (126, 128, 13, 132, 154 y 173) de 13 no crecieron en concentraciones de 125 µg/ml y 7 cepas de 13 (103,126,128,130,132,154 y 173) no crecieron a concentraciones de 150 y 200 µg/ml de azida de sodio (Tabla 10). Con estos resultados se eligió la concentración de 150 mg/ml para ser usado en la selección de clonas transconjugantes. Así mismo, se seleccionaron esas 7 cepas (103, 126, 128, 130, 132, 154 y 173) que no crecieron en dicha concentración para ser usadas como cepas donadoras. Es importante mencionar que la cepa receptora J53 fue susceptible a 100 µg/ml de ampicilina que fue la concentración elegida para seleccionar a las clonas transconjugantes (tabla 10).

En resumen, se usaron placas de agar LB con Azida de sodio y ampicilina (150 µg/ml +100 µg/ml) para la selección de clonas transconjugantes.

Como controles del ensayo de conjugación se realizaron pruebas de crecimiento de las 7 cepas donadoras y la receptora J53 en placas de agar LB con 100 µg/ml de ampicilina, con 150 µg/ml de azida de sodio y con 100 µg/ml de ampicilina más 150 µg/ml de azida de sodio por separado. Las cepas de *E. coli* donadoras (Ap^r) solo crecieron en el agar con ampicilina, la receptora *E. coli* J53 en azida de sodio y ninguna en placas con Ap y Azida, ver tabla 10 y 11.

*Tabla 9.- Pruebas de crecimiento de 13 cepas de E. coli MOB⁺ y tra⁺ aisladas de ITU en varones en diferentes concentraciones de azida de sodio: crecimiento (+) y sin crecimiento (-). Y de la cepa receptora (E. coli J53) en diferentes concentraciones de ampicilina. Con un asterisco se marcan las cepas seleccionadas para ensayos de conjugación. Cepas marcadas con * fueron las seleccionadas.*

| Azida de sodio | | | | |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Cepa/Concentración | 100 µg/ml | 125 µg/ml | 150 µg/ml | 200 µg/ml |
| 103-I* | + | + | - | - |
| 108-I | + | + | + | + |
| 115-I | + | + | + | + |
| 117-I | + | + | + | + |
| 126-I* | - | - | - | - |
| 128-I* | + | - | - | - |
| 129-I | + | + | + | + |
| 130-I* | + | - | - | - |
| 132-I* | - | - | - | - |
| 154-I* | - | - | - | - |
| 155-I | + | + | + | + |
| 162-I | + | + | + | + |
| 173-I* | + | - | - | - |
| J53 (E. coli receptora) | + | + | + | + |
| Ampicilina 100 µg/ml | | | | |
| J53 | - | - | - | - |

Tabla 10.- Crecimiento algunas de las cepas donadoras y de la cepa receptora en ampicilina, azida de sodio y ampicilina con azida de sodio. Con crecimiento (+) y sin crecimiento (-).

103-I y J53



Cepa

Ampicilina

Azida de sodio

**Ampicilina y
azida de sodio**

J53 (-) y 130 (+)

J53 (+) y 130 (-)

J53 (-) y 130 (-)

130-I y J53



Cepa

Ampicilina

Azida de sodio

**Ampicilina y
azida de sodio**

J53 (-) y 132 (+)

J53 (+) y 132 (-)

J53 (-) y 132 (-)

132-I y J53



Cepa

Ampicilina

Azida de sodio

**Ampicilina y
azida de sodio**

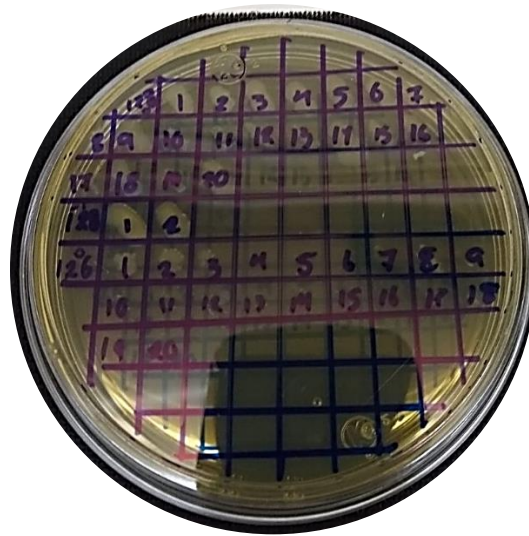


Figura 9.- Selección de las transconjugantes candidatas (cepa 128-I y J53) en medio de LB adicionado con Ampicilina 100 µg/ml y azida de sodio 150 µg/ml.

8.3.- Ensayos de conjugación

Los ensayos de conjugación se realizaron mediante la siembra de una serie de diluciones de la mezcla de conjugación para la selección de las transconjugantes en agar LB/Ap/Azida de acuerdo con lo descrito en el apartado 7.3.1, obteniendo para las cepas 103, 126 y 128 una frecuencia de conjugación en la D^0 (dilución) de 12×10^0 , 140×10^0 y 133×10^0 respectivamente. Las cepas 128 y 132 tuvieron una frecuencia de conjugación en la D^{-1} de 0.2×10^1 y 39.7×10^1 respectivos y, por último, la cepa 130, 154 y 173 tuvieron una frecuencia en D^{-2} de 7.93×10^2 , 2.21×10^2 y 2.05×10^2 . En el resto de las diluciones (1×10^{-3} a 1×10^{-5}) no se lograron obtener clonas transconjugantes, tabla 12.

La presencia de transconjugantes se observó durante las primeras 24 a 48 hrs en incubación a 37 °C y posteriormente se aislaron 4 transconjugantes de las cepas conjugadas en fase líquida para resembrarlas en medios de cultivo con antibiótico (ampicilina y azida de sodio).

Tabla 11.- Frecuencia de conjugación mediante las diluciones (D) de las cepas de estudio. Se muestran los valores de las unidades formadoras de colinas (UFC).

| Cepas | Frecuencia de conjugación (UFC/ml) | | | | | |
|-------------|------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 1x10 ⁰ | D ⁻¹ | D ⁻² | D ⁻³ | D ⁻⁴ | D ⁻⁵ |
| 103-I y J53 | 120 | - | - | - | - | - |
| 126-I y J53 | 1400 | - | - | - | - | - |
| 128-I y J53 | 1330 | 20 | - | - | - | - |
| 130-I y J53 | - | - | 79300 | - | - | - |
| 132-I y J53 | - | 3970 | - | - | - | - |
| 154-I y J53 | - | - | 22100 | - | - | - |
| 173-I y J53 | - | - | 20500 | - | - | - |

8.4.- Caracterización de transconjugantes por grupo filogenético

Para caracterizar filogenéticamente a las 28 cepas transconjugantes Ap^r y Azida^r obtenidas, se corroboró por PCR (figura 11) cuádruplex de acuerdo con Clermont et al., 2013, el filogrupo de las cepas donadoras 103, 126, 128, 130, 132, 154, 173, receptora J53 y de sus transconjugantes correspondientes (figura 10 y 11). En la Tabla 13 y Figura 10 se pueden observar los resultados de la expresión de genes amplificados que corroboran la identificación filogenética de las cepas donadoras y la receptora. La cepa 103 y 154 pertenecen al filogrupo D, las cepas 126, 128 y 130 al filogrupo B2, la cepa 132 y la cepa receptora J53 al filogrupo A y la cepa 173 al Clado 1 (figura 10).

Tabla 12.- Determinación de los grupos filogenéticos de las transconjugantes obtenidas.

| Cepas | | Genes (filogrupo) | | | | Filogrupo | Transconjugantes |
|-----------------|---------|-------------------|---------------|---------------|-------------------|------------|------------------|
| | | arpA (400 pb) | chuA (288 pb) | yjaA (211 pb) | TspE4.C2 (152 pb) | | |
| Receptora | J53 | + | - | + | - | A | - |
| Donadora | 103 | + | + | - | - | D o E (B2) | - |
| Transconjugante | 103-I | + | - | + | - | A | + |
| | 103-II | + | - | + | - | A | + |
| | 103-III | + | - | + | - | A | + |
| | 103-IV | + | + | - | - | - | - |
| Donadora | 126 | - | + | + | + | B2 | - |
| Transconjugante | 126-I | + | - | + | - | A | + |
| | 126-II | - | + | + | + | - | - |
| | 126-III | + | - | + | - | A | + |
| | 126-IV | - | + | + | + | - | - |
| Donadora | 128 | - | + | + | + | B2 | - |
| Transconjugante | 128-I | + | - | + | - | A | + |
| | 128-II | + | - | + | - | A | + |
| | 128-III | + | - | + | - | A | + |
| | 128-IV | + | - | + | - | A | + |
| Donadora | 130 | - | + | + | + | B2 | - |
| Transconjugante | 130-I | + | - | + | - | A | + |
| | 130-II | + | - | + | - | A | + |
| | 130-III | + | - | + | - | A | + |
| | 130-IV | + | - | + | - | A | + |
| Donadora | 132 | + | - | + | - | A | - |
| Transconjugante | 132-I | + | - | + | - | A | + |
| | 132-II | + | - | + | - | A | + |
| | 132-III | + | - | + | - | A | + |
| | 132-IV | + | - | + | - | A | + |
| Donadora | 154 | + | + | - | - | D | - |
| Transconjugante | 154-I | + | - | + | - | A | + |
| | 154-II | + | - | + | - | A | + |
| | 154-III | + | - | + | - | A | + |
| | 154-IV | + | - | + | - | A | + |
| Donadora | 173 | + | + | + | - | C1 | - |
| Transconjugante | 173-I | + | - | + | - | A | + |
| | 173-II | + | - | + | - | A | + |
| | 173-III | + | - | + | - | A | + |
| | 173-IV | + | - | + | - | A | + |

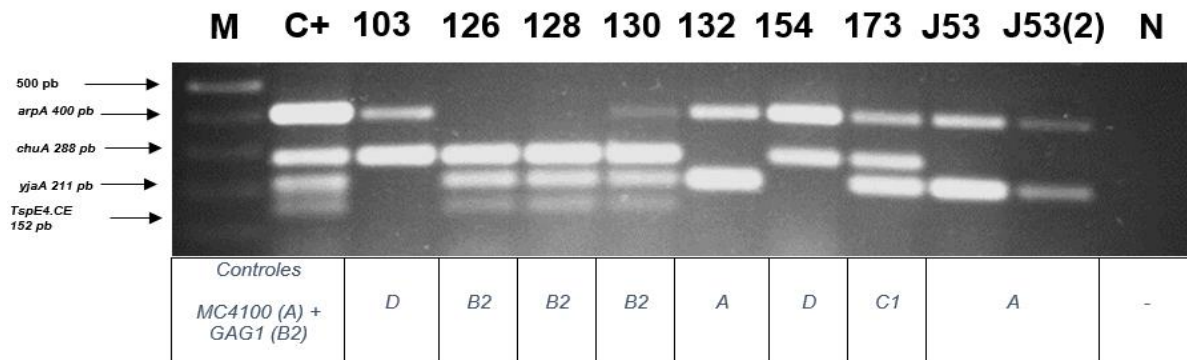


Figura 10.- Identificación filogenética de las cepas donadoras y receptoras: Marcador molecular (100 bp DNA Ladder). C+: DNA de *E. coli* GAG1+DNA de *E. coli* MC4100 son el control + para la identificación del filogrupo (*arpA*, *chuA*, *yjaA* y *TspE4.CE*). *E. coli* Donadoras: 103, 126, 128, 130, 154 y 173; Cepa de *E. coli* receptora: J53 y J53 (2) N: control negativo.

Para las clonas transconjugantes el resultado de grupo filogenético debe corresponder con aquel de la receptora J53 (filogrupo A), es decir deben amplificar los genes *arpA* y *yjaA*. Como se observa en la electroforesis de la figura 10, se analizaron 4 transconjugantes para cada uno de los ensayos de conjugación de las cepas donadoras (128, 130, 132, 154 y 173). Para las cepas 128 y 130 las cuatro transconjugantes son del filogrupo A, para la cepa 103 se 3 de 4 transconjugantes y para la cepa 126 solo 2 de 4 clonas pertenecen al mismo filogrupo de la *E. coli* J53 receptora (figura 11). Se obtuvieron en total 25 clonas transconjugantes de filogrupo A de 28 candidatas (tabla 13 y figura 11).

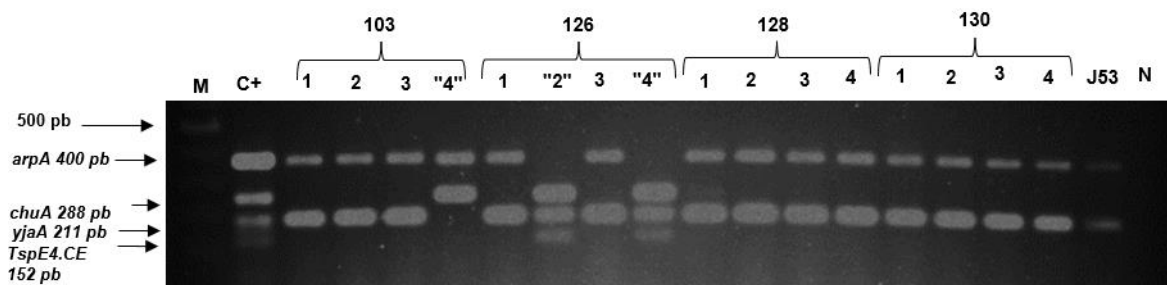


Figura 11.- Determinación de grupo filogenético de las clonas transconjugantes *Ap' Azida'* de cepas UPEC. GAG1+MC4100: control + para la identificación del filogrupo (*arpA*, *chuA*, *yjaA* y *TspE4.CE*). Transconjugantes de la donadora 103 de 1-4, 126 de 1-4, 128 de 1-4 y 130 de 1-4. J53: cepa receptora. N: control negativo. M: Marcador molecular (100 bp DNA Ladder). Las cepas que no corresponden con el filogrupo de la receptora están marcadas con " ".

8.5.- Análisis de factores de virulencia en clonas transconjugantes

La transconjugante 128-1 adquirió de su donadora un total de 8 de 10 (80%) fragmentos de virulencia que posee la cepa 128-I y para las transconjugantes restantes 128-2, 128-3 y 128-4 solo 1 de 10 genes (10%). Las transconjugantes 154-1 a 4 mostraron la adquisición de 2 de 4 genes (50%) reportados de la cepa 154-I, para la clonas 130-1 a 4 presentaron 2 genes (33.33%) adquiridos de un total de 6 genes de su donadora 130-I, para las transconjugantes 126-1 y 126-3 se transfirieron 1 de 6 genes (16.66%) reportados de la cepa 126-I, las transconjugantes 173-1 a 4 mostraron 1 de los 2 (50%) genes reportados en la cepa 173-I y las transconjugantes 103-1, 103-2, 103-3 no adquirieron ninguno de los 7 genes de virulencia de la cepa donadora 103, y por último, las transconjugantes 132-1 a 4 mostraron solo 1 gen de los 2 (50%) de su respectiva donadora (figuras 12, 13 y 14).

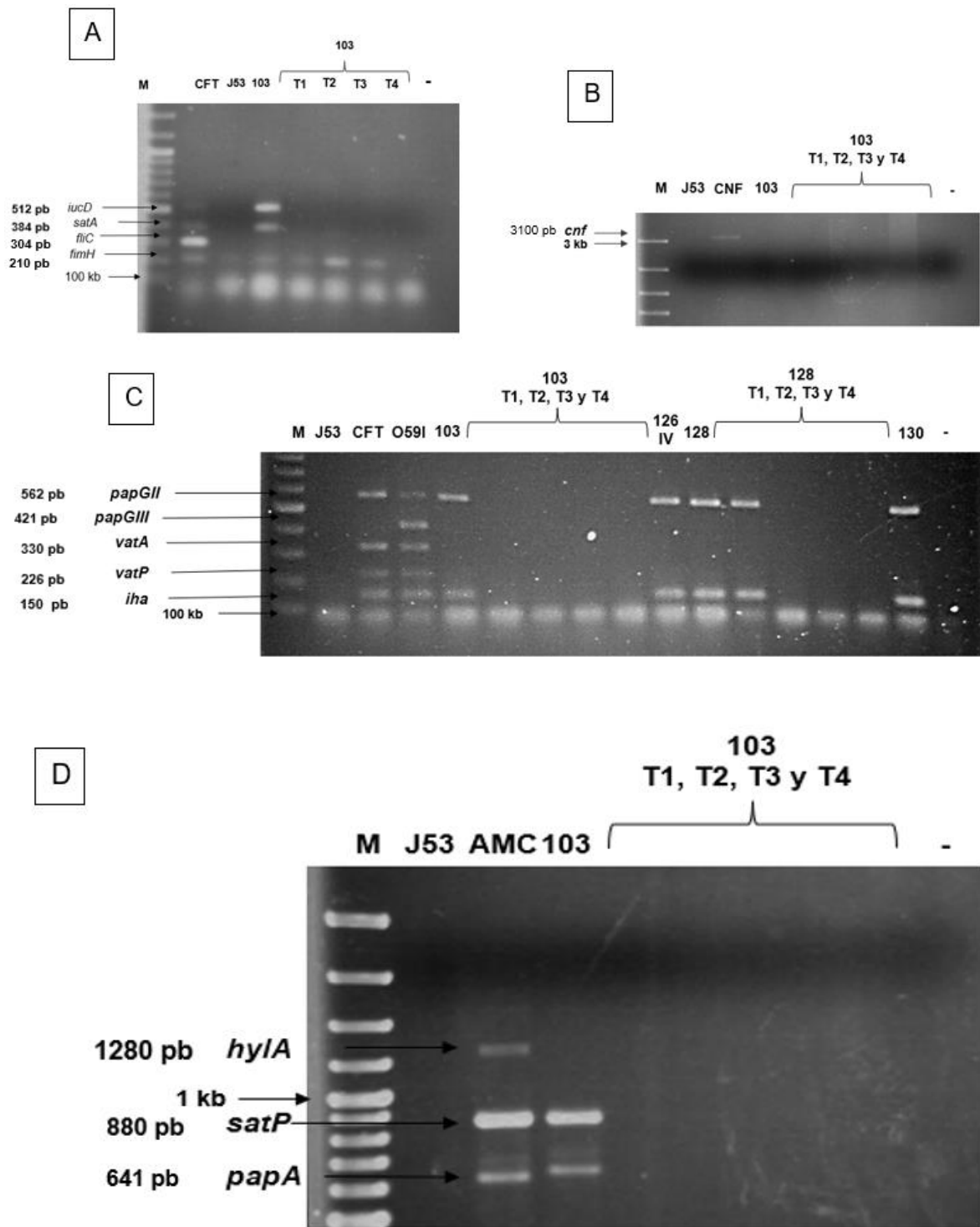


Figura 12.- Caracterización de transconjugantes de UPEC por factores de virulencia. Geles representativos de las electroforesis de los amplificadores de PCR de factores de virulencia de clonas transconjugantes y sus controles (*E. coli* cepas J53, CFT073, O159I y cepas donadoras 103 o 128) En cada panel se observa el resultado obtenido de la detección de genes de virulencia de las transconjugantes (T1 a T4) y de las cepas donadoras. El tamaño de los amplificadores se marca a la izquierda de cada gel en pares de bases (pb) A.- PRM1, B.- CNF, C.- PCR2 y por último en la letra D la PCR3.

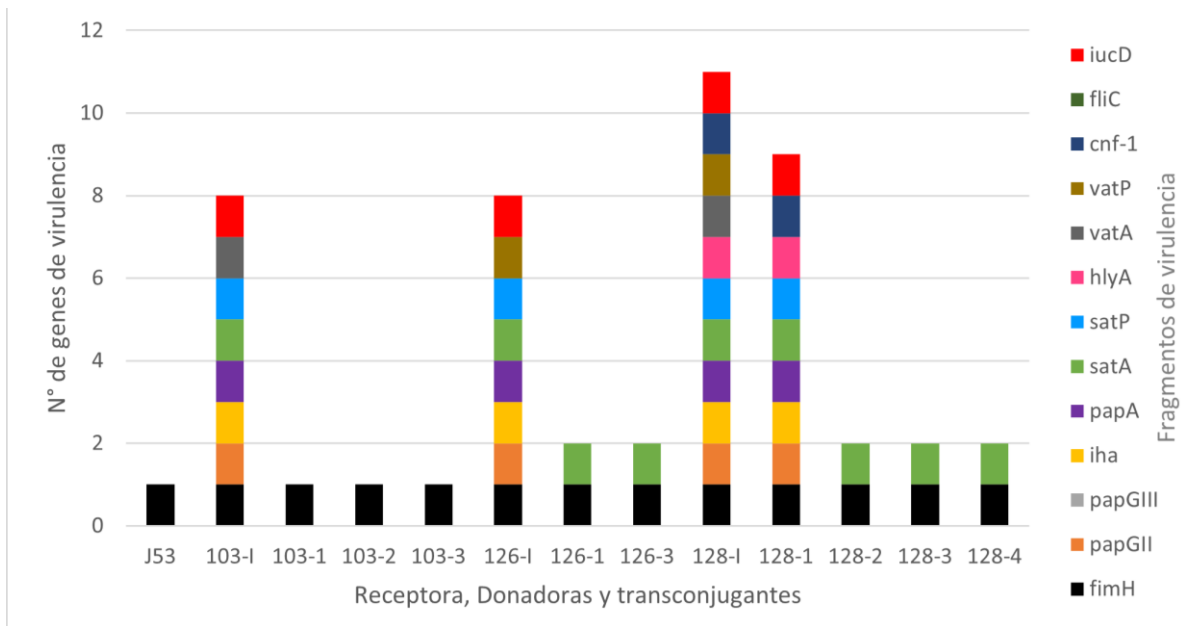


Figura 13.- Distribución de genes de virulencia adquiridos por cada una de las transconjugantes obtenidas a partir de las cepas donadoras de UPEC 103, 126, 128 y como referencia se muestra el perfil de *E. coli* J53 usada como receptora. En el eje de las abscisas se muestran en diferentes colores los genes por función para la cepa receptora, donadoras (103, 126 y 128) y sus transconjugantes. Adhesión: *fimH* (adhesina Fimbria tipo 1), *papA* (pilina tipo P), *papGII*, *papGIII* (adhesina II y III de Fimbria tipo P) e *iha* (Proteína reguladora de hierro y adhesina homologa a *IrgA*). Toxinas: *satA* (fracción autotransportadora de Toxina autotransportadora secretada), *satP* (fracción peptidasa de la Toxina autotransportadora secretada), *hlyA* (alfa hemolisina), *vatA* (fracción autotransportadoras de Toxina autotransportadora vacuolizante), *vatP* (fracción peptidas de Toxina autotransportadora vacuolizante) y *cnf-1* (factor necrotizante citotóxico tipo 1). Flagelo: *fliC* (flagelo) y captadores de hierro: *iucD* (*Aerobactina*).

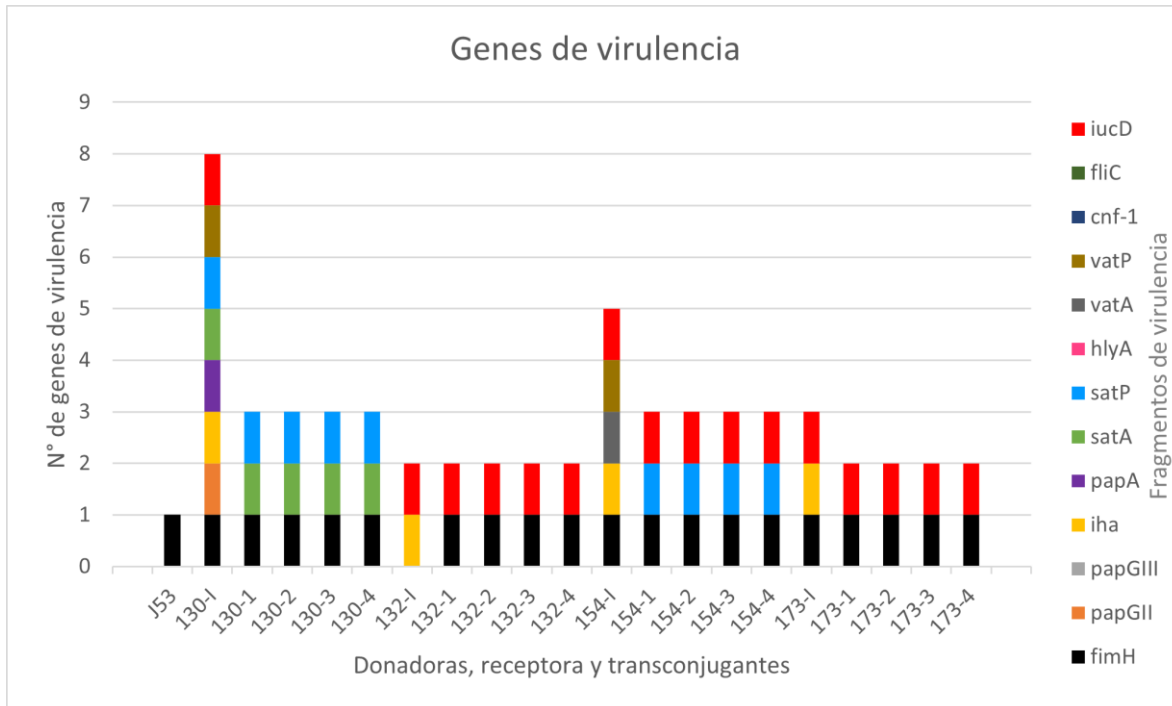


Figura 14.- Distribución de genes de virulencia adquiridos por cada una de las transconjugantes obtenidas a partir de las cepas donadoras 130, 132, 154, 173 y como referencia se muestra el perfil de *E. coli* J53 usada como receptora. En el eje de las abscisas se muestran en diferentes colores los genes por función para la cepa receptora, donadoras (130, 132, 154 y 173) y sus transconjugantes. Adhesión: *fimH* (adhesina Fimbria tipo 1), *papA* (pilina tipo P), *papGII*, *papGIII* (adhesina II y III de Fimbria tipo P) e *iha* (Proteína reguladora de hierro y adhesina homóloga a *IrgA*). Toxinas: *satA* (fracción autotransportadora de Toxina autotransportadora secretada), *satP* (fracción peptidasa de la Toxina autotransportadora secretada), *hlyA* (alfa hemolisina), *vatA* (fracción autotransportadora de Toxina autotransportadora vacuolizante), *vatP* (fracción peptidas de Toxina autotransportadora vacuolizante) y *cnf-1* (factor necrotizante citotóxico tipo 1). Flagelo: *fliC* (flagelo) y captadores de hierro: *iucD* (*Aerobactina*).

En la tabla 14 se describe el virotipo adquirido de las transconjugantes. El virotipo, *papGII*, *iha*, *papA*, *satA*, *satP*, *hlyA*, *cnf* y *iucD* fue el de mayor número de factores de virulencia transferidos (8 genes) y el de menor número de genes fue el de *iucD* y *satA*. El 84% de las clonas transconjugantes mostraron al menos de 1 a 2 genes de virulencia. Los genes que se transfirieron con más frecuencia fueron, *iucD*,+ y *satAP*.

De esto último, aquellas transconjugantes con mejor transferencia de acuerdo con los genes que obtuvieron: fueron el 4% (128-1) con un total de 8 de los 10 genes, el 16% (154-1, 154-2, 154-3 y 154-4) con 2 de 5 genes, el 16% (173-1, 173-2, 173-3 y 173-4) con 1 de 2 genes y el último con 16% (132-1, 132-2, 132-3 y 132-4) con presencia de 1 de 2 genes transferidos.

Tabla 13.- Distribución de los genes de virulencia observados en clonas Transconjugantes respecto de la cepas donadoras y receptora. Presente (+) y ausente (-).

| Receptora, donadoras y transconjugantes | Adhesinas | | | | | Toxinas | | | | | | Flagelo | Captación de hierro | Total |
|---|-------------|-------------|---------------|----------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|---------------------|-------|
| | <i>fimH</i> | <i>papA</i> | <i>papGII</i> | <i>papGIII</i> | <i>iha</i> | <i>satA</i> | <i>satP</i> | <i>hlyA</i> | <i>vatA</i> | <i>vatP</i> | <i>cnf-1</i> | <i>fliC</i> | <i>iucD</i> | |
| J53 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 103-I | + | + | - | - | + | + | + | - | + | - | - | - | + | 6 |
| 103-1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 103-2 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 103-3 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 126-I | + | + | - | - | + | + | + | - | - | + | - | - | + | 6 |
| 126-1 | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| 126-3 | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| 128-I | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | 10 |
| 128-1 | + | + | + | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + | 8 |
| 128-2 | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| 128-3 | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| 128-4 | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| 130-I | + | + | - | - | + | + | + | - | - | + | - | - | + | 6 |
| 130-1 | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | 2 |
| 130-2 | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | 2 |
| 130-3 | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | 2 |
| 130-4 | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | 2 |
| 132-I | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | 2 |
| 132-1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 132-2 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 132-3 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 132-4 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 154-I | + | - | - | - | + | - | + | - | + | + | - | - | + | 5 |
| 154-1 | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | 2 |
| 154-2 | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | 2 |
| 154-3 | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | 2 |
| 154-4 | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | 2 |
| 173-I | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | 2 |
| 173-1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 173-2 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 173-3 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 173-4 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| Porcentajes | 100% | 4.16% | 4.16% | 0% | 4.16% | 41.66% | 37.5% | 4.16% | 0% | 0% | 4.16% | 0% | 79.16% | |

La figura 15 muestra los porcentajes en que los genes de virulencia fueron transferidos a las transconjugantes los genes de adherencia: *papGII* 4%, *iha* 4%, *papA* 4 y *papGIII* 0%. Para los genes productores de tóxicas : *satA* 40%, *satP* 36%, *hlyA* 4%, *cnf-1* 4% *vatA* 0% y *vatP* 0%. Para el gen productor de flagelo: *fliC* 0% y por último, el gen para la captación de hierro *iucD* con 52%.

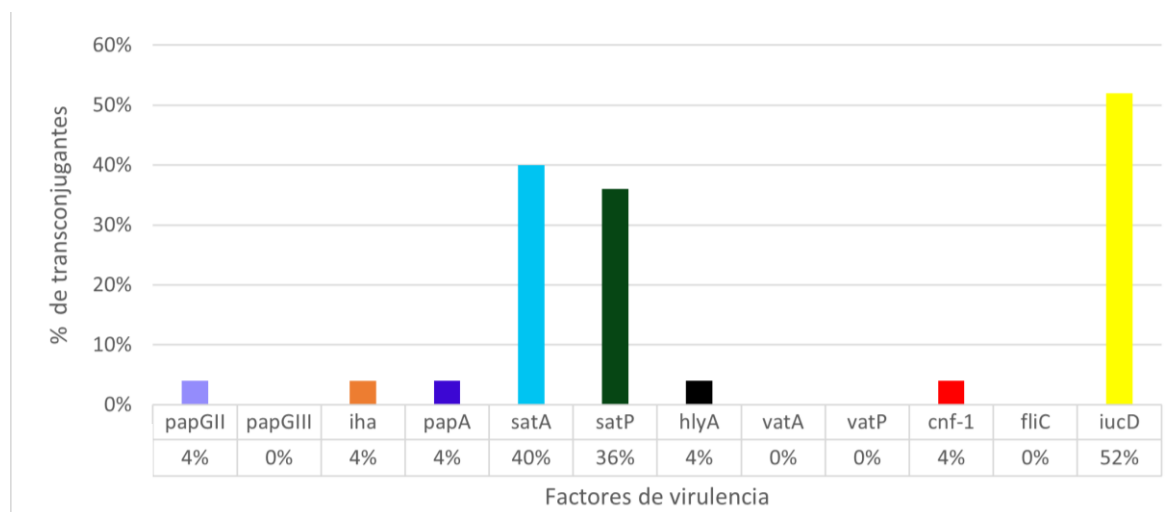


Figura 15.- Distribución de los genes de virulencia de cepas UPEC transferidos por conjugación. Se muestra el porcentaje de genes de virulencia identificados en 25 clonas transconjugantes. En el eje de las abscisas se muestran los genes por función. Adhesión: *fimH* (adhesina Fimbria tipo 1), *papA* (pilina tipo P), *papGII*, *papGIII* (adhesina II y III de Fimbria tipo P) e *iha* (Proteína reguladora de hierro y adhesina homóloga a IrgA). Toxinas: *satA* (fracción autotransportadora de Toxina autotransportadora secretada), *satP* (fracción peptidasa de la Toxina autotransportadora secretada), *hlyA* (alfa hemolisina), *vatA* (fracción autotransportadoras de Toxina autotransportadora vacuolizante), *vatP* (fracción peptidas de Toxina autotransportadora vacuolizante) y *cnf-1* (factor necrotizante citotóxico tipo 1). Flagelo: *fliC* (flagelo) y captadores de hierro: *iucD* (Aerobactina).

8.5.1.- Puntaje de virulencia de los genes completos en las clonas transconjugantes

Se observó que para los genes completos en la transconjugante 128-1 que presentó más FV, en donde fueron transferidos 6 de los 7 (85.71% de transferencia) factores estudiados de la donadora 128 y para las transconjugantes restantes 128-2, 128-3 y 128-4 no se encontró transferencia. Para las transconjugantes 154-1 a 4 solo se observó la adquisición de 1 de 3 (33.33% de transferencia) factores de virulencia de la donadora 154, para la clonas 130-1 a 4 presentaron un total de 1 factores adquiridos de 4 (25% de transferencia) de la donadora 130, para las transconjugantes 126-1 y 126-3 se transfirieron 0 de 4 (0% de transferencia) FV reportados en la cepa 126, las transconjugantes 173-1 a 4 mostraron solo 1 de los

2 (50% de transferencia) factores de virulencia reportados en la cepa 173 y para las transconjugantes 103-1, 103-2, 103-3 mostraron 0 de 4 (0% de transferencia) factores reportados en la cepa 103, por último, las transconjugantes 132-1 a 4 mostraron solo 1 de los 2 (50% de transferencia), figura 16.

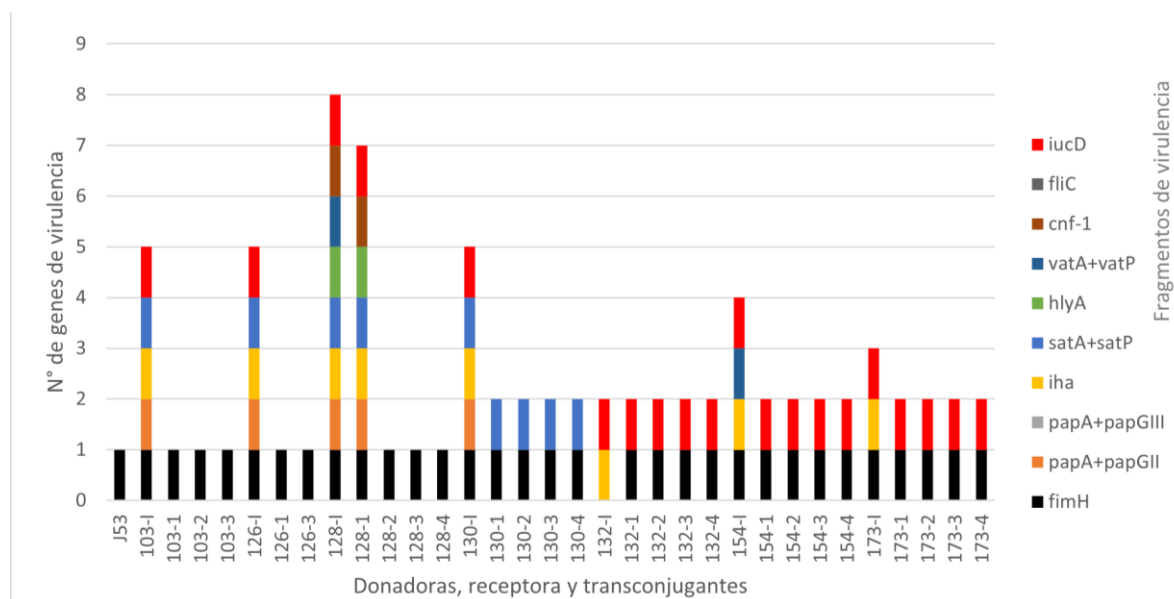


Figura 16.- Distribución de los factores de virulencia “completos” de cada una de las transconjugantes estudiadas con el perfil de virulencia de sus respectivas cepas donadoras y cepa receptora *E. coli* J53. En el eje derecho de las ordenadas se muestran los genes por función Adhesión: *fimH* (adhesina Fimbria tipo 1), *papA* (pilina tipo P), *papGII*, *papGIII* (adhesina II y III de Fimbria tipo P) e *iha* (Proteína reguladora de hierro y adhesina homologa a *IrgA*). Toxinas: *satA* (fracción autotransportadora de Toxina autotransportadora secretada), *satP* (fracción peptidasa de la Toxina autotransportadora secretada), *hlyA* (alfa hemolisina), *vatA* (fracción aut, otransportadoras de Toxina autotransportadora vacuolizante), *vatP* (fracción peptidasa de Toxina autotransportadora vacuolizante) y *cnf-1* (factor necrotizante citotóxico tipo 1). Flagelo: *fliC* (flagelo) y captadores de hierro: *iucD* (*Aerobactina*). En el eje de las ordenadas izquierdo el número de factores de virulencia y en el eje de las abscisas la receptora *E. coli* J53, donadoras (103, 128, 130, 132 y 154 y transconjugantes de cada una.

De los factores de virulencia presentes en las transconjugantes se logró observar que la transconjugante 128-1 fue la que recibió el mayor número de FV con el siguiente virotipo: *iha*, *papA+papGII*, *satA+satP*, *hlyA*, *cnf-1* y *iucD*, tabla 15 y 16.

Tabla 14.- Genotipo de virulencia de cepas de *E. coli* Donadoras, Receptora y Transconjugantes. Simbología (+). presente y ausente (-).

| Receptora, donadoras y transconjugantes | Adhesinas | | | | Toxinas | | | | Flagelo | Captacion de hierro | Factores de virulencia totales |
|---|-------------|--------------------|---------------------|------------|------------------|-------------|------------------|--------------|-------------|---------------------|--------------------------------|
| | <i>fimH</i> | <i>papA+papGII</i> | <i>papA+papGIII</i> | <i>iha</i> | <i>satA+satP</i> | <i>hlyA</i> | <i>vatA+vatP</i> | <i>cnf-1</i> | <i>fliC</i> | <i>iucD</i> | |
| J53 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 103-l | + | + | - | + | + | - | - | - | - | + | 4 |
| 103-1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 103-2 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 103-3 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 126-l | + | + | - | + | + | - | - | - | - | + | 4 |
| 126-1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 126-3 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 128 | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | 7 |
| 128-1 | + | + | - | + | + | + | - | + | - | + | 6 |
| 128-2 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 128-3 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 128-4 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 130-l | + | + | - | + | + | - | - | - | - | + | 4 |
| 130-1 | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | 1 |
| 130-2 | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | 1 |
| 130-3 | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | 1 |
| 130-4 | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | 1 |
| 132-l | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | 2 |
| 132-1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 132-2 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 132-3 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 132-4 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 154-l | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | 3 |
| 154-1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 154-2 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 154-3 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 154-4 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 173-l | + | - | - | + | - | - | - | - | - | + | 2 |
| 173-1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 173-2 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 173-3 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |
| 173-4 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 1 |

Tabla 15.- Factores de virulencia completos transferidos por conjugación por cepas UPEC

| Cepa donadora | Viotipo donadora | Bandas Plasmidicas (pb) | Transconjugantes | Viotipo transconjugante | Genes de virulencia | Bandas Plasmidicas y Tamaño (pb) | |
|---------------|--|---|------------------|---|---------------------|----------------------------------|-------------------|
| 103-I | iucD, satAP, papAGII, iha, y fimH | 5 (92000, 27735, 23000, 7666 y 4791) | 103-1 | 0 | 0 | 1 | 92000 |
| | | | 103-2 | | | 1 | 92000 |
| | | | 103-3 | | | 1 | 92000 |
| 126-I | iucD, satAP, papAGII, iha, y fimH | 5 (92000, 88933, 32470, 29764 y 5270) | 126-1 | 0 | 0 | 1 | 88933 |
| | | | 126-3 | | | 1 | 88933 |
| 128-I | iucD, cnf-1, vatAP, hlyA, satAP, papAGII iha, y fimH | 2 (92000 y 88933) | 128-1 | papAGII+ papA, iha, satAP, hlyA, cnf-1 y iucD | 6 | 1 | 88933 |
| | | | 128-2 | 0 | 0 | 1 | 88933 |
| | | | 128-3 | | | 1 | 88933 |
| | | | 128-4 | | | 1 | 88933 |
| 130-I | iucD, satAP, papAGII, iha, y fimH | 7 (93069, 90395, 10000, 9090, 7500, 6727 y 3545) | 130-1 | satA+satP | 1 | 1 | 88363 |
| | | | 130-2 | | | 2 | 93069 y 90395 |
| | | | 130-3 | | | 1 | 90395 |
| | | | 130-4 | | | 1 | 88363 |
| | | | | | | 1 | |
| 132-I | iucD y iha | 1 (7000) | 132-1 | iucD | 1 | 1 | 7000 |
| | | | 132-2 | | | 1 | 7000 |
| | | | 132-3 | | | 1 | 7000 |
| | | | 132-4 | | | 1 | 7000 |
| 154-I | satP iucD, vatAP, iha y fimH | 6 (95325, 8928, 7678, 6607, 1490 y 1083) | 154-1 | iucD | 1 | 1 | 95325 |
| | | | 154-2 | | | 1 | 95325 |
| | | | 154-3 | | | 3 | 8928, 1490 y 1083 |
| | | | 154-4 | | | 1 | 95325 |
| 173-I | iucD, iha y fimH | 3 (9285, 8035 y 1964) | 173-1 | iucD | 1 | 1 | 9285 |
| | | | 173-2 | | | 1 | 8035 |
| | | | 173-3 | | | 1 | 9285 |
| | | | 173-4 | | | 1 | 1964 |

Además, se observó el porcentaje real de FV de adherencia que se encontraron en todas las transconjugantes siendo: *papA+papGII* 4%, *papA+papGIII* 0% y *iha* 4% para los factores de virulencia productores de toxinas en: *satA+satP* 20%, *hlyA* 4%, *vatA+vatP* 0% y *cnf-1* 4%, para el factor de virulencia flagelar: *fliC* 0% y para el factor de captación de hierro *iucD* 52%, figura 17.

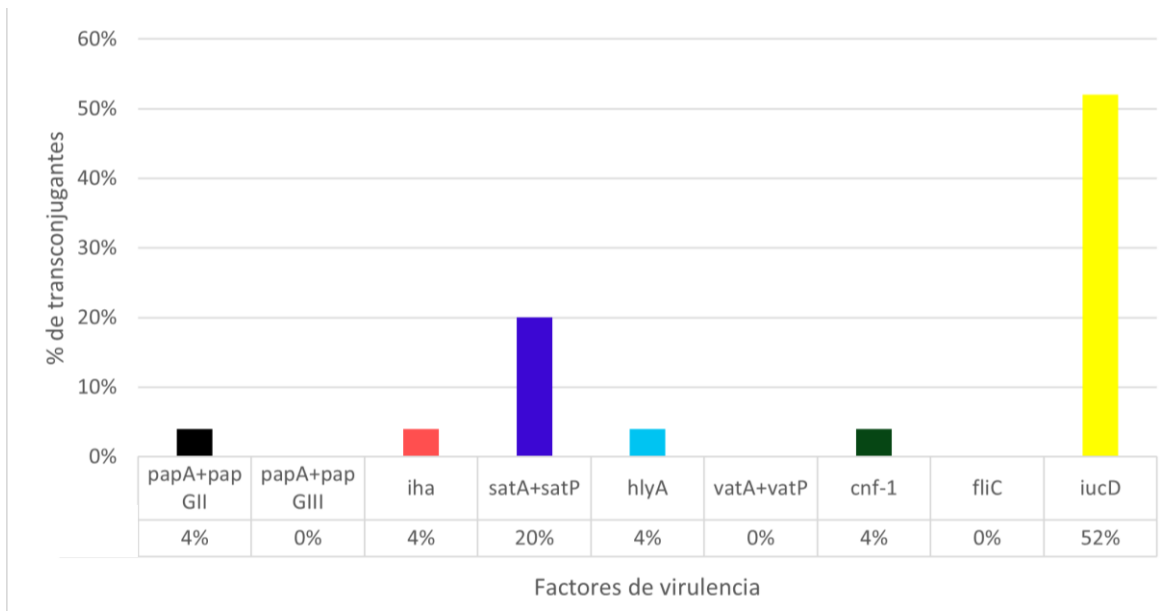


Figura 17.- Porcentaje de genes que codifican para factores de virulencia completos en todas las clonas transconjugantes estudiadas. En el eje de la ordenadas el porcentaje y en el de las abscisas se muestran los genes por función. Adhesión: *fimH* (adhesina Fimbria tipo 1), *papA* (pilina tipo P), *papGII*, *papGIII* (adhesina II y III de Fimbria tipo P) e *iha* (Proteína reguladora de hierro y adhesina homologa a *IrgA*). Toxinas: *satA* (fracción autotransportadora de Toxina autotransportadora secretada), *satP* (fracción peptidasa de la Toxina autotransportadora secretada), *hlyA* (alfa hemolisina), *vatA* (fracción autotransportadoras de Toxina autotransportadora vacuolizante), *vatP* (fracción peptidas de Toxina autotransportadora vacuolizante) y *cnf-1* (factor necrotizante citotóxico tipo 1). Flagelo: *fliC* (flagelo) y captadores de hierro: *iucD* (*Aerobactina*).

8.6.- Análisis de perfil de resistencia antibiótica en transconjugantes

En la tabla 17 se describe el virotipo adquirido de las transconjugantes junto con el número de bandas plasmidicas obtenidas en los ensayos.

Tabla 167.- Resistotipo y bandas plasmídicas de las transconjugantes respecto de las cepas donadoras y transconjugantes.

| Cepa donadora | Fenotipo de Resistencia cepa donadora | número de Marcadores de resistencia (fenotipo) | Bandas Plasmídicas (pb) | Transconjugantes | Resistencia transconjugante | número de Marcadores de fenotipo de resistencia | Bandas Plasmídicas y Tamaño (pb) | |
|---------------|---|--|---|------------------|--|---|----------------------------------|-------------------|
| 103-I | TE, CL, C, TSX, LVX, AN, CIP, OFX, NOR, AMC, ATM, FEP, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF, AMP y GM | 19 | 5 (92000, 27735, 23000, 7888 y 4791) | 103-1 | C, TSX, AMC, ATM, FEP, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF Y AMP | 11 | 1 | 92000 |
| | | | | 103-2 | CRO, CTX, CFZ Y CFX | 4 | 1 | 92000 |
| | | | | 103-3 | C, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF Y AMP | 7 | 1 | 92000 |
| 126-I | TE, LVX, AN, CIP, OFX, NOR, AMC, ATM, FEP, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF y AMP | 15 | 5 (92000, 88933, 32470, 29764 y 5270) | 126-1 | AN, CRO, CTX, CFX, CF, AMP y TE | 7 | 1 | 88933 |
| | | | | 126-3 | | | 1 | 88933 |
| 128-I | TE, C, TSX, LVX, AN, CIP, OFX, NOR, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF, NET, AMP y GM | 16 | 2 (92000 y 88933) | 128-1 | C, TSX, AN, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF, AMP y TE | 10 | 1 | 88933 |
| | | | | 128-2 | C, TSX, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF, AMP y TE | 9 | 1 | 88933 |
| | | | | 128-3 | C, TSX, AN, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF, AMP y TE | 10 | 1 | 88933 |
| | | | | 128-4 | C, TSX, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF, AMP y TE | 9 | 1 | 88933 |
| 130-I | TE, TSX, LVX, AN, CIP, OFX, NOR, NIT, AMC, ATM, FEP, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF, AMP y GM | 18 | 7 (93069, 90395, 10000, 9090, 7500, 6727 y 3545) | 130-1 | AMC, CTX, CFZ, CFX, CF Y AMP | 6 | 1 | 90395 |
| | | | | 130-2 | CRO, CTX, CFZ, CFX, CF Y AMP | 6 | 2 | 93069 y 90395 |
| | | | | 130-3 | AMC, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF Y AMP | 7 | 1 | 90395 |
| | | | | 130-4 | ATM, FEP, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF Y AMP | 8 | 1 | 90395 |
| 132-I | TE, LVX, AN, CIP, OFX, NOR, AMC, CRO, CFZ, CFX, CF, AMP y GM | 13 | 1 (7,000) | 132-1 | LVX, AN, CIP, OFX, NOR, AMC, CRO, CFZ, CFX, CF, AMP, GM y TE | 13 | 1 | 7000 |
| | | | | 132-2 | | | 1 | 7000 |
| | | | | 132-3 | | | 1 | 7000 |
| | | | | 132-4 | | | 1 | 7000 |
| 154-I | TE, C, TSX, LVX, AN, CIP, OFX, NOR, FOS, ATM, FEP, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF, AMP y GM | 18 | 6 (95325, 8928, 7678, 6607, 1490 y 1083) | 154-1 | TSX, FOS, ATM, FEP, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF, AMP, GM y TE | 12 | 1 | 95325 |
| | | | | 154-2 | | | 1 | 95325 |
| | | | | 154-3 | | | 3 | 8928, 1490 y 1083 |
| | | | | 154-4 | | | 1 | 95325 |
| 173-I | TE, C, TSX, LVX, AN, NOR, NIT, ATM, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF y AMP | 14 | 3 (9285, 8035 y 1984) | 173-1 | C, TSX, AN, ATM, FEP, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF, AMP y TE | 12 | 1 | 9285 |
| | | | | 173-2 | C, TSX, ATM, FEP, CRO, CTX, CFX, CF, AMP y TE | 10 | 1 | 8035 |
| | | | | 173-3 | C, TSX, AN, ATM, FEP, CRO, CTX, CFX, CF, AMP y TE | 11 | 1 | 9285 |
| | | | | 173-4 | C, TSX, ATM, FEP, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF, AMP y TE | 11 | 1 | 1984 |

El análisis de la resistencia a antibiótica se llevó a cabo con la metodología de Kirby-Bauer y las interpretaciones del halo de inhibición para la determinación de la resistencia antibiótica transferida a las transconjugantes se tomaron en cuenta los valores de sensibilidad, de resistencia intermedia y de resistencia y a los antibióticos reportadas en el CLSI, 2018. Las pruebas de resistencia se llevaron a cabo a 24 antibióticos pertenecientes a 10 familias.

La determinación del perfil de resistencia transferido a las transconjugantes mostró que la clona 103-1 obtuvo 11 (57.89%) del total de las 19 descritas en la donadora 103, la clona 103-2 obtuvo un total de 4 (22.22%) de 18 y la clona 103-3, 7 (38.88%) de 18 genes de resistencia. Las transconjugantes de la cepa 126, 1 y 3 mostraron la misma transferencia con 7 (46.66%) genes de 15 descritos en la donadora. Las clonas 128-1 y 3 compartieron el mismo número de genes siendo 10 (62.5%) de 16 y para las transconjugantes 2 y 4 se presentaron 9 (56.25%) de 16 genes transferidos. Para las transconjugantes 1 y 2 de la cepa 130 presentaron 6 (33.33%) de 18 genes, en las clona 3 y 4 se encontraron 7 (38.88%) y 8 (44.44%) genes de 18 respectivamente. Para la cepa 132 se describieron 13 genes de los cuales las 4 clonas obtuvieron todos (100%). La donadora 154 presentó 18 genes de resistencia y sus 4 transconjugantes obtuvieron 12 (66.66%) de ellos. Y por último la donadora 173 presenta 14 genes de resistencia y su transconjugante 173-1 mostró 12 genes (85.71%), la 173-2 presentó 10 (71.42%) y la 172-3 y 4 mostraron 11 (78.57%), figura 18 y tabla 18.

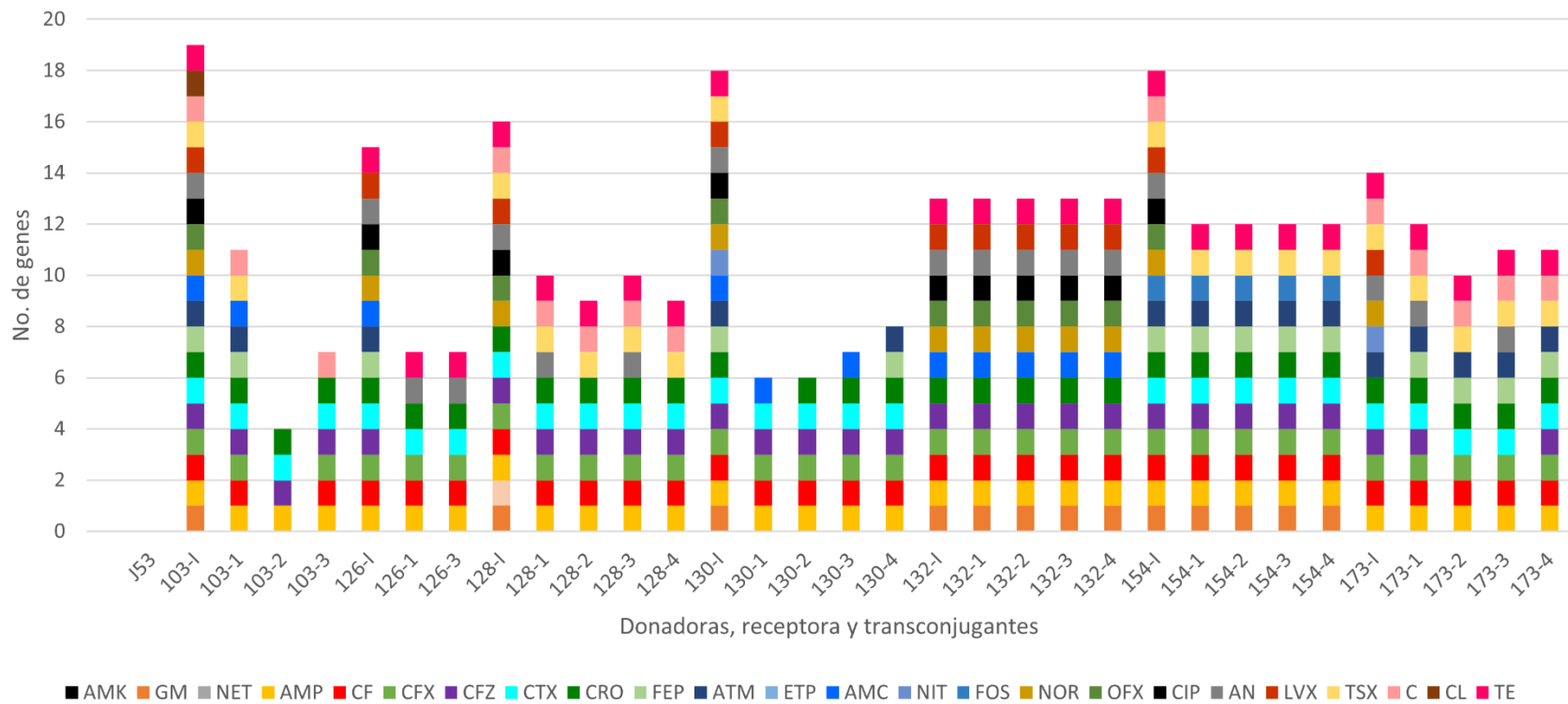


Figura 18.- Perfil de resistencia antibiótica de *E. coli* receptora, donadoras y clonas transconjugantes para cada uno de los 24 antibióticos probados. Aminoglucosidos: Amikacina (AMK), Gentamicina (GM) y Netilmicina (NET). Beta-Lactámicos: Ampicilina (AMP), Cefalotina (CF), Cefuroxima (CFX), Ceftazidima (CFZ), Cefotaxima (CTX), Ceftriaxona (CRO), Cefepime (FEP), Aztreonam (ATM), Ertapenem (ETP) y Amoxicilina-Ácido clavulánico (AMC). Nitrofuranos: Nitrofurantoina (NIT). Fosfonatos: Fosfomicina (FOS). Quinolonas/fluoroquinolonas: Norfloxacin (NOR), Ofloxacin (OFX), Ciprofloxacina (CIP), Ácido nalidixico (AN) y Levofloxacina (LVX). Inhibidores de la vía folato: Trimetropim/sulfametoxazol (TSX). Fenicolos: Cloranfenicol (C.). Polimixinas: Colistina (CL) y tetraciclinas: Tetraciclina (TE).

Tabla 17.- Perfil de resistencia antibiótica de *E. coli* receptora (J53), donadoras (103-1, 126-1, 128-1, 130-1, 132-1, 154-1 y 173-1) y clonas transconjugantes (1-4) para cada uno de los 24 antibióticos de 10 familias probados. En colores fuertes se aprecia el perfil de las cepas donadoras y en el mismo todo, pero claro los perfiles de

la clonas transconjugantes (1-4) en cada caso. En la última columna se aprecia el número de marcadores de resistencia que fueron transferidos en cada clona transconjugante respecto a su cepa donadora. Resistencia (+) y sensibilidad (-).

| Receptora, donadora y transconjugantes | Aminoglucósido | | | β-lactámicos | | | | | | | | | | Otros | | | | | | | | | | Resistencias transferidas respecto al donador | | |
|--|----------------|----|-----|--------------|-------------------|-----|-------------------|-----|-----|-----|----------------|----------------|----------------------|--------------|------------|----------------------------|-----|-----|----|-----|------------------------------|-----------|-------------|---|---------------|----|
| | | | | Penicilinas | CEF 1ra y 2da gen | | CEF 3ra y 4ta gen | | | | Monobactámicos | Carbapenémicos | Penicilina+inhibidor | Nitrofuranos | Fosfonatos | Quinolonas/fluorquinolonas | | | | | Inhibidores de la vía folato | Fenicoles | Polimixinas | | Tetraciclinas | |
| | AMK | GM | NET | AMP | CF | CFX | CFZ | CTX | CRO | FEP | ATM | ETP | AMC | NIT | FOS | NOR | OFX | CIP | AN | LVX | TSX | C | CL | | TE | |
| 153 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | NA |
| 103-1 | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 19 |
| 103-2 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | 11 |
| 103-3 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | 4 |
| 103-3 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | 7 |
| 126-1 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | 15 |
| 126-1 | - | - | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | 7 |
| 126-3 | - | - | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | 7 |
| 128-1 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 16 |
| 128-1 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | 10 |
| 128-2 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | 9 |
| 128-3 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | 10 |
| 128-4 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | 9 |
| 130-1 | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | 18 |
| 130-1 | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6 |
| 130-2 | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6 |
| 130-3 | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7 |
| 130-4 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 8 |
| 132-1 | - | + | - | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | 13 |
| 132-1 | - | + | - | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | 13 |
| 132-2 | - | + | - | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | 13 |
| 132-3 | - | + | - | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | 13 |
| 132-4 | - | + | - | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | 13 |
| 154-1 | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 18 |
| 154-1 | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | 12 |
| 154-2 | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | 12 |
| 154-3 | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | 12 |
| 154-4 | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | 12 |
| 173-1 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | + | - | - | + | + | + | - | + | + | 14 |
| 173-1 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | + | - | - | + | + | + | - | + | + | 12 |
| 173-2 | - | - | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | 10 |
| 173-3 | - | - | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | 11 |
| 173-4 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | 11 |

En resumen, se observó que las clonas transconjugantes recibieron entre 4 (103-2) a 13 (132-1 a -4) marcadores de resistencia antibiótica y presentaron un total 16 patrones de resistencia. La transconjugante 103-2 fue la que recibió menos marcadores: CRO, CTX, CFZ Y AMP. Además las 4 transconjugantes de la cepa 132 poseen el mismo perfil de resistencia que su donadora con un fenotipo de 13 marcadores de resistencia: TE, LVX, AN, CIP, OFX, NOR, AMC, CRO, CFZ, CFX, CF, AMP y GM (tabla 18).

Los resultados del análisis de las 25 transconjugantes del porcentaje de resistencia para por cada uno de los antibióticos fueron los siguientes: AMP (100%), CRO (96%), CFX (96%), CF (96%), CTX (84%), CFZ (84%), TE (72%), TSX (52%), ATM (40%), C (40%), AN (40%), FEP (40%), GM (32%), AMC (28%), NOR (16%), OFX (16%), NIT (16%) FOS (16%), CIP (16%), LVX (16%), NET (0%), AMK (0%), ETP (0%), y CL (0%) como se muestra en la figura 19. El fenotipo de resistencia que más se transfirió fue para los β-lactámicos (84-100%), seguido del de tetraciclina con un 72% y del de trimetropin-sulfametoxazol con un 52% Figura 19.

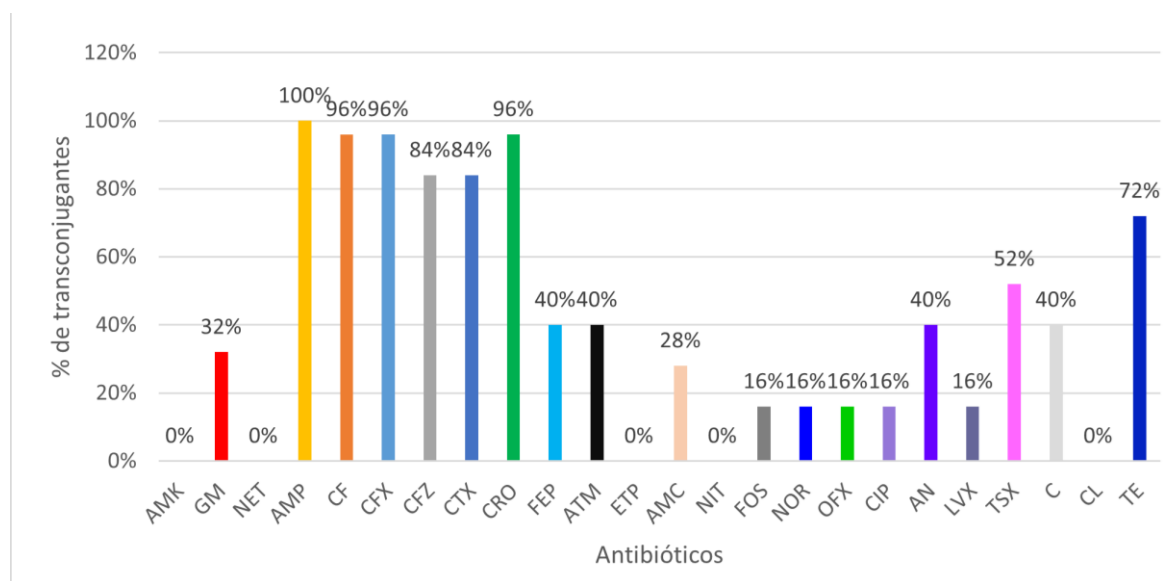


Figura 19.- Porcentaje de resistencia antibiótica en las transconjugantes de cada uno de los antibióticos descritos Aminoglucosidos: Amikacina (AMK), Gentamicina (GM) y Netilmicina (NET). Lactámicos: Ampicilina (AMP), Cefalotina (CF), Cefuroxima (CFX), Ceftazidima (CFZ), Cefotaxima (CTX), Ceftriaxona (CRO), Cefepime (FEP), Aztreonam (ATM), Ertapenem (ETP) y Amoxicilina-Ácido clavulánico (AMC). Nitrofuranos: Nitrofurantoina (NIT). Fosfonatos: Fosfomicina (FOS). Quinolonas/fluoroquinolonas: Norfloxacin (NOR), Ofloxacin (OFX), Ciprofloxacina (CIP), Ácido nalidíxico (AN) y Levofloxacina (LVX). Inhibidores de la vía folato: Trimetripim/sulfametoxazol (TSX). Fenicoles: Cloranfenicol (C.). Polimixinas: Colistina (CL) y tetraciclinas: Tetraciclina (TE).

Adicionalmente se realizó la determinación de la clasificación de resistencia para las transconjugantes de acuerdo con Magiorakos y cols, 2012, encontrando que el 96% de las transconjugantes son multidrogo resistente ya que fueron resistentes a más de 3 familias de antibióticos y el 4% restante fueron clasificadas como no multidrogo resistente debido a que solo fueron resistentes a 2 de las familias de antibióticos, figura 20.

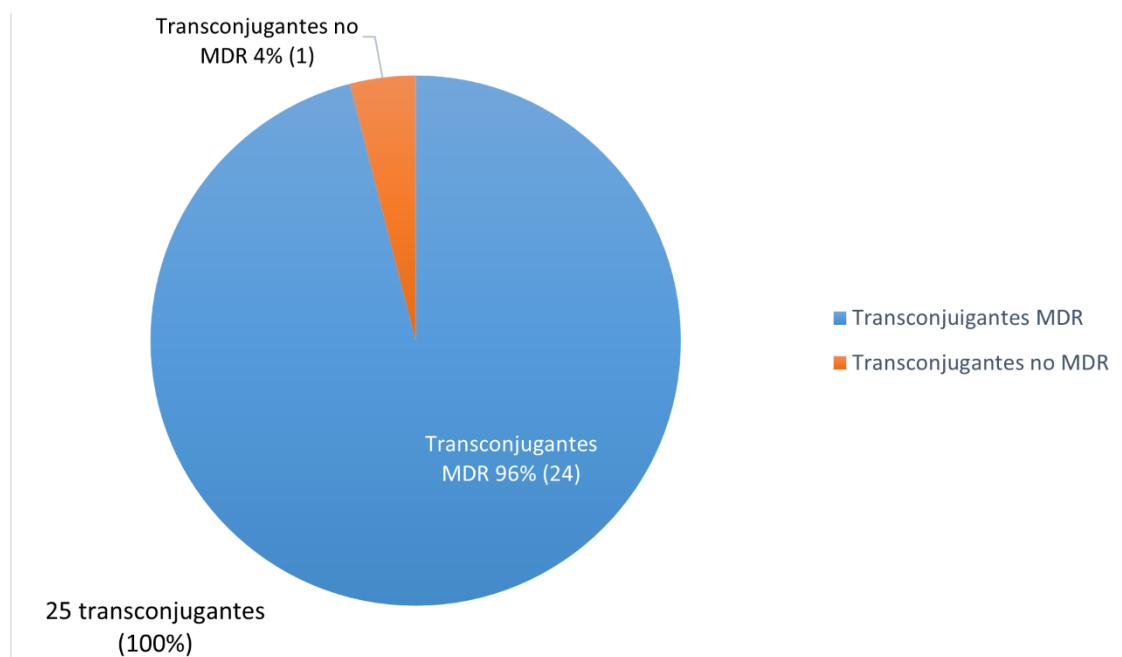


Figura 20.- Clasificación de resistencia de 25 transconjugantes obtenidas de 7 cepas de UPEC donadoras: Multidrogo-resistente (MDR y no multidrogo-resistente (NMDR).

8.7.- Caracterización del perfil plasmídico de transconjugantes

Para la caracterización de plásmidos solo se identificó el número de bandas plasmídicas presentes en cada una de las cepas transconjugantes, figura 21. La mayoría de las transconjugantes recibieron una banda plasmídica, solo la 130-2 y 154-2 recibieron dos bandas y la 154-3 recibió 3 bandas plasmídicas. La transconjugante 4 de la cepa 154 presento 2 bandas y la transconjugantes 3 de la cepa donadora 130 mostraron 2 bandas plasmídicas. Siendo la transconjugante 3 de la cepa donadora 154 la que presento 3 bandas plasmídicas y la transconjugantes 2 de la cepa donadora 130 mostro 2 bandas, 22 de las transconjugante solo mostraron una, figura 22. Todas las bandas encontradas en

las clonas transconjugantes corresponden en tamaño a la(s) presente(s) en su cepa donadora correspondiente.

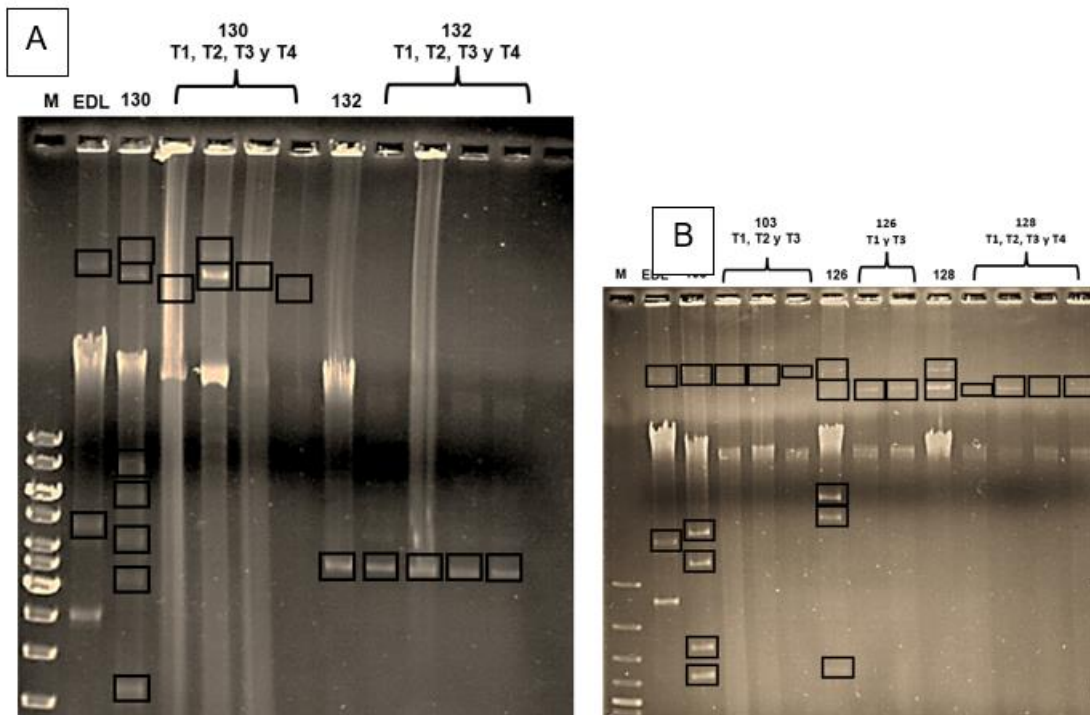


Figura 21.- Perfil plasmídico de cepas de *E. coli* donadoras y sus transconjugantes. Electroforesis en gel de agarosa al 1% representativo del análisis de cepas donadoras y sus transconjugantes A: Obtención de bandas plasmídicas mediante electroforesis de las muestras de extracción plasmídica de: *E. coli* EDL933 (EDL), cepa donadora 130-I y 132-I y sus respectivas transconjugantes 130-1, 130-2, 130-3 y 130-4 junto con 132-1, 132-2, 132-3 y 132-4, se utilizó marcador de 1kb. B: Obtención de bandas plasmídicas mediante la electroforesis de las muestras de extracción plasmídica de: *E. coli* EDL933 (EDL), cepa donadora 103-I, 126-I y 128-I sus respectivas transconjugantes T1, T2, T3 y/o T4 respectivamente se utilizó marcador de 100pb.

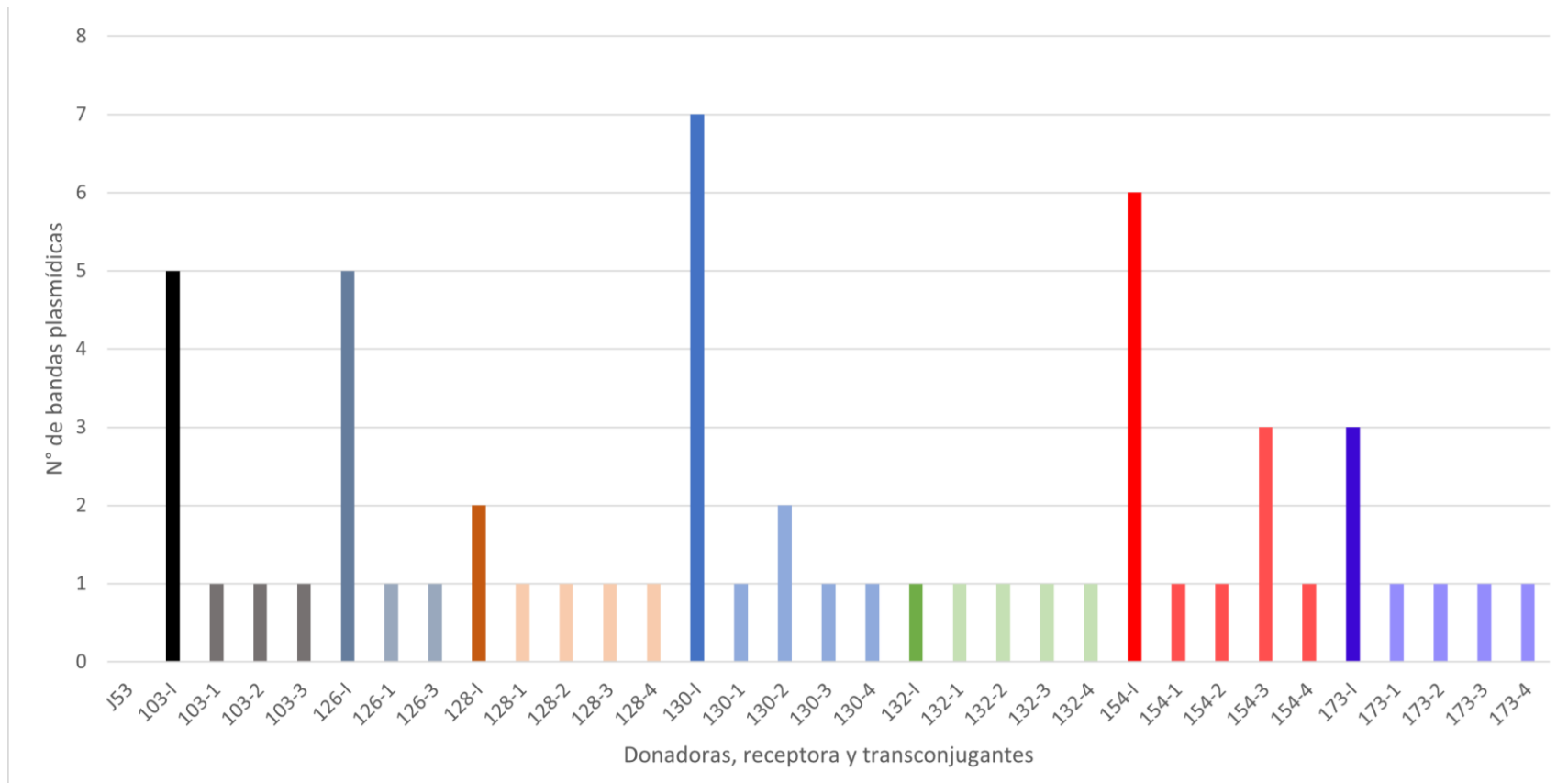
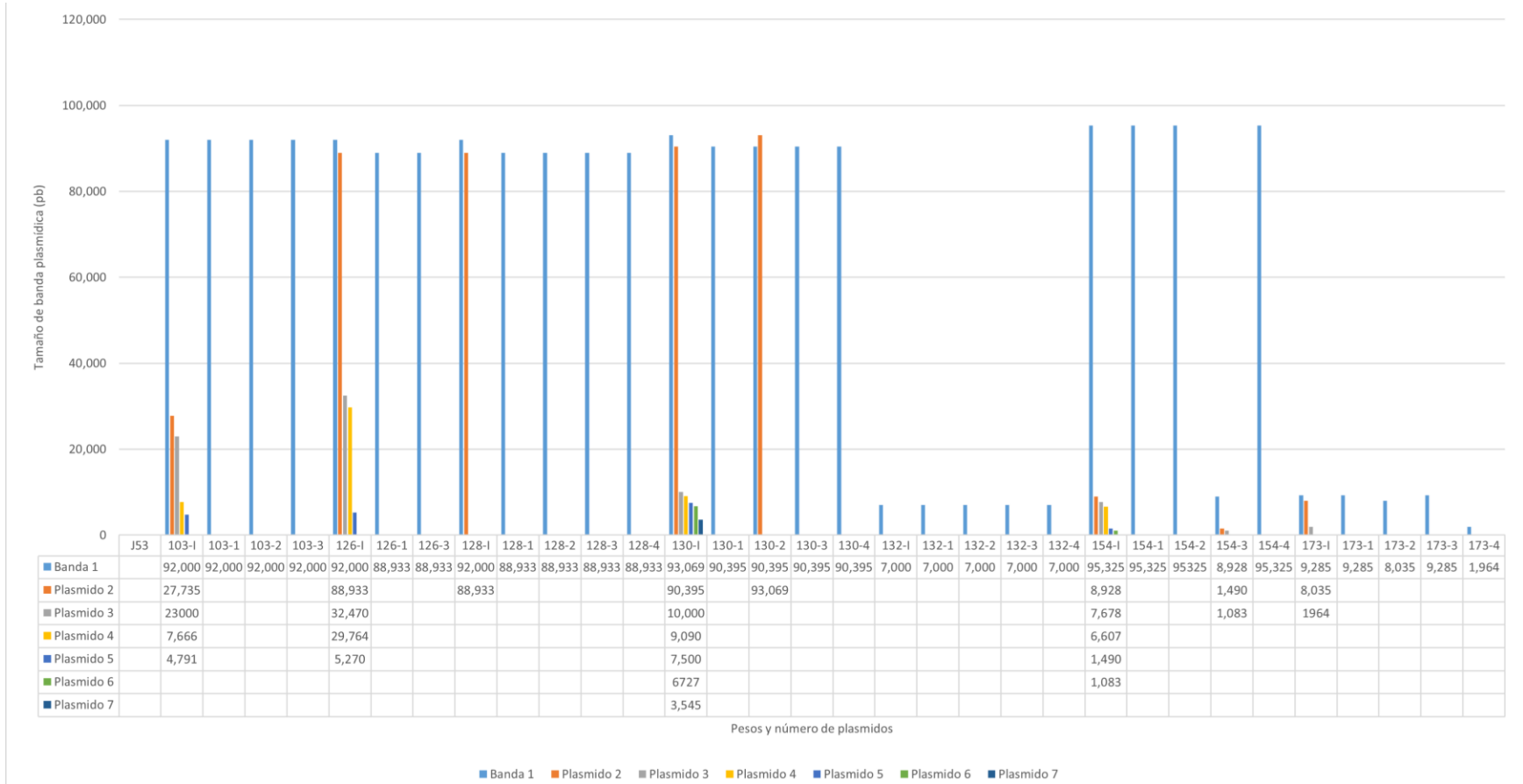


Figura 22.- Número de bandas plasmídicas observadas en donadoras, receptora y transconjugantes.

Se realizó la determinación del tamaño de las bandas plasmídicas considerando como referencia las bandas del marcador de peso molecular y los dos plásmidos de la cepa EHEC EDL933 con peso molecular 92kb y 2 kb. Se encontró que los plásmidos más grandes en las transconjugantes rondaban en los 92kb en las cepas donadoras 103, 126 y 128 y el plásmido más pequeño de 1.083 kb en la cepa 154. En las transconjugantes se mostró que los plásmidos grandes se encontraron en 103-1,103-2,103-3, 126-1, 126-3, 128-1, 128-2, 128-3, 128-4, 130-1, 130-2, 130-3, 130-4 y 154-4 y el plásmido más pequeño se observó en la clona 154-3 con un tamaño de 437 pb figura. El plásmido más pequeño de 1,083 pb en la cepa 154-I. En las transconjugantes se mostró que los plásmidos grandes se encontraron en 103-1,103-2,103-3, 126-1, 126-3, 128-1, 128-2, 128-3, 128-4, 130-1, 130-2, 130-3, 130-4, 154-1, 154-2 y 154-4, figura 23.

Figura 23.-Tamaño (pb) y número de las bandas plasmídicas encontradas en donadoras, receptora y transconjugantes.



9.- Discusión

9.1.- Detección de genes *MOB_{F12}* y *traT*

El presente estudio tuvo como objetivo determinar las propiedades de transferencia de un cepario UPEC de los factores de virulencia y resistencia por conjugación aisladas de varones.

En este estudio usando las 24 cepas de UPEC obtenidas de varones, el gen *traT* se encontró en el 62.5% (15 de las 24 cepas). Estos resultados concuerdan con Rijavec quien en 2006 usando 110 aislados de UPEC procedentes de pacientes con ITU de la comunidad en el 2002, identificó este gen en los distintos filogrupos que trabajo en un 57.27% (n=63), Zangane y cols. en el 2021 trabajo con 12 cepas de UPEC obtenidas de procesos de conjugación con características de resistencia a carbapenémicos, en el cual, lo reporta con el 66.7% (8) de los aislados, y Müller et al., 2016 usando 207 cepas de *E. coli* de diferente procedencia encontró que *traT* en un 55% (n=114). El gen *traT* forma parte de los plásmidos conjugativos, codifica una proteína de membrana que impide la formación del par conjugativo cuando las células donadora y receptora poseen un plásmido del mismo grupo de incompatibilidad. En el caso del gen *MOB_{F12}* se encontró en un 54.16% (13 de las 24) del cepario. Respecto al análisis de la presencia de *traT* y *MOB_{F12}* se observó que 13 (54.16%) de estas cepas presentaron ambos genes, 9 (38%) no presentaron ninguno de los genes y 2 (8%) mostraron solo el gen *traT*. Es conocido que el producto de *traT* es una lipoproteína localizada al exterior de la membrana, cuyo gen se encuentra en algunos plásmidos colV y en plásmidos de incompatibilidad F y cuya expresión ha sido ligada a mejorar la resistencia al suero ya que inhibe la vía de la actividad del complemento (Hasan et al., 2022). Además, los genes MOB se han caracterizado por ser una de las características de los plásmidos conjugativos, ya que codifica para una relaxasa, encargada del procesamiento del DNA conjugativo, por ello, los plásmidos con estas capacidades son autotransmisibles (Pilar et al., 2015). Además, en el caso particular de *MOB_{F12}* se ha demostrado que su papel está relacionado con la transferencia de genes de resistencia entre bacterias, ya que se ha reportado en un 96% de los aislados resistentes a 3

antibióticos y que albergan plásmidos conjugativos con MOB_{F12} (Suhartono & Savin, 2016).

Uno de los criterios para realizar ensayos de conjugación es tener un marcador de selección tanto para la cepa donadora como para la receptora. En este estudio las 13 cepas de *E. coli tra* y MOB_{F12} positivas son resistentes a ampicilina, por otra parte, la receptora es resistente a azida de sodio por lo que las pruebas de concentración mínima inhibitoria a azida de sodio realizadas a las cepas donadoras y de ampicilina para la cepa receptora (J53) fue el primer paso para determinar la susceptibilidad a azida y resistencia a Amp de las cepas donadoras y resistencia a azida y susceptibilidad a ampicilina de la cepa receptora y las concentraciones más adecuadas para seleccionar las clonas transconjugantes Ap^r , $Azida^r$.

9.2.- Perfil de resistencia a azida de sodio

Uno de los criterios para realizar los ensayos de conjugación es mediante un marcador de selección, tanto para la cepa donadora como para la receptora. En este estudio las 13 cepas de *E. coli tra* y MOB_{F12} positivas son resistentes a ampicilina, por otra parte, la receptora es resistente a azida de sodio por lo que las pruebas de concentración mínima inhibitoria a azida de sodio realizadas a las cepas donadoras y de ampicilina para la cepa receptora (J53) fue el primer paso para determinar la susceptibilidad a azida y resistencia a Amp de las cepas donadoras y resistencia a azida y susceptibilidad a ampicilina de la cepa receptora y las concentraciones más adecuadas para seleccionar las clonas transconjugantes (Ap^r , $Azida^r$) fue el primer paso para determinar dichos marcadores y las concentraciones más adecuadas para seleccionar las clonas transconjugantes.

Los resultados de resistencia de azida de sodio permitieron seleccionar 7 de las 13 cepas de *E. coli* uropatógena aisladas de pacientes de varones con ITU y que mostraron niveles de sensibilidad cuando se sometieron a concentraciones de 150 $\mu\text{g/ml}$ de azida de sodio. Para el caso de la receptora se sometió al mismo proceso, pero, utilizando ampicilina como fármaco de selección y se observó una sensibilidad

a ampicilina desde los 100 µg/ml. Lo cual nos permitió tener un sistema de presión selectiva para lograr obtener nuestras transconjugantes. En el caso de este trabajo para la obtención de las transconjugantes fue mediante el empleo de la proporción 1D:1R las cuales fueron mezcladas y llevadas a incubación en placas de LB adicionado con ampicilina desde 100 µg/ml y azida de sodio a 150 µg/ml durante un periodo de 24 a 48 horas como máximo. De acuerdo con Kong et al., 2018 usando una metodología de conjugación similar para la obtención de transconjugantes, utilizaron a *E. coli* J53Az^r como receptora y *E. coli* HK 01 resistente a meropenem como donadora. Ambas cepas se combinaron en caldo LB sin antibiótico para ensayos de conjugación en un proporción 1D:2R, a 37 °C durante 16 h. Para la selección de transconjugantes se emplearon placas de LB con azida de sodio (100 µg/ml) y diferentes concentraciones de meropenem (0,12, 0,5, 1 y 2 µg/ml). La selección de las transconjugantes se mantuvo en concentraciones de meropenem al 0,12 µg/ml. Ya que se ha observado que el proceso de presión selectiva forma parte esencial para la selección y expresión fenotípica de las resistencias transferidas por parte de las cepas donadoras a las transconjugantes en los procesos de conjugación. Además, las proporciones casi idénticas en relación a la donadora y la receptora amplia la posibilidad de incrementar los casos de conjugación (Gullberg et al., 2011; Lopatkin et al., 2016).

9.3.- Ensayos de conjugación

En el 2020 de acuerdo con Pérez y cols. seleccionaron 150 cepas de *E. coli* aisladas de varios lugares de los cuales fueron en: humanos siendo 13 cepas de pacientes sanos y 36 aislados de casos clínicos, 48 de productos alimenticios, 20 de piensos, 33 de ríos y plantas de tratamiento de aguas residuales. Las cepas donadora y receptora fueron cultivadas en medio BHI y se obtuvo una concentración aproximada de 1.0×10^9 UFC/ml. La conjugación se realizó con 70 cepas sensibles a estreptomicina empleando el uso del medio de selección, donde se cultivaron las cepas donadoras y receptora para mezclarse en relación 1:1 siendo incubadas a 37 °C. Las transconjugantes se seleccionaron en agar TSA con estreptomicina (100 g/ml) y ampicilina (30 g/ml) para inhibir el crecimiento de la cepa donadora y

receptora. Siendo este procedimiento uno de los más factibles para la selección de transconjugantes. De acuerdo con lo anterior los procesos llevados de conjugación en este trabajo fueron similares a lo realizado y descrito a lo antes mencionado, pero con la implementación de la metodología para la conjugación (Tema 7.3). Los resultados de los ensayos realizados en este trabajo mostraron frecuencia de conjugación de 12×10^0 , 140×10^0 y 133×10^0 , de 0.2×10^1 y 39.7×10^1 y, por último, de 7.93×10^2 , 2.21×10^2 y 2.05×10^2 . Quizá la diferencia en el caso de Pérez y cols. en el 2020 con el valor de su UFC fue la procedencia de las cepas, ya que casi la mayoría eran de pacientes sanos, productos alimenticios, piensos ríos y plantas de tratamiento y solo el 24% fueron de aislado de casos clínicos con ITU. Con lo cual podría ser la diferencia a la hora de desarrollar en procesos *in vitro*. Otro caso como en el de Kong et al., 2018 quien utilizó dos cepas para conjugación: la *E.coli* HK-01 como donadora y *E.coli* J53 como receptora las cuales fueron mezcladas en medio LB sin antibiótico en una proporción de 1D:2R. En este estudio se realizaron varios ensayos en distintas concentraciones y se obtuvieron varias frecuencias desde 1.8×10^3 , 1.8×10^4 , 2.7×10^6 y 2.1×10^8 (Kong et al., 2018). Las transconjugantes fueron seleccionadas en placas de LB con azida de sodio a $100 \mu\text{g}/\text{m}$ y a concentraciones de meropenem del $0.12 \mu\text{g}/\text{ml}$. Comparado al trabajo presente una de las diferencias podría radicar en el aumento de la proporción siendo 1D:2R para el donador y recipiente; con lo cual podríamos inducir de que al tener mayor número de células receptoras y menor número de donadoras existe un incremento en la UFC ya que tendrían una mayor posibilidad de contacto (conjugación) con lo cual significaría mayores valores en la UFC.

9.4.- Identificación de transconjugantes por grupo filogenético

Con la finalidad de caracterizar las clonas transconjugantes obtenidas de los 7 ensayos de conjugación se realizó la identificación filogenética de las transconjugantes se obtuvo mediante el esquema de trabajo propuesto por Clermont et al., 2013, donde se determinan los distintos grupos filogenéticos y su clasificación. Se determinó el filogrupo de la cepa receptora (J53) y se conocía en de las donadoras del cepario procedente del I.S.S.S.T.E (Huelgas, 2020) pero en

este estudio se confirmó. Se identificó el filogrupo A para la cepa receptora (J53), para las cepas *E. coli* 103-I, 126-I, 128-I y 130-I fueron filogrupo B2, la cepa donadora 132-I pertenece al filogrupo A, la cepa 154-I al D y la cepa donadora 173-I al clado C1 (clado 1). Las 28 transconjugantes obtenidas fueron sometidas a este mismo ensayo para determinar su filogrupo y confirmar si eran verdaderas transconjugantes, obteniendo que un 89.28% (25 de 28) de las clonas cumplen con el grupo filogenético A de la receptora, el resto fueron descartadas. Zangane y cols. en 2021 al igual que en este trabajo realizó la misma identificación proporcionada por Clermont et al., 2013 siendo los siguientes genes identificados: *arpA*, *chuA* and *yjaA*, y TSPE4.C2, para después identificar mediante la expresión de estos genes identificar el tipo de filogrupo perteneciente a cada cepa A, B1, B2, C, D, E and F.

9.5.- Análisis de fragmentos de virulencia en transconjugantes

Los fragmentos de virulencia determinados en las transconjugantes mostraron una distribución variable, ya que no todas las clonas mostraron la misma cantidad ni tipo de factor de virulencia, respecto a su donadora. La transconjugante 128-1 fue la que más genes adquirió de su donadora con un total de 8 (*papGII*, *iha*, *papA*, *satA*, *satP*, *hlyA*, *cnf-1* y *iucD*) de los 10 (*papGII*, *iha*, *papA*, *satA*, *satP*, *hlyA*, *cnf-1*, *vatP*, *vatA* y *iucD*) genes vistos (80%) que posee la cepa 128-I y para las transconjugantes con menor número de genes transferidos de todas las transconjugantes estudiadas fueron de la cepa 124-I, siendo las transconjugantes: 128-2, 128-3 y 128-4 que presentaron 1 de los 10 genes (10%). Para las transconjugantes que no obtuvieron factores de virulencia de acuerdo con los que se observaron de su cepa donadora 103-I fueron las transconjugantes 103-1, 103-2 y 103-3. El porcentaje de transferencia de genes en las transconjugantes de manera general fue la siguiente: para adhesinas la más observada fue *papGII* 4%, *iha* 4% y *papA* 4% y el gen que no se observó fue *papGIII* con un 0% para el resto de las adhesinas se encontraron en 4% de las clonas. Para los genes de toxicidad fue del: 40% para *satA*, 36% de *satP* siendo lo más altos y en menor porcentaje: *hlyA* 4% y *cnf-1* 4% los restantes genes no se encontraron. El gen del flagelo *fliC* no se observó y en el caso del captador de hierro *iucD* se observó con el 52%. Nuestros resultados son similares

con Kuznetsova y cols. en 2022 presentaron una colección de aislados de UPEC, siendo un total de 93 muestras colectadas de orina de pacientes con ITU sintomática proveniente de la clínica urbana del hospital No. 4 en Rusia, Perm dentro del 2015 y 2017. En este estudio se estudiaron las 93 muestras en base a los patrones de resistencia y sensibilidad para realizar ensayos de conjugación, se seleccionaron 29 cepas seleccionadas de UPEC las resultantes como candidatas para ensayos de conjugación. En el análisis de las transconjugantes se observó que en 21 (72.4%) de las 29 transconjugantes adquirieron el gen de adherencia *fimH*, en 10 (34.48%) de las 29 el gen *papC*, y para *cnf-1* e *hlyA* en 6 (20.68%) de las 29. La variación podría estar dada por la diversidad del nicho del que procede el microorganismo ya que son cepas estudiadas de la región de Rusia por los cuales tendría sentido mencionar que sus características son particulares para esa zona a comparación de las aisladas de la región de México, Puebla o quizá siendo una de las causas por las cuales algunos genes no se mostraron en mayor cantidad como en los estudios realizados por parte de Kuznetsova sea la capacidad de la cepa receptora de lograr expresar o sintetizar los genes. Ya que se ha observado que algunas no logran expresarlos y quizá esto sea debido a la falta de afinidad por alguna de las proteínas reguladoras como las proteínas SSB o DNA polimerasas.

9.5.1.- Puntaje de virulencia de los genes completos en transconjugantes

El análisis de las clonas con más transferencias de genes que codifican para FV completos mostró que las clonas 128-1 obtuvo un 85.71% de genes de virulencia completos y las transconjugantes 173-1, 173-2, 173-3 y 173-4 con el 50% y en menor medida las clonas 128-2, 128-3 y 128-4 no presentaron transferencia. Para los genes más frecuentes de adhesinas están: *papA+papGII* 4%, *iha* 4% y por el contrario el gen completo *papA+papGIII* que no se encontró. Para los factores de virulencia productores de toxinas: *satA+satP* 20%, *hlyA* 4%, *cnf-1* 4% y *vatA+vatP* que no se observó. El factor de virulencia flagelar *fliC* no se observó y para el factor de captación de hierro *iucD* se midió en un 52%. Como podemos observar son genes que codifican para adhesinas y toxinas, en el presente estudio además encontramos que las clonas adquirieron por conjugación el gen que codifica para

aerobactina un sideróforo que se ha reportado como importante para la captación de hierro en cepas UPEC.

9.6.- Análisis del perfil de resistencia antibiótica en transconjugantes

De todas las transconjugantes se observó que una transconjugante (103-1) obtuvo el 57.89% los marcadores fenotípicos de resistencia antibiótica respecto a su donadora 103-I, la clona 103-2 con un 22.22% y la cepa 103-3 presentando un 38.88% de los genes de resistencia encontrados en la donadora. Las transconjugantes 1 y 3 de la cepa 126-I mostraron un 46.66% descritos en la donadora. Las clonas 128-1 y 3 compartieron el mismo número de genes siendo el 62.5% y para las transconjugantes 2 y 4 recibieron el 56.25% genes de resistencia. Para las transconjugantes 1 y 2 de la cepa 130-I se recibieron el 33.33% de genes, en las clona 3 y 4 se encontró en 38.88% y 44.44%. Para la cepa 132-I todas las clonas obtuvieron el mismo fenotipo de resistencia que su donadora. La donadora 154-I presentó 17 genes y sus 4 transconjugantes obtuvieron el 66.66% de ellos. Y por último la donadora 173-I presentó 13 genes de resistencia y sus transconjugantes como en el caso de la clona 173-1 mostró el 85.71% de genes, la 173-2 presentó 71.42% y las clonas 172-3 y 4 mostraron el 78.57%.

Además se observó que el resistotipo de las transconjugantes de la cepa 132-I fue similar a la donadora (LVX, AN, CIP, OFX, NOR, AMC, CRO, CFZ, CFX, CF, AMP, GM y TE) el cuál es el resistotipo más extendido ya que presenta resistencia a 13 antibióticos degradados de los 24 analizados, las clonas de la donadora 154 adquirieron 12 resistencias (TSX, FOS, ATM, FEP, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF, AMP, GM y TE) lo mismo con la transconjugante 173-1 (C, TSX, AN, ATM, FEP, CRO, CTX, CFZ, CFX, CF, AMP y TE), para las cuales el 60% de sus transconjugantes fueron resistentes a más de 10 antibióticos y el otro 40% presentó una menor resistencia antibiótica ya que solo presentaron < 9 resistencias antibióticas. Por el contrario, el resistotipo menos amplio se encontró para la clona 103-2 con un perfil de resistencia a 4 antibióticos (CRO, CTX, CFZ Y CFX). Los resultados del análisis del perfil de resistencia para las 25 transconjugantes mostraron que los mayores porcentajes de resistencia son para los antibióticos de Ampicilina (AMP) con el

100% de resistencia, ceftriaxona (CRO) con el 96% de resistencia antibiótica, ceftazidima (CFX) por igual y por último cefalotina (CF) con el 96%. En los porcentajes menores se observaron los siguientes fármacos: Norfloxacin (NOR) con el 16%, Ofloxacin (OFX) con el 16%, nitrofurantoina (NIT) con el 16%, Fosfomicina (FOS) con el 16%, ciprofloxacina (CIP) con el 16% y levofloxacina (LVX) por igual. Y aquellas resistencias que no se lograron transferir fueron para los antibióticos: Netilmicina (NET), amikacina (AMK), ertapenem (ETP) y colistina (CL), la resistencia del resto de los antibióticos oscilo en los porcentajes de los 28 a 84%. estos resultados concuerdan con Shafiq y cols. en el 2023 trabajo con 409 aislamientos de *E. coli* de los cuales se catalogaron con betalactamasas de espectro extendido a 216 aislados. Los aislamientos fueron obtenidos de 26 departamentos diferentes de un hospital en los periodos de Mayo y Septiembre del 2021 provenientes de China encontrando las siguientes porcentajes de resistencia antibiótica:: CXM (100%) CRO (97.68%), LEV (68.51%), SXT (65.74%), FEP (56.48%), CAZ (37.50%), FOX (15.27%), AMC (10.18%), SCF (8.33%) y TZP (6.48%). Ya antes mencionado compartimos una relación con el valor del carbapenémico ceftriaxona (CRO) con el 96% de resistencia antibiótica considerando que puede deberse porque los organismos son aislados de nosocomios principalmente; aunque el resto de los valores de los demás fármacos no coincidan quizá por el origen de la muestra ya que estos son de aislado de China. Kuznetsova y cols. en 2022 encontraron que los valores de resistencia a beta-lactamicos era de un 79.31% además de que se encontraron clonas con resistencia a fluoroquinolonas con el 62.07%. Para las clasificaciones de resistencia antibiótica de las clonas se distinguieron en dos grupos de acuerdo con los resultados previamente descritos en los ensayos de Kirby Bauer, siendo el 96% de las clonas transconjugantes multidrogoresistentes y el otro 4% fueron catalogadas como no multidrogo resistente. Raeispour, M. & Ranjbar, R. en 2018, en un periodo de 6 meses estudiaron un total de 60 cepas de *E. coli* aisladas de sujetos de estudio y distinguidos por genero y locación en el cual el 100% de los aislados fueron catalogados como multidrogo resistente. Durante el 2018, Ramírez y cols. realizaron un estudio con ciento diez muestras recolectados de pacientes con una ITU

procedentes del Hospital Miguel Hidalgo, en Aguascalientes, México durante el periodo de Junio a Noviembre de 2012 y el rango de edad oscilo desde recién nacidos y adultos de 91 años. En el caso de la alta frecuencia de resistencia se observó en trimetoprima- sulfametoxazol (72,7%), ampicilina (70,9%), ampicilina-sulbactam (55,5%), piperacilina-tazo-bactam (55,5%), ciprofloxacina (47,3%) y levofloxacina (43,6%). El 87% de los aislados fueron resistentes a un antibiótico y el 63.3% (70) fueron multidrogo resistentes, y estos, presentaron resistencias a ampicilina (85,7%), trimetoprima-sulfametoxazol (84,3%), ampicilina-sulbactam (77,1%), piperacilina-tazobac-tam (77,1%) y ciprofloxacino (70%). Los resultados de las resistencias a antibióticos son similares, por lo cual, se puede relacionar con la presencia de genes BLEE ya que suelen ser los causantes de estas propiedades de resistencia, dando paso a microorganismos MDR como los que trabajamos, ya que suelen ser transferidos por los procesos de conjugación. Además de que nuestros datos de resistencia a ampicilina (AMP) 100% de resistencia, ceftriaxona (CRO) con el 96% de resistencia antibiótica, ceftazidima (CFX) por igual y por último cefalotina (CF) con el 96%. Muestra que hay una relación mayor de resistencia en las zonas de México, ya que si no son los mismos presentan otras resistencias altas en sus estudios y que como en este trabajo dicha resistencia podría estar dada por el género, ya que se ha visto que en varones suelen estar microorganismos con mayor resistencia a los fármacos.

9.7.- Caracterización del perfil plasmídico en transconjugantes

Los pesos de los plásmidos mostraron gran variedad de tamaños de los cuales se observó que los más comunes fueron plásmidos grandes que rondaban en los 95 y 88 kb donde 3 de las transconjugantes 103-1, 103-2 y 103-3 presentaron plásmidos de 92 kb y los plásmidos de 88.9 kb los presentaron las colonas 126-1 y 126-3 junto con las transconjugantes de la donadora 128-I, los tamaños de las bandas plasmídicas de las transconjugantes 130-1, 130-3 y 130-4 fue de 90 kb y la clona 130-2 presento 2 plásmidos de 93 kb y 90 kb, las clonas de la donadora 132-I presentaron un solo plásmido de 7 kb, la clona 154-3 presento 3 plásmido de 8.9 kb, 1.4 kb y 1 kb y la clona 154-4 presento un plásmido de 95.3 kb y el resto de

transconjugantes de la 154-I de 95.3 kb y por último las transconjugantes de la cepa 173-I empezando por las transconjugantes 173-1 y 3 presentaron un plásmido de 9kb, la 173-2 de 8 kb y 173-4 de 1.9 kb. Wang y cols. en el año del 2013 realizaron un trabajo con 87 cepas de *E. coli* donde 34 cepas de las cuales fueron aisladas de heces de pacientes saludables y 52 de productos animales en Suiza. Dónde 32 cepas fueron seleccionadas para ensayos de conjugación para analizar, utilizando como presión selectiva a cefotaxima y rifampicina. Se observó que en 16 de las transconjugantes poseían plásmidos grandes mayores a los 80kB. Además de que se observó que en una cepa aparecieron 2 plásmidos pequeños de 2 y 7 kb. Ya que esto puede deberse al tipo de plásmido debido a que se ha observado que dependiendo del tipo de este en el caso podría tratarse de plásmidos IncF que suelen ser de tamaños grandes y que están por arriba de los 50 kb. Además, se observó que en la transconjugante 154-3 tenía 2 plásmidos pequeños de 1.4 y 1 kb.

10.- Conclusión

1. Existen cepas poblanas de UPEC aisladas de varones cursando con ITU capaces de transferir por conjugación genes que codifican para factores de virulencia y de resistencia.
2. Las cepas de UPEC son capaces de transferir genes que codifican para adherencia (*papAGII*), captación de hierro (*iucD*) y toxinas (*satAP*, *hlyA*, y *CNF*).
3. Una cepa de UPEC fue capaz de transferir el 85.71% de sus genes de virulencia.
4. Los genes de resistencia a beta-lactámicos de UPEC son los que se transfieren por conjugación con mayor frecuencia.
5. La transferencia por conjugación puede convertir a una cepa multidrogoresistente.
6. Las bandas plasmídicas conjugativas en UPEC superan los 80kb, pero también se encuentran entre 1.1 a 9.3 kb.

11.- Perspectivas:

1. Realizar ensayos de campos pulsados para determinar el número y tamaño de los plásmido de las cepas donadoras y sus transconjugantes.
2. Identificar qué tipo de PAIs se encuentran en las transconjugantes.
3. Determinar los tipos de BLEE que presentan las transconjugantes.
4. Realizar ensayos para determinar la capacidad de formar comunidades bacterianas intracelulares de las transconjugantes.
5. Determinar la presencia o existencia de integrones, transposones y secuencias de inserción en las transconjugantes.

Bibliografía

- Ageorges, V., Monteiro, R., Leroy, S., Burgess, C. M., Pizza, M., Chaucheyras-Durand, F., & Desvaux, M. (2020). Molecular determinants of surface colonisation in diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC): From bacterial adhesion to biofilm formation. *FEMS Microbiology Reviews*, *44*(3), 314–350. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa008>
- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040438>
- Alteri, C. J., & Mobley, H. L. T. (2007). Quantitative Profile of the Uropathogenic *Escherichia coli* Outer Membrane Proteome during Growth in Human Urine. *Infection and Immunity*, *75*(6), 2679–2688. <https://doi.org/10.1128/iai.00076-07>
- Andrews, S., Norton, I., Salunkhe, A. S., Goodluck, H., Aly, W. S. M., Mourad-Agha, H., & Cornelis, P. (2013). Control of iron metabolism in Bacteria. In *Metal Ions in Life Sciences* (Vol. 12). https://doi.org/10.1007/978-94-007-5561-1_7
- Archer, C. T., Kim, J. F., Jeong, H., Park, J. H., Vickers, C. E., Lee, S. Y., & Nielsen, L. K. (2011). The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): Comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. *BMC Genomics*, *12*(Atcc 9637). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-9>
- Asadi Karam, M. R., Habibi, M., & Bouzari, S. (2019). Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Immunology*, *108*(69), 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.007>
- Baichoo, N., & Helmann, J. D. (2002). Recognition of DNA by Fur: A reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *Journal of Bacteriology*, *184*(21), 5826–5832. <https://doi.org/10.1128/JB.184.21.5826-5832.2002>
- Bakás, L., Maté, S., Vazquez, R., & Herlax, V. (2013). *hemolisina de Escherichia*

coli Action mechanism of *Escherichia coli* *Escherichia coli*. 47(2), 353–361.

- Behzadi, P. (2020). Classical chaperone-usher (CU) adhesive fimbriome: uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and urinary tract infections (UTIs). *Folia Microbiologica*, 65(1), 45–65. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00719-x>
- Bessonov, K., Laing, C., Robertson, J., Yong, I., Ziebell, K., Gannon, V. P. J., Nichani, A., Arya, G., Nash, J. H. E., & Christianson, S. (2021). ECTyper: In silico *Escherichia coli* serotype and species prediction from raw and assembled whole-genome sequence data. *Microbial Genomics*, 7(12). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000728>
- Bizuwork, K., Alemayehu, H., Medhin, G., Amogne, W., & Eguale, T. (2021). Asymptomatic Bacteriuria among Pregnant Women in Addis Ababa, Ethiopia: Prevalence, Causal Agents, and Their Antimicrobial Susceptibility. *International Journal of Microbiology*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8418043>
- Blanco, V. M., Maya, J. J., Correa, A., Perenguez, M., Muñoz, J. S., Motoa, G., Pallares, C. J., Rosso, F., Matta, L., Celis, Y., Garzon, M., & Villegas, M. V. ((Müller et al., 2016)). Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(9), 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.11.017>
- Bonkat, G., Bartoletti, R., Bruyère, F., Cai, T., Geerlings, S., Köves, B., Schubert, S., Pilatz, A., Veeratterapillay, R., & Wagenlehner, F. (2023). EAU Guidelines on Urological Infections. *EAU*, 12(2), 68–74. <https://doi.org/10.22141/2307-1257.12.2.2023.401>
- Boquet, P. (2001). The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon*, 39(11), 1673–1680. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00154-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00154-4)
- Bunduki, G. K., Heinz, E., Phiri, V. S., Noah, P., Feasey, N., & Musaya, J. (2021). Virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from urinary tract infections: a systematic review and meta-

- analysis. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1186/s12879-021-06435-7>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Calderón-Jaimes, E., Casanova-Román, G., Galindo-Fraga, A., Gutiérrez-Escoto, P., Landa-Juárez, S., Moreno-Espinosa, S., Rodríguez-Covarrubias, F., Simón-Pereira, L., & Valdez-Vázquez, R. (2013). Diagnosis and treatment of urinary tract infections: A multidisciplinary approach for uncomplicated cases. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de Mexico*, 70(1), 3–10.
- Calhau, V., Domingues, S., Ribeiro, G., Mendonça, N., & Da Silva, G. J. (2015). Interplay between pathogenicity island carriage, resistance profile and plasmid acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 64(8), 828–835. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000104>
- Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (2003). The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 1(1), 17–24.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro732>
- Cavaliere, S. J., Bohach, G. A., & Snyder, I. S. (1984). *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiological Reviews*, 48(4), 326–343. <https://doi.org/10.1128/mr.48.4.326-343.1984>
- Chahales, P., & Thanassi, D. G. (2015). Structure, Function, and Assembly of Adhesive Organelles by Uropathogenic Bacteria. *Microbiology Spectrum*, 3(5), 1–39. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0018-2013>
- Chávez-Valencia, V., Gallegos-Nava, S., & Arce-Salinas, C. A. (2010). Patrones de resistencia antimicrobiana y etiología en infecciones urinarias no complicadas. *Gaceta Médica de Mexico*, 146(4), 269–273.
- Christie, P. J., Whitaker, N., & González-Rivera, C. (2014). Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochimica et Biophysica Acta* -

Molecular Cell Research, 1843(8), 1578–1591.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.019>

- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Clermont, O., Dixit, O. V. A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., & Gordon, D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental Microbiology*, 21(8), 3107–3117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>
- Colello, R., Krüger, A., Velez, M. V., Del Canto, F., Etcheverría, A. I., Vidal, R., & Padola, N. L. (2019). Identification and detection of iha subtypes in LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from humans, cattle and food. *Heliyon*, 5(12), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03015>
- Corbin, B. D., Seeley, E. H., Raab, A., Feldmann, J., Miller, M. R., Torres, V. J., Anderson, K. L., Dattilo, B. M., Dunman, P. M., Gerads, R., Caprioli, R. M., Nacken, W., Chazin, W. J., & Skaar, E. P. (2008). Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*, 319(5865), 962–965. <https://doi.org/10.1126/science.1152449>
- Cortajarena, A. L., Goñi, F. M., & Ostolaza, H. (2001). Glycophorin as a Receptor for *Escherichia coli* α -Hemolysin in Erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12513–12519. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006792200>
- Cortés Enríquez, O. D., & Torres González, J. H. (2022). Prevalencia, factores de riesgo y tratamiento de la infección de vías urinarias en mujeres embarazadas. *RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición*, 21(4), 1–11. <https://doi.org/10.29105/respyn21.4-684>
- Czaja, C. A., Scholes, D., Hooton, T. M., & Stamm, W. E. (2007). Population-based

- epidemiologic analysis of acute pyelonephritis. *Clinical Infectious Diseases*, 45(3), 273–280. <https://doi.org/10.1086/519268>
- Dautin, N. (2010). Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs): Biogenesis and function. *Toxins*, 2(6), 1179–1206. <https://doi.org/10.3390/toxins2061179>
- De Lorenzo, V., & Neilands, J. B. (1986). Characterization of iucA and iucC genes of the aerobactin system of plasmid ColV-K30 in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 167(1), 350–355. <https://doi.org/10.1128/jb.167.1.350-355.1986>
- Diagn, P., Cl, N., Cistitis, N., Pielonefritis, P., & Tratamiento, M. (n.d.). *al día*. 97–118.
- DGE. (2023). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. *El Boletín Epidemiológico*, 40, 47. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/809087/sem09.pdf>
- Díaz, J. M., Dozois, C. M., Avelar-González, F. J., Hernández-Cuellar, E., Pokharel, P., de Santiago, A. S., & Guerrero-Barrera, A. L. (2020). The Vacuolating Autotransporter Toxin (Vat) of Escherichia coli Causes Cell Cytoskeleton Changes and Produces Non-lysosomal Vacuole Formation in Bladder Epithelial Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00299>
- Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M., Svanborg, C., Gottschalk, G., Karch, H., & Hacker, J. (2003). Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal Escherichia coli isolates by use of DNA arrays. *Journal of Bacteriology*, 185(6), 1831–1840. <https://doi.org/10.1128/JB.185.6.1831-1840.2003>
- Dutta, P. R., Cappello, R., Navarro-García, F., & Nataro, J. P. (2002). Functional comparison of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. *Infection and Immunity*, 70(12), 7105–7113. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.7105-7113.2002>

- Ejrnæs, K., Stegger, M., Reisner, A., Ferry, S., Monsen, T., Holm, S. E., Lundgren, B., & Frimodt-Møller, N. (2011). Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections: Phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. *Virulence*, 2(6), 528–537. <https://doi.org/10.4161/viru.2.6.18189>
- F. Orskov & I. Orsko. (1992). *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. [Canadian science publishing](https://cdnsciencepub.com). <https://cdnsciencepub.com>
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420(6916), 629–635. <https://doi.org/10.1038/nature01148>
- Fabbri, A., & Bracci. (2022). Immunomodulatory properties of CNF1 toxin from *E. coli*: implications for colorectal carcinogenesis. *Am J Cancer Res.*, 12(2), 651–660.
- 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. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182016000400009>
- Finlay, B. B., & Falkow, S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiological Reviews*, 53(2), 210–230. <https://doi.org/10.1128/membr.53.2.210-230.1989>
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 269–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, Chardin P, Paris S, Fiorentini C and Boquet P. (1997). Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature*; 387: 729-733
- Foxman, B. (2014). Urinary tract infection syndromes. Occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infectious Disease Clinics of*

North America, 28(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.003>

Foxman, B., & Brown, P. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: Transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infectious Disease Clinics of North America*, 17(2), 227–241. [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(03\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(03)00005-9)

Fratamico, P. M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D. S., Baranzoni, G. M., & Feng, P. (2016). Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00644>

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>

Garcia, T. A., Ventura, C. L., Smith, M. A., Merrell, D. S., & O'Brien, A. D. (2013). Cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli* elicit different host responses in the murine bladder. *Infection and Immunity*, 81(1), 99–109. <https://doi.org/10.1128/IAI.00605-12>

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>

Garcillán-Barcia, M. Pilar, Ruiz del Castillo, B., Alvarado, A., de la Cruz, F., & Martínez-Martínez, L. (2015). Degenerate primer MOB typing of multiresistant clinical isolates of *E. coli* uncovers new plasmid backbones. *Plasmid*, 77, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2014.11.003>

Geerlings, S. E. (2016). Clinical Presentations and Epidemiology of Urinary Tract Infections. *Microbiology Spectrum*, 4(5), 27–40. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0002-2012> Goessweiner-Mohr, N., Arends, K., Keller, W., & Grohmann, E. (2013). Conjugative type IV secretion

- systems in Gram-positive bacteria. *Plasmid*, 70(3), 289–302.
<https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.09.005>
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3–30.
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Gómez, J., García Vázquez, E., & Ruiz Gómez, J. (2008). Significación clínica de las resistencias bacterianas: Una perspectiva histórica (1982-2007). *Revista Espanola de Quimioterapia*, 21(2), 115–122.
- Griebeling, T. L. (2005). Urologic diseases in America project: Trends in resource use for urinary tract infections in men. *Journal of Urology*, 173(4), 1288–1294.
<https://doi.org/10.1097/01.ju.0000155595.98120.8e>
- Grohmann, E., Muth, G., & Espinosa, M. (2003). Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(2), 277–301. <https://doi.org/10.1128/mnbr.67.2.277-301.2003>
- Guajardo-Lara, C. E., González-Martínez, P. M., & Ayala-Gaytán, J. J. (2009). Resistencia antimicrobiana en la infección urinaria por *Escherichia coli* adquirida en la comunidad. ¿Cuál antibiótico voy a usar? *Salud Publica de Mexico*, 51(2), 157–161. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000200012>
- Gücük, A., Burgu, B., Gökçe, I., Mermerkaya, M., & Soygür, T. (2013). Do antibiotic prophylaxis and/or circumcision change periurethral uropathogen colonization and urinary tract infection rates in boys with VUR? *Journal of Pediatric Urology*, 9(6 PART B), 1131–1136. <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2013.04.014>
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathogens*, 7(7), 1–9.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>
- Gupta, K., Hooton, T. M., Naber, K. G., Wullt, B., Colgan, R., Miller, L. G., Moran, G.

- J., Nicolle, L. E., Raz, R., Schaeffer, A. J., & Soper, D. E. (2011). International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*, *52*(5), 103–120. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq257>
- Guyer, D. M., Henderson, I. R., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2000). Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *38*(1), 53–66. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02110.x>
- Guzmán, N., & García-Perdomo, H. A. (2020). Novelties in the diagnosis and treatment of urinary tract infection in adults. *Revista Mexicana de Urología*, *80*(1), 1–14.
- Haley, K. P., & Skaar, E. P. (2013). *acquisition*. *14*(3), 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.11.001.A>
- Hasan, R. N., Jasim, S. A., & Ali, Y. H. (2022). Detection of fimH, kpsMTII, hlyA, and traT genes in *Escherichia coli* isolated from Iraqi patients with cystitis. *Gene Reports*, *26*(December 2021), 101468. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101468>
- Hernández-Vergara, J. A., Martínez-Santos, V. I., Radilla-Vázquez, R. B., Silva-Sánchez, J., Vences-Velásquez, A., & Castro-Alarcón, N. (2016). Characterization of *Escherichia coli* clinical isolates causing urinary tract infections in the community of Chilpancingo, Mexico. *International Microbiology*, *19*(4), 209–215. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.279>
- Herrera-Vázquez, A., Arellano-Aranda, R., Hernández-Cueto, D., Rodríguez-Miranda, E., López-Briones, S., & Hernández-Luna, M. A. (2023). Detection of Cyclomodulin CNF-1 Toxin-Producing Strains of *Escherichia coli* in Pig Kidneys at a Slaughterhouse. *Microorganisms*, *11*(8), 1–11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082065>
- Horne, J. E., Brockwell, D. J., & Radford, S. E. (2020). Role of the lipid bilayer in

outer membrane protein folding in Gram-negative bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 295(30), 10340–10367. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.011473>

Herold, S., Paton, J. C., Srimanote, P., & Paton, A. W. (2009). Differential effects of short-chain fatty acids and iron on expression of iha in Shiga-toxicogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 155(11), 3554–3563. <https://doi.org/10.1099/mic.0.029454-0>

Huelgas, D. (2020) Clasificación filogenética, virulencia y resistencia antimicrobiana de *E. coli* aislada de varones con infección de tracto urinario. (Tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla). <https://repositorioinstitucional.buap.mx/server/api/core/bitstreams/f1017167-ed42-4db0-a347-2ac544410fb7/content>

Infecciones urinarias. *Pediatría Atención Primaria*, 15, 71–80. <https://doi.org/10.4321/s1139-76322013000300008>

Islam, M. J., Bagale, K., John, P. P., Kurtz, Z., & Kulkarni, R. (2022). Glycosuria Alters Uropathogenic *Escherichia coli* Global Gene Expression and Virulence. *MSphere*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/msphere.00004-22>

Javed, S. Mirani, Z. & Z. A. P. (2019). Horizontal transfer of bla TEM , bla CTX-M and class 1 integron genes from uropathogenic *Escherichia coli* to *E. coli* DH5 α . *Int.j.Pathol.*, 17(4), 151–155.

Jiménez Cruz, J. F., Broseta, E., & Gobernado, M. (2002). Infección urinaria. *Actas Urológicas Españolas*, 26(8), 563–573. [https://doi.org/10.1016/S0210-4806\(02\)72829-5](https://doi.org/10.1016/S0210-4806(02)72829-5)

Johnson, J. R., Clermont, O., Menard, M., Kuskowski, M. A., Picard, B., & Denamur, E. (2006). Experimental mouse lethality of *Escherichia coli* isolates, in relation to accessory traits, phylogenetic group, and ecological source. *Journal of Infectious Diseases*, 194(8), 1141–1150. <https://doi.org/10.1086/507305>

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

- Kim, K. J., Chung, J. W., & Kim, K. S. (2005). 67-kDa laminin receptor promotes internalization of cytotoxic necrotizing factor 1-expressing *Escherichia coli* K1 into human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 1360–1368. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410176200>
- Köhler, C. D., & Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology*, 301(8), 642–647. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.006>
- Komano, T., Yoshida, T., Narahara, K., & Furuya, N. (2000). The transfer region of IncI1 plasmid R64: Similarities between R64 tra and *Legionella* icm/dot genes. *Molecular Microbiology*, 35(6), 1348–1359. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01769.x>
- Kong, H. K., Pan, Q., Lo, W. U., Liu, X., Law, C. O. K., Chan, T. fung, Ho, P. L., & Lau, T. C. K. (2018). Fine-tuning carbapenem resistance by reducing porin permeability of bacteria activated in the selection process of conjugation. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33568-8>
- Koraimann, G., & Wagner, M. A. (2014). Social behavior and decision making in bacterial conjugation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(APR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00054>
- Kot, B. (2019). Antibiotic Resistance among Uropathogenic *Escherichia coli*. *Polish Journal of Microbiology*, 68(4), 403–415. <https://doi.org/10.33073/PJM-2019-048>
- Krcmery, S., Hromec, J., & Demesova, D. (2001). Treatment of lower urinary tract infection in pregnancy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(4), 279–282. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00351-4](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00351-4)
- Kudinha, T., Johnson, J. R., Andrew, S. D., Kong, F., Anderson, P., & Gilbert, G. L. (2013). *Escherichia coli* sequence type 131 as a prominent cause of antibiotic resistance among urinary *Escherichia coli* isolates from reproductive-age

women. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3270–3276.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01315-13>

Kuznetsova, M. V., Maslennikova, I. L., Pospelova, J. S., Žgur Bertok, D., & Starčič Erjavec, M. (2022). Differences in recipient ability of uropathogenic *Escherichia coli* strains in relation with their pathogenic potential. *Infection, Genetics and Evolution*, 97. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105160>

Lally, E. T., Kieba, I. R., Sato, A., Green, C. L., Rosenbloom, J., Korostoff, J., Wang, J. F., Shenker, B. J., Ortlepp, S., Robinson, M. K., & Billings, P. C. (1997). RTX toxins recognize a $\beta 2$ integrin on the surface of human target cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(48), 30463–20469.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.48.30463>

Léveillé, S., Caza, M., Johnson, J. R., Clabots, C., Sabri, M., & Dozois, C. M. (2006). Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor. *Infection and Immunity*, 74(6), 3427–3436.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00107-06>

Lichtenberger P, Hooton TM. Complicated urinary tract infections. *Curr Infect Dis Rep*. 2008 Nov;10(6):499-504. doi: 10.1007/s11908-008-0081-0. PMID: 18945392.

Llosa, M., & De La Cruz, F. (2005). Bacterial conjugation: A potential tool for genomic engineering. *Research in Microbiology*, 156(1), 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.07.008>

Lombardo, E. (2018). Abordaje pediátrico de las infecciones de vías urinarias. *Acta Pediátrica de México*, 39(1), 85–90.

Luna-Pineda, V. M., Ochoa, S., Cruz-Córdova, A., Cázares-Domínguez, V., Vélez-González, F., Hernández-Castro, R., & Xicohtencatl-Cortes, J. (2018). Infecciones del tracto urinario, inmunidad y vacunación. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de Mexico*, 75(2), 67–78.
<https://doi.org/10.24875/BMHIM.M18000011>

- Lopatkin, A. J., Huang, S., Smith, R. P., Srimani, J. K., Sysoeva, T. A., Bewick, S., Karig, D. K., & You, L. (2016). Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics. *Nature Microbiology*, 1(6), 1–22. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.44>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Magrath, G. (1969). The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes* 62-1, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 92(2), 175–184. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(69\)90353-5](https://doi.org/10.1016/0304-4165(69)90353-5)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304416569903535>
 Abstract: A hydroxamic acid (aerobactin) is excreted by cultures of *Aerobacter aerogenes* 62-1 and related strains when growing in an iron
- Mainil, J. (2013). Author's personal copy Veterinary Immunology and Immunopathology *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152(1–2), 1–12. <https://click.endnote.com/viewer?doi=10.1016%2Fj.vetimm.2012.09.032&token=WzMxNjE1NjksljEwLjEwMTYvai52ZXRpbW0uMjAxMi4wOS4wMzliXQ.j0MyOFOQubK4ABTBnbZQCdQQkZI>
- Manning, P. A., Beutin, L., & Achtman, M. (1980). Outer membrane of *Escherichia coli*: properties of the F sex factor traT protein which is involved in surface exclusion. *Journal of Bacteriology*, 142(1), 285–294. <https://doi.org/10.1128/jb.142.1.285-294.1980>
- Maroncle, N. M., Sivick, K. E., Brady, R., Stokes, F. E., & Mobley, H. L. T. (2006).

- Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 74(11), 6124–6134. <https://doi.org/10.1128/IAI.01086-06>
- Martin, P., Marcq, I., Magistro, G., Penary, M., Garcie, C., Payros, D., Boury, M., Olier, M., Nougayrède, J. P., Audebert, M., Chalut, C., Schubert, S., & Oswald, E. (2013). Interplay between Siderophores and Colibactin Genotoxin Biosynthetic Pathways in *Escherichia coli*. *PLoS Pathogens*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003437>
- McLellan, L. K., & Hunstad, D. A. (2016). Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends in Molecular Medicine*, 22(11), 946–957. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.09.003>
- Medina, M., & Castillo-Pino, E. (2019). An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Therapeutic Advances in Urology*, 11, 3–7. <https://doi.org/10.1177/1756287219832172>
- Millán, Y., Araque, M., & Ramírez, A. (2020). Distribución de grupos filogenéticos, factores de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* uropatógena. *Revista Chilena de Infectología*, 37(2), 117–123. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182020000200117>
- Miko, A., Rivas, M., Bentancor, A., Delannoy, S., Fach, P., & Beutin, L. (2014). Emerging types of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O178 present in cattle, deer, and humans from Argentina and Germany. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(JUN), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00078>
- Miranda-Estrada, L. I., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J., Parra-Rojas, I., González-Villalobos, E., & Castro-Alarcón, N. (2017). Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(7), 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.021>
- Müller, A., Stephan, R., & Nüesch-Inderbinen, M. (2016). Distribution of virulence

factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Science of the Total Environment*, 541, 667–672. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.135>

Møller, T. S. B., Liu, G., Boysen, A., Thomsen, L. E., Lüthje, F. L., Mortensen, S., Møller-Jensen, J., & Olsen, J. E. (2017). Treatment with cefotaxime affects expression of conjugation associated proteins and conjugation transfer frequency of an IncI1 plasmid in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02365>

Müller, A., Stephan, R., & Nüesch-Inderbinnen, M. (2016). Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Science of the Total Environment*, 541, 667–672. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.135>

Muller, D., Hughes, C., & Goebel, W. (1983). Relationship between plasmid and chromosomal hemolysin determinants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 153(2), 846–851. <https://doi.org/10.1128/jb.153.2.846-851.1983>

Nataro JP, Kaper JB.1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11:<https://doi.org/10.1128/cmr.11.1.142>

Nichols, K. B., Totsika, M., Moriel, D. G., Lo, A. W., Yang, J., Worpel, D. J., Rossiter, A. E., Strugnell, R. A., Henderson, I. R., Ulett, G. C., Beatson, S. A., & Schembri, M. A. (2016). Molecular characterization of the vacuolating autotransporter toxin in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 198(10), 1487–1498. <https://doi.org/10.1128/JB.00791-15>

Nielubowicz, G. R., & Mobley, H. L. T. (2010). Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*, 7(8), 430–441. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.101>

Norman, A., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids: Vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1527), 2275–2289. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0037>

- Nougayrède, J. P., Fernandes, P. J., & Donnenberg, M. S. (2003). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cellular Microbiology*, *5*(6), 359–372. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00281.x>
- Obisesan, A. O., Zygiel, E. M., & Nolan, E. M. (2021). Bacterial Responses to Iron Withholding by Calprotectin. *Biochemistry*, *60*(45), 3337–3346. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00572>
- Onu, F. A., Ajah, L. O., Ezeonu, P. O., Umeora, O. U. J., Ibekwe, P. C., & Ajah, M. I. (2015). Profile and microbiological isolates of asymptomatic bacteriuria among pregnant women in Abakaliki, Nigeria. *Infection and Drug Resistance*, *8*, 231–235. <https://doi.org/10.2147/IDR.S87052>
- Öztürk, R., & Murt, A. (2020). Epidemiology of urological infections: a global burden. *World Journal of Urology*, *38*(11), 2669–2679. <https://doi.org/10.1007/s00345-019-03071-4>
- Panicker, M. M., & Minkley, E. G. (1985). DNA transfer occurs during a cell surface contact stage of F sex factor-mediated bacterial conjugation. *Journal of Bacteriology*, *162*(2), 584–590. <https://doi.org/10.1128/jb.162.2.584-590.1985>
- Parker, K. S., Wilson, J. D., Marschall, J., Mucha, P. J., & Henderson, J. P. (2016). Network Analysis Reveals Sex- and Antibiotic Resistance-Associated Antivirulence Targets in Clinical Uropathogens. *ACS Infectious Diseases*, *1*(11), 523–532. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00022>
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Ageorges, V., Monteiro, R., Leroy, S., Burgess, C. M., Pizza, M., Chaucheyras-Durand, F., & Desvaux, M. (2020). Molecular determinants of surface colonisation in diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC): From bacterial adhesion to biofilm formation. *FEMS Microbiology Reviews*, *44*(3), 314–350. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa008>
- Pérez-Etayo, L., González, D., & Vitas, A. I. (2020). The aquatic ecosystem, a good environment for the horizontal transfer of antimicrobial resistance and virulence-

associated factors among extended spectrum β -lactamases producing e. Coli. *Microorganisms*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040568>

Piñeiro Pérez, R., Cilleruelo Ortega, M. J., Ares Álvarez, J., Baquero-Artigao, F., Silva Rico, J. C., Velasco Zúñiga, R., Martínez Campos, L., Carazo Gallego, B., Conejo Fernández, A. J., Calvo, C., Alfayate Miguélez, S., Berghezán Suárez, A., García Vera, C., José García García, J., Herreros, M., & Rodrigo Gonzalo de Liria, C. (2019). Recommendations on the diagnosis and treatment of urinary tract infection. *Anales de Pediatría*, 90(6), 400.e1-400.e9. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2019.02.009>

Piteau, M., Papatheodorou, P., Schwan, C., Schlosser, A., Aktories, K., & Schmidt, G. (2014). Lu/BCAM Adhesion Glycoprotein Is a Receptor for Escherichia coli Cytotoxic Necrotizing Factor 1 (CNF1). *PLoS Pathogens*, 10(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003884>

Qin, X., Hu, F., Wu, S., Ye, X., Zhu, D., Zhang, Y., & Wang, M. (2013). Comparison of Adhesin Genes and Antimicrobial Susceptibilities between Uropathogenic and Intestinal Commensal Escherichia coli Strains. *PLoS ONE*, 8(4), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061169>

Qingqing., G., X., W., H., X., Y., X., J., L., D., Z., & S., G. (2012). Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic Escherichia coli: Salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. *BMC Microbiology*, 12, no pagination. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed14&NEWS=N&AN=366062436>

Raeispour, M. & Ranjbar, R. (2018). Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic Escherichia coli strains. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* (2018) 7:118. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0411-4>

Ramírez-Castillo, F. Y., Moreno-Flores, A. C., Avelar-González, F. J., Márquez-Díaz, F., Harel, J., & Guerrero-Barrera, A. L. (2018). An evaluation of multidrug-

- resistant *Escherichia coli* isolates in urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico: Cross-sectional study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0286-5>
- Ramírez, F., Exeni, A., Alconcher, L., Coccia, P., García Chervo, L., Suarez, Á., Martina, S., William Schnaper, H., Kopp, J. B., Barisoni, L., Lococo, B. J., Alberton, V., & Fazzini Ana Malvar, B. (2022). ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA Órgano oficial de la Asociación Latinoamericana de Nefrología Pediátrica Miembro de la INTERNATIONAL PEDIATRIC NEPHROLOGY ASSOCIATION (IPNA) A CLASSIFICATION FOR PRIMARY PODOCYTE DISORDERS.
- Renko, M., Tapanainen, P., Tossavainen, P., Pokka, T., & Uhari, M. (2011). Meta-analysis of the significance of asymptomatic bacteriuria in diabetes. *Diabetes Care*, 34(1), 230–235. <https://doi.org/10.2337/dc10-0421>
- Rijavec, M., Erjavec, M. S., Avguštin, J. A., Reissbrodt, R., Fruth, A., Križan-Hergouth, V., & Žgur-Bertok, D. (2006). High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. *Current Microbiology*, 53(2), 158–162. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0501-4>
- Rizvi, M., Khan, F., Shukla, I., & Malik, A. (2011). Rising Prevalence of Antimicrobial Resistance in Urinary Tract Infections During Pregnancy: Necessity for Exploring Newer Treatment Options. *Journal of Laboratory Physicians*, 3(02), 098–103. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.86842>
- Robinson, A. E., Heffernan, J. R., & Henderson, J. P. (2018). The iron hand of uropathogenic *Escherichia coli*: The role of transition metal control in virulence. *Future Microbiology*, 13(7), 813–829. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0295>
- Romero-Nava, L.-E., LópezdeÁvalos, D.-R., & Quiroz-Garza, G. (2009). *Infección Recurrente De Las Vías Urinarias En La Mujer*. 415–435. [http://www.comego.org.mx/GPC_TextoCompleto/18-Infección recurrente de las vías urinarias en la mujer.pdf](http://www.comego.org.mx/GPC_TextoCompleto/18-Infección%20recurrente%20de%20las%20vías%20urinarias%20en%20la%20mujer.pdf)

- Rozo, C., & Dussán, J. (2010). Análisis de transferencia horizontal de genes en ensayos de biorremediación con grasas recalcitrantes Analysing horizontal gene transfer in bioremediation trials using recalcitrant grease. *Rev. Colomb. Biotecnol*, *XII*(1), 22–31. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v12n1/v12n1a03.pdf>
- Ruiz-Perez, F., & Nataro, J. P. (2014). Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: Classification, specificity, and role in virulence. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(5), 745–770. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1355-8>
- Sadeghi, A., Halaji, M., Fayyazi, A., & Havaei, S. A. (2020). Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance and Serogroup Distributions of Uropathogenic Escherichia coli among Iranian Kidney Transplant Patients. *BioMed Research International*, *2020*(topoisomerase II). <https://doi.org/10.1155/2020/2850183>
- Saima Javed, Zulfiqar Ali Mirani, Z. A. P. (2019). Horizontal transfer of bla TEM , bla CTX-M and class 1 integron genes from uropathogenic Escherichia coli to E . coli DH5 α . *Int.j.Pathol.*, *17*(4), 151–155.
- 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), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>
- Servin, A. L. (2014). Pathogenesis of human diffusely adhering Escherichia coli expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Current insights and future challenges. *Clinical Microbiology Reviews*, *27*(4), 823–869. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-14>
- Shafiq, M., Bilal, H., Permana, B., Xu, D., Cai, G., Li, X., Zeng, M., Yuan, Y., Jiao, X., & Yao, F. (2023). Characterization of antibiotic resistance genes and mobile elements in extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli strains isolated from hospitalized patients in Guangdong, China. *Journal of Applied*

- Microbiology*, 134(7), 1–12. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad125>
- Sheerin, N. S., & Glover, E. K. (2019). Urinary tract infection. *Medicine (United Kingdom)*, 47(9), 546–550. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.06.008>
- Schaible, U. E., & Kaufmann, S. H. E. (2004). Iron and microbial infection. *Nature Reviews Microbiology*, 2(12), 946–953. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1046>
- Schappert, S. M., & Rechtsteiner, E. A. (2011). Ambulatory medical care utilization estimates for 2007. *Vital and Health Statistics. Series 13, Data from the National Health Survey*, 169, 1–38.
- 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>
- Schwan, W. R., Flohr, N. L., Multerer, A. R., & Starkey, J. C. (2020). GadE regulates fliC gene transcription and motility in Escherichia coli . *World Journal of Clinical Infectious Diseases*, 10(1), 14–23. <https://doi.org/10.5495/wjcid.v10.i1.14>
- Shafiq, M., Bilal, H., Permana, B., Xu, D., Cai, G., Li, X., Zeng, M., Yuan, Y., Jiao, X., & Yao, F. (2023). Characterization of antibiotic resistance genes and mobile elements in extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli strains isolated from hospitalized patients in Guangdong, China. *Journal of Applied Microbiology*, 134(7), 1–12. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad125>
- Singh, P. K., & Meijer, W. J. J. (2014). Diverse regulatory circuits for transfer of conjugative elements. *FEMS Microbiology Letters*, 358(2), 119–128. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12526>
- Simões e Silva, A. C., & Oliveira, E. A. (2015). Atualização da abordagem de infecção do trato urinário na infância. *Jornal de Pediatria*, 91(6), S2–S10. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2015.05.003>
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 434–452. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00020-10>

- Suhartono, S., & Savin, M. (2016). Conjugative transmission of antibiotic-resistance from stream water *Escherichia coli* as related to number of sulfamethoxazole but not class 1 and 2 integrase genes . *Mobile Genetic Elements*, 6(6), e1256851. <https://doi.org/10.1080/2159256x.2016.1256851>
- Suzuki, K., Tanabe, T., Moon, Y. H., Funahashi, T., Nakao, H., Narimatsu, S., & Yamamoto, S. (2006). Identification and transcriptional organization of aerobactin transport and biosynthesis cluster genes of *Vibrio hollisae*. *Research in Microbiology*, 157(8), 730–740. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.05.001>
- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: Virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>
- Tolosa, L., Giménez, R., Fábrega, M. J., Alvarez, C. S., Aguilera, L., Cañas, M. A., Martín-Venegas, R., Badia, J., & Baldomà, L. (2015). The secreted autotransporter toxin (Sat) does not act as a virulence factor in the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *BMC Microbiology*, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0591-5>
- 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), 1–33. <https://doi.org/10.3390/genes11111239>
- Vivas, A., Trujillo, P., Garcia, G., & OSPINA, M. (2011). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=261122529005>. *Revista CES Medicina*, 25, 169–179. <http://www.redalyc.org/pdf/2611/261122529005.pdf>
- Wagenlehner, F. M. E., Pilatz, A., & Weidner, W. (2011). Urosepsis - From the view of the urologist. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(SUPPL.), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.007>
- Walaa, A., Ebaa, F., Mohamed, H., & Ahmed, G. (2019). Molecular characterization and identification of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Research Journal of Biotechnology*, 14(3), 21–30.

- Wandersman, C. (1993). The general secretory pathway in bacteria. *Trends in Microbiology*, 1(7), 249–250. [https://doi.org/10.1016/0966-842X\(93\)90043-Q](https://doi.org/10.1016/0966-842X(93)90043-Q)
- Wang, J., Stephan, R., Karczmarczyk, M., Yan, Q., Hächler, H., & Fanning, S. (2013). Molecular characterization of blaESBL-harboring conjugative plasmids identified in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from food-producing animals and healthy humans. *Frontiers in Microbiology*, 4(JUL), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00188>
- Weinberg, E.D. (1978). Iron and infection. *Microbiol Rev*42.<https://doi.org/10.1128/mr.42.1.45-66.1978>
- Welch, R. A. (1991). Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology*, 5(3), 521–528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00723.x>
- Williams, P. H., & Carbonetti, N. H. (1986). Iron, siderophores, and the pursuit of virulence: Independence of the aerobactin and enterochelin iron uptake systems in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 51(3), 942–947. <https://doi.org/10.1128/iai.51.3.942-947.1986>
- Wurgaft. (2010). *INFECCIONES*. 21(4), 629–633.
- Yan, F., & Polk, D. B. (2004). Commensal bacteria in the gut: learning who our friend are. *Current Opinion in Gastroenterology*, 20(2), 565–571. <https://doi.org/10.1097/00001574-200411000-00011>
- Yi, H., Cho, Y. J., Yong, D., & Chun, J. (2012). Genome sequence of *Escherichia coli* J53, a reference strain for genetic studies. *Journal of Bacteriology*, 194(14), 3742–3743. <https://doi.org/10.1128/JB.00641-12>
- Zaja, C. A., Scholes, D., Hooton, T. M., & Stamm, W. E. (2007). Population-based epidemiologic analysis of acute pyelonephritis. *Clinical Infectious Diseases*, 45(3), 273–280. <https://doi.org/10.1086/519268>
- Zangane Matin, F., Rezatofighi, S. E., Roayaei Ardakani, M., Akhoond, M. R., & Mahmoodi, F. (2021). Virulence characterization and clonal analysis of

uropathogenic *Escherichia coli* metallo-beta-lactamase-producing isolates. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00457-4>

Zilberberg MD, Nathanson BH, Sulham K, Shorr A F. 2020. Susceptibilidad antimicrobiana y patrones de resistencia cruzada entre las infecciones comunes del tracto urinario complicado en hospitales de EE. UU., 2013 a 2018. *Agentes antimicrobianos Chemother* 64:10.1128/aac.00346-20. <https://doi.org/10.1128/aac.00346-20>

Zorc, J. J., Levine, D. A., Platt, S. L., Dayan, P. S., Macias, C. G., Krief, W., Schor, J., Bank, D., Shaw, K. N., & Kuppermann, N. (2005). Clinical and demographic factors associated with urinary tract infection in young febrile infants. *Pediatrics*, 116(3), 644–648. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1825>

Zúñiga MM; López HK, V. H. (2019). Prevalencia de infecciones de vías urinarias en el embarazo y factores asociados. *ISSN (28 de Abril de 2020)*, 47–55. https://www.redalyc.org/jatsRepo/674/67459697006/html/index.html?fbclid=IwAR3pJkPmjkvLUAOBEvT7IJ_7VcMm6wNAV9LeNSD6CEb-0y3OA1F7H1WDI