



Benemerita Universidad Autónoma de Puebla



Facultad de Ciencias Químicas



"Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Escherichia coli* aisladas de infecciones del tracto Urinario"

**Tesis para obtener el título de
Químico farmacobiólogo**

**Presenta
p.Q.F.B. Dayanira Martínez Cruz**

Directora de Tesis:

**D. C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández
Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla**

Asesor interno de Tesis:

M. C. Patricia Guadalupe Suárez Albores

JULIO 2017

AGRADECIMIENTOS:

- Al laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (ICUAP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, lugar en el que se desarrolló este proyecto.
- A la Dra. Margarita María de la Paz Arenas Hernández por abrirme las puertas del laboratorio, por brindarme sus consejos, y su apoyo incondicional durante la realización de este proyecto y por creer en mí hasta el último momento.
- A mis padres por todo el apoyo que me han brindado, porque sin ellos esto no hubiese sido posible, especialmente a mi madre por ser mi pilar y mi mayor apoyo durante esta travesía.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	9
Resumen.....	11
Introducción.....	12
Marco teórico.....	16
Marco de referencia.....	34
Antecedentes directos.....	38
Planteamiento del problema.....	40
Justificación.....	41
Hipótesis.....	41
Objetivos de la investigación.....	42
Objetivo General.....	42
Objetivo específico.....	42
Diseño del estudio.....	43
Esquema de trabajo.....	45
Material y métodos.....	46
Resultados	54
Discusión.....	86
Conclusión.....	96
Bibliografía.....	98
Anexos.....	111
Anexo 1. Características de las 95 cepas de Escherichia coli aisladas de ITU.....	111
Anexo 2. Esquemas de trabajo	113

Anexo 3. Condiciones y reactivos para los PCR's mutiples e individual..115

Anexo 4. Tabla de serogrupos asociados a subgrupos de patotipos ExPEC de *E. coli* 95 cepas de *E. coli* aisladas a partir de infección en vías urinarias.....116

Anexo 5. Tabla de resistotipos de 95 cepas de UPEC..... 119

Anexo 6. Tabla de reasignación de grupo filogenético para cepas de *E. coli* aisladas a partir de infección en vías urinarias.....121

Anexo 7. Resultados de filogenia, serotipo, subgrupo de patotipos de *E. coli*, factores de virulencia, resistencia y sensibilidad, y bandas plasmídicas de 95 cepas de *E. coli* aisladas a partir de infección en vías urinarias.....123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de infección de vías urinarias por localización anatómica...	13
Figura 2. Etiología y factores de riesgo en infecciones urinarias, no complicadas y complicadas.....	14
Figura 3. Factores de virulencia y de adaptación de UPEC.....	20
Figura 4. Operón de fimbria tipo 1 de <i>E. coli</i>	21
Figura 5. Configuración proteica de fimbria tipo 1.....	22
Figura 6. Operón fimbria p o Pap.....	23
Figura 7. Configuración proteica de fimbria P.....	23
Figura 8. Toxinas asociadas a UPEC.....	25
Figura 9. Árbol dicotómico para interpretación del PCR múltiple y clasificación filogenética.....	50
Figura 10. Porcentaje de cepas de <i>E. coli</i> recuperadas de pacientes con ITU por el lugar de recolección.....	54
Figura 11. Distribución de serogrupos en una población de 95 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de ITU's.....	55
Figura 12. Resistencia de cepas de <i>E. coli</i> aisladas a partir de ITU a diferentes antibióticos.....	58
Figura 13. Porcentaje de cepas sensibles, no multidrogoresistentes, multidrogoresistentes y extremadamente resistentes.....	59
Figura 14. ADN genómico como templado de la reacción de PCR para la determinación de grupo filogenético y factores de virulencia.....	60
Figura 15. Determinación del grupo filogenético a cepas de <i>E. coli</i> por el método descrito por Clermont en 2000.....	62
Figura 16. Determinación de grupos filogenéticos C y E a cepas de <i>E. coli</i>	62
Figura 17. A) Distribución de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> aisladas a partir de ITU. B) Distribución de resistencia y susceptibilidad por grupo filogenético de cepas de <i>E. coli</i> aisladas a partir de ITU.....	64

Figura 18. Relación entre grupos filogenéticos y tipos de resistencia antibiótica de <i>E. coli</i> aisladas de ITU.....	65
Figura 19.A) Distribución de filogenia por lugar de procedencia. B) distribución de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> aisladas de ITU por lugar de procedencia y resistencia o susceptibilidad a antibióticos.....	67
Figura 20. Relación entre perfil de resistencia a 12 antibióticos (6 familias) y grupos filogenéticos de cepas <i>E. coli</i> aisladas de ITU.....	68
Figura 21. PCR individual para genes de virulencia: <i>iha</i> , <i>vatP</i> , <i>vatA</i> , <i>papA</i> , <i>papGI</i> , <i>papGII</i> y <i>papGIII</i>	69
Figura 22. Estandarización de PCR múltiple 2 para la determinación de factores de virulencia. A) A) Estandarización del PCRm para amplificar los genes de virulencia <i>iha</i> , <i>vatP</i> , <i>vatA</i> , <i>papA</i> , <i>papGI</i> , <i>papGII</i> y <i>papGIII</i> . B) B) Identificación de factores de virulencia en cepas UPEC O25.....	70
Figura 23. Estandarización de PCR múltiple 3 para la terminación de factores de virulencia. A) Estandarización del PCRm para <i>papA</i> , <i>satP</i> y <i>hlyA</i> . B) Fotografía correspondiente al gel de agarosa al 1.0% de los PCR individuales y el PCRm.....	71
Figura 24. Geles representativos de los productos de los diferentes PCR's con cepas de <i>E. coli</i> aisladas de ITU.....	73
Figura 25. Porcentaje de genes de virulencia en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de ITU...74	74
Figura 26. Porcentaje de factores de virulencia en 95 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de ITU.....	74
Figura 27. Relación entre grupo filogenético y factores de virulencia en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de ITU.....	76
Figura 28. Asociación entre filogenia-perfil de resistencia antibióticos-factores de virulencia.....	77
Figura 29. Resultado del corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.7% de extracción de plásmidos en cepas <i>E. coli</i> aisladas de ITU.....	78
Figura 30. Presencia de plásmidos <i>E. coli</i> aisladas de pacientes con ITU.....	79
Figura 31. Porcentaje de cepas de <i>E. coli</i> respecto a la presencia de bandas plasmídicas.....	80

Figura 32. Número de bandas plasmídicas por peso molecular en un total de 95 cepas de *E. coli* aisladas de ITU.....81

Figura 33. Número de bandas plasmídicas con respecto al grupo filogenético de cepas *E. coli* aisladas a partir de ITU.....82

Figura 34. Número de cepas con respecto al número de bandas plasmídicas, grupos filogenéticos y perfil de sensibilidad y resistencia de *E. coli* aisladas de ITU. A) filogrupo A, C y B1. B) Grupos B2, D, E y F.....83

Figura 35. Foto de corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.7% de extracción de plásmidos en medio LB sin y con AM de cepas *E. coli* aisladas de ITU.....85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas usadas como control en la clasificación filogenética de cepas de <i>E. coli</i>	46
Tabla 2. Características de cepas control de <i>E. coli</i> para la determinación de factores de virulencia.....	47
Tabla 3. Determinación del grupo filogenético de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de ITU.....	50
Tabla 4. Interpretación de PCR múltiple e individual y clasificación filogenética.....	51
Tabla 5. Condiciones y reactivos para los PCR´s individuales para la determinación de filogenético Clermont 2012.....	51
Tabla 6. Amplificados por PCR múltiple para la determinación de factores de virulencia en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de ITU.....	53
Tabla 7. Asociación del serogrupo de 95 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de ITU con los patotipos y sus categorías.....	56
Tabla 8. Resistotipos de <i>E. coli</i> aislada a partir de ITU con mayor resistencia a antibióticos.....	57
Tabla 9. Resistotipos más frecuentes de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de ITU.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
afa	Adhesina afimbrial
CNF	Factor citotóxico necrotizante
DAEC	<i>Escherichia coli</i> Difusoadherente
DEC	<i>Escherichia coli</i> Diarreagénica
ADN	Acido de desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EGO	Examen general de orina
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> causante de infecciones extraintestinales
Fim 1	Fimbria tipo 1
Fli	Proteína flagelar
FV	Factor de virulencia
Hly	Hemolisina
IL-8	Interleucina 8
ITU	Infección de tracto urinario
lucD	Aerobactina
KDa	Kilo Dalton
Kb	Kilo base
KpsMT II	Antígeno capsular del grupo II
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MDR	Multidrogo-resistente
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Mili-Molar
nm	Nanómetro
NO MDR	No multidrogo-resistente
NEMEC	<i>E. coli</i> asociada a meningitis
PAI	Isla de patogenicidad
Pap	Fimbria P o fimbria asociada a pielonefritis
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCRI	Reacción en Cadena de la Polimerasa Individual

PCRm	Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Sensible
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Sat	Toxina autotransportadora secretada
Seg	Segundos
SET	Sacarosa/EDTA/Tris
Sfa	Fimbria S
SPATE	Serin-proteasas de las enterobacterias
SINAVE	Sistema nacional de vigilancia epidemiológica
TRL4	Receptores Toll-like 4
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena
uL	Microlitro
Ug	Microgramo
Usp	Proteína específica uropatógena
Vat	Toxina autotransportadora vacuolizante
VTEC/STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga/Vero
XDR	Extremadamente resistente

RESUMEN

La infección de tracto urinario es considerada como la infección bacteriana más común adquirida en la población, siendo *Escherichia coli* el microorganismo implicado con mayor frecuencia (70-90% de los casos). *E. coli* se ha agrupado en siete grupos filogenéticos: A, C, B1 (que incluyen cepas comensales); B2, D, E, F (donde se ubican cepas patógenas). Dicha bacteria posee diversos factores de virulencia: factores implicados en adherencia y movilidad, mecanismos de evasión y supervivencia a la respuesta inmune, mecanismos de adquisición de nutrientes y toxinas. Por otra parte, *E. coli* cuenta con una gran variedad de plásmidos, incluyendo los asociados a factores de virulencia y a la resistencia a antibióticos.

El objetivo de este trabajo fue analizar las características fenotípicas y genotípicas de cepas de *Escherichia coli* uropatógena. Se estudiaron 95 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infección en vías urinarias con un perfil de sensibilidad antibiótica conocido. Se extrajo ADN genómico y se determinó el grupo filogenético y la presencia de factores de virulencia de *E. coli* uropatógena por el método de reacción en cadena de la polimerasa de manera individual y múltiple. La determinación del perfil plasmídico se realizó usando el método de lisis alcalina y electroforesis en geles de agarosa. Se analizó la relación entre el perfil antibiótico, los factores de virulencia, plásmidos y el filogrupo.

Se encontró que el 44.2% de las cepas de *E. coli* analizadas pertenecen al grupo filogenético B2, seguido de los grupos F (23.2%) y C (17.9%). Respecto al perfil de resistencia y susceptibilidad antibiótica el 46.3% de las cepas son multidrogo-resistentes, 32.6% no multidrogo-resistentes; y en menor proporción, cepas sensibles (14.7%) y extremadamente-resistentes (6.3%). Se determinó la presencia de 14 genes de virulencia, encontrando que los genes más frecuentes fueron el gen de la adhesina fimbrial (74.2%), el de aerobactina (72.6%) y la adhesina de superficie receptora de hierro, *lha* (53.7); y en menor frecuencia encontramos al gen que codifica para la adhesina flagelar (7.4%), el factor necrozante citotóxico (6.3) y dos genes que codifican para la fimbria P o Pap (3.2%). El 90% del cepario posee, al menos un plásmido, el número de bandas plasmídicas va de 1-13. En 59% de las cepas se observaron entre 1-4 bandas plasmídicas. Los pesos moleculares más frecuentes de las bandas plasmídicas oscilo entre bandas de 1kb a 3kb y bandas de >100 kb. Se seleccionó un grupo de 9 cepas resistentes a ampicilina y se analizó su perfil plasmídico en presencia y ausencia del antibiótico. Seis de las 9 cepas que crecieron en medio con antibiótico cambian su número de bandas plasmídicas de dos a tres bandas plasmídicas y éstas son de un tamaño de 3 kb a 5 kb.

Las investigaciones sobre *Escherichia coli* uropatógena nos va a permitir realizar un diagnóstico oportuno y mejorar el tratamiento en los casos de ITU's. Documentar acerca de cómo en una población mexicana, *Escherichia coli* del filogrupo B2 y F, representativo de las cepas UPEC, presentan un alto potencial patógeno y concentran el mayor número de cepas resistentes nos va a permitir hacer conciencia del alto riesgo que conlleva no solo el mal diagnóstico sino también el mal manejo de estas ITU's.

INTRODUCCIÓN

La infección de tracto urinario (ITU) es considerada como la infección humana más común, es de origen bacteriano en el 80%-90% de los casos; puede ser adquirida en la comunidad y anualmente se han reportado aproximadamente 150 millones de casos a nivel mundial (revisado en Echavarría, *et al.*, 2006). En México, las ITU son la tercera causa de morbilidad solo precedida por las infecciones respiratorias y gastrointestinales, cada año se diagnostican 5,589 nuevos casos de ITU. De acuerdo al reporte anual del sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) para el 2015 se reportaron 4, 098,042 casos de infecciones de tracto urinario afectando principalmente a la población femenina (3, 144,568 casos) de entre 22 a 44 años y en el caso de la población masculina (953,474 casos) afecta a mayores de 65 años (revisado en Páramo, *et al.*, 2015; SINAVE, ver en http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad_nacional.html).

La ITU implica la coexistencia de una estirpe de microorganismos en un número suficiente para causar, o no, síntomas clínicos (revisado en Rendón, *et al.*, 2012). La invasión del tracto urinario sano está restringida a un grupo de microorganismos conocidos como “uropatógenos”, procedentes en la mayoría de los casos de la microbiota intestinal; los cuales son capaces de sobrepasar y minimizar los mecanismos de defensa del hospedero (revisado en Pigrau, *et al.*, 2013).

Se ha clasificado a las ITU tomando en cuenta diversos parámetros: por la localización anatómica de la infección dividiéndola en: infecciones de vías urinarias bajas (uretritis, cistitis, prostatitis) e infecciones de vías urinarias altas (pielonefritis,

bacteriemia y septicemia) (Figura 1); por su complicación y la presencia de pielonefritis dividiéndolas en: infección no complicada de la vía inferior (cistitis), pielonefritis no complicada, ITU's complicadas con o sin pielonefritis, sepsis urinaria, uretritis y especiales (prostatitis, epididimitis y orquitis); por la duración del periodo de infección: si es aguda o crónica y por la sintomatología: sintomática o asintomática (revisado en Casellas, 2008; INFAC, 2011; Rendón *et al.*, 2012).

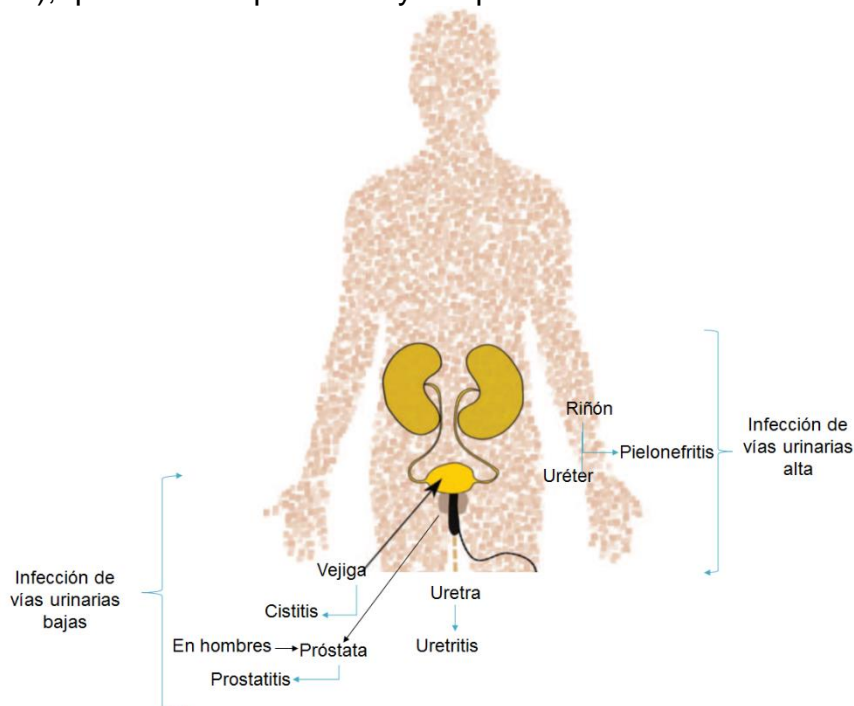


Figura 1. Clasificación de Infección de vías urinarias por localización anatómica. Tomado y modificado de Hiergeist and Gessner 2016.

La ITU afecta al 50% de las mujeres al menos una vez en su vida, presentándose de manera más común durante el embarazo; siendo rara en los hombres de 20 a 50 años, con una frecuencia de casos de 30:1 (mujer: hombre) respectivamente. La incidencia de estas infecciones, tanto en hombres como en mujeres, se ve modificada por factores como: edad, existencia de enfermedades base (diabetes, cáncer, VPH, etc.), maniobras instrumentales (como la cateterización urinaria) y trastornos anatómicos en vías urinarias (como por ejemplo malformaciones o procesos obstructivos) (revisado en Alós, 2005; Echavarría, *et al.*, 2006; Pigrau, *et al.*, 2013).

En cuanto a su etiología, más del 95% son monomicrobianas, existen varios agente etiológicos de ITU, siendo *Escherichia coli* el microorganismo implicado con mayor frecuencia en un rango de 75-90% de los casos (Figura 2) (revisado en Casellas, 2008).

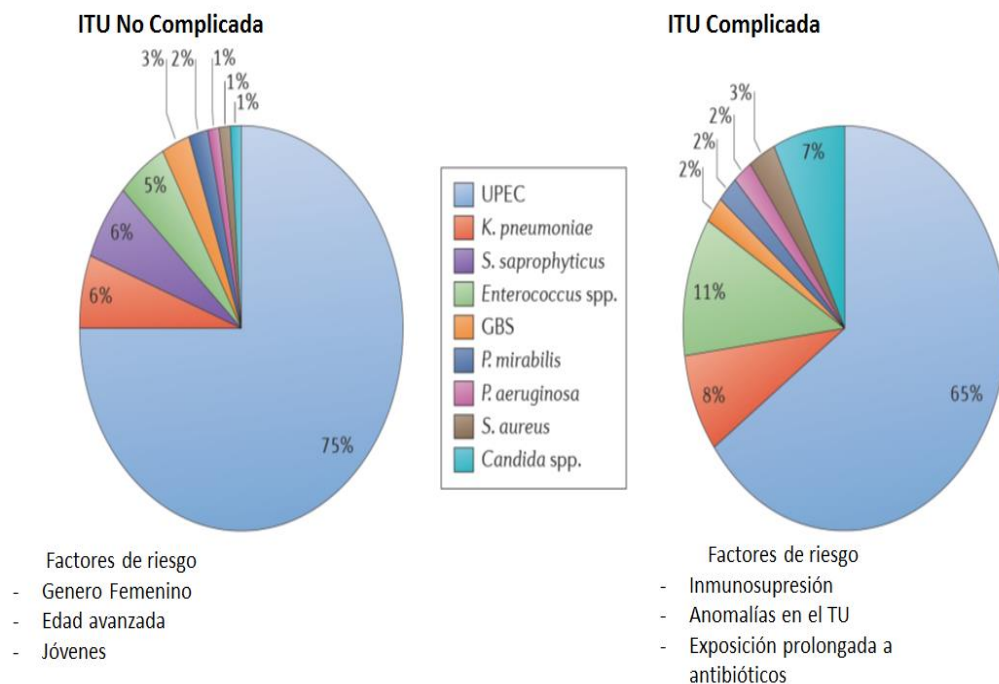


Figura 2. Etiología y factores de riesgo en infecciones urinarias, no complicadas y complicadas. Agentes causales más comunes en la infección urinaria, siendo el principal *Escherichia coli* uropatógena, y principales factores de riesgo tanto en ITU complicada como no complicada (Tomada y modificado de Flores Mireles *et. al.*, 2015).

El cuadro clínico de la ITU depende de la etapa de infección: si la infección se encuentra localizada en vías urinarias bajas (uretritis) los signos y síntomas característicos son presencia de secreción uretral, no hay fiebre, la cistitis o inflamación de vejiga provoca disuria y polaquiuria que representan una mayor incomodidad para el paciente, se añade el mal olor de la orina y, en algunos casos, hematuria. En la infección de vías urinarias altas se desarrolla un cuadro de fiebre asociada a inflamación, además se presenta un riesgo potencial de lesión renal,

otros síntomas son náuseas, vómito, dolor al orinar y polaquiuria (revisado en Torres, *et al.*, 2008).

Para el adecuado diagnóstico, el primer criterio debe basarse en las manifestaciones clínicas del paciente, seguido de un examen general de orina (EGO), y por último, para confirmar el diagnóstico e identificar la etiología de la infección se realiza un urocultivo.

El objetivo del tratamiento en la ITU es hacer desaparecer la sintomatología y erradicar la bacteria del tracto urinario (revisado en INFAC, 2011). El uso de antimicrobianos para el tratamiento de la ITU debe basarse en diferentes criterios. En primer lugar el antimicrobiano debe alcanzar una adecuada concentración en orina; segundo lugar, se debe tomar en cuenta el cuadro clínico, así como la edad, sexo e incidencia de la infección. Por último, el tratamiento empírico debe considerar que el antibiótico sea capaz de erradicar a los posibles agentes etiológicos, con menores efectos tóxicos, con menor costo y con mínimo efecto sobre la flora normal. Además se deben conocer y tomar en consideración datos epidemiológicos de sensibilidad y resistencia a nivel local (revisado en Torres *et al.* 2008).

MARCO TEÓRICO

***Escherichia coli* uropatógena. Modelo de estudio.**

El género *Escherichia* comprende siete especies distintas *E. coli*, *E. hermanni*, *E. fergusonii*, *E. vulneris*, *E. albertii*, *E. adecarboxylata* y *E. blattae*, siendo *E. coli* la única, de las siete, con importancia clínica (revisado en Blanco *et al.*, 2002).

E. coli es la especie predominante de la microbiota del tracto gastrointestinal de los animales siendo eliminada por las heces al exterior. A pesar de ser el microorganismo facultativo predominante representa una muy pequeña proporción del contenido total de bacterias en este sitio anatómico (revisado en Blanco *et al.*, 2002).

En su mayoría, las cepas intestinales de *E. coli* no son patógenas, coexisten en una relación simbiótica con su hospedero. Sin embargo, a la *E. coli* capaz de infectar el tracto digestivo se conoce como diarreagénica (DEC), distinguiéndose siete diferentes categorías: *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de toxina Shiga/Vero (VTEC/STEC), *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* Difusoadherente (DAEC). Mientras que las que causan infecciones extraintestinales (ExPEC) son: *E. coli* Uropatógena (UPEC) y *E. coli* asociada a Meningitis (NEMEC). Cada patotipo causa enfermedad utilizando diferentes combinaciones de factores de virulencia, cuya expresión está determinada por distintas condicionantes moleculares resultando en general en enfermedades

cuyos síntomas pueden ser distinguidos unos de otros (revisado en Casellas, 2008; Croxen *et al.*, 2010; Jafari *et al.*, 2012).

E. coli uropatógena es el patógeno oportunista más frecuentemente asociado con ITU con un 75 a 90% de las ITU's y septicemias en humanos. Menos frecuentemente pueden aparecer *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus* (casi exclusivo de mujer pre-menopáusica), *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae* y otros bacilos gram negativos (revisado en Murray, 2007; Casellas, 2008).

En la ITU ocasionada por UPEC se presenta una importante respuesta inmune innata mediada principalmente, por receptores Toll-like 4 (TLR4), que son sensibles a los lipopolisacáridos (LPS) específicamente de UPEC. Esto sucede al entrar en contacto la bacteria con las células epiteliales de la vejiga; la respuesta se caracteriza por la producción urotelial de citocinas proinflamatorias y, quimioattractantes, incluyendo la IL-8 que media el reclutamiento de neutrófilos. Otros tipos de mecanismos son la producción de péptidos antimicrobianos, con otro tipo de fagocitos como los macrófagos y, la respuesta más drástica, la exfoliación total de la capa superficial de las células epiteliales de vejiga (revisado en Rudick *et al.*, 2010; Horvath *et al.*, 2012).

La biología molecular de UPEC es base esencial para determinar los diferentes tipos de ITU causadas por este patotipo. UPEC es un grupo genotípica y fenotípicamente heterogéneo, es representado por un pequeño número de serogrupos, O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25, O62 y O75, que parecen

representar las diferentes subclases de dichas cepas (Johnson, 1991; Brzuszkiewicz *et al.*, 2006). Las cepas causantes de ITU son relacionadas, generalmente, a los serotipos O1:H4, O1:H6, O1:H7, O1: H-, O2:H1, O2:H4, O4:H5, O6:H1, O7:H4, O7:H6, O7: H-, O8, O16, O18ac:H7, O18ac: H-, O22:H1, O25:H1, O75:H5 y O75:H7 (revisado en Wiles *et al.*, 2008).

Escherichia coli uropatógena es epidemiológica y filogenéticamente diferente de cepas comensales y, aparentemente, es incapaz de causar infecciones intestinales. Este patotipo es portador de perfiles de virulencia heterogéneos y expresa factores de virulencia que otros patotipos de *E. coli* no expresan. Dichos factores se encuentran codificados, principalmente, en largos segmentos multigénicos cromosomales, denominados islas de patogenicidad (PAIs), con un tamaño de entre 30 a 170 kb. Estas PAIs no se encuentran en cepas de *E. coli* de otros patotipos y presentan una estructura inestable. Algunas cepas de *E. coli* presentan más de una PAI, aumentando el potencial uropatógeno de UPEC (revisado en Murray *et al.*, 2007, Wein *et al.*, 2008).

La mayoría de los factores determinantes de virulencia clásicos UPEC se encuentra en sólo cinco PAIs, y los principales factores asociados con la virulencia como toxinas, adhesinas, sistemas de sideróforos, proteasas, cápsulas y LPS se expresan en la cepa CFT073 aislada de una mujer cursando con pielonefritis aguda. Dicha cepa lleva más copias en su genoma de genes que codifican para adhesinas típicas de ExPEC por ejemplo, los que codifican para la fimbria *Pap* y el pili tipo 1, posee solo un alelo de *hly* gen que codifica para hemolisina; expresa cinco sistemas

de captación de hierro diferentes y los genes de aerobactina en su genoma (revisado en Johnson, 1991; Stamm *et al.*, 2001; Brzuszkiewicz *et al.*, 2006).

Curiosamente, estos mismos factores de virulencia pueden ser codificados por plásmidos en cepas de *E. coli* intestinal. Por lo tanto, las PAI's de UPEC podrían representar derivados de secuencias plasmídicas (revisado en Cusumano *et al.*, 2011).

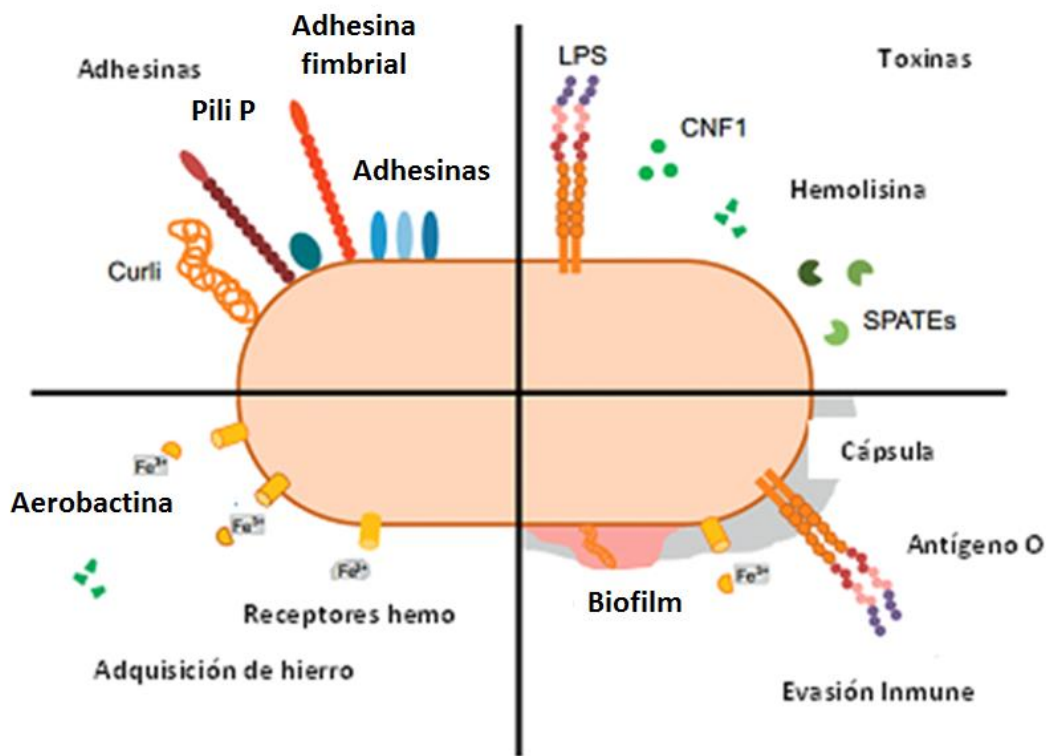
Dentro de los factores de virulencia expresados por UPEC se encuentran factores implicados en la adherencia bacteriana a las células epiteliales, tanto vaginales como uroteliales, entre ellos encontramos a fimbrias tipo 1 y fimbrias tipo P respectivamente; factores que permiten evadir o sobrevivir a los sistemas de defensa del huésped, como son la cápsula y el lipopolisacárido; mecanismos de adquisición de nutrientes como los sideróforos y los sistemas de transporte de hierro; proteasas, invasinas y toxinas, como la hemolisina, el factor necrotizante citotóxico y toxinas autotransportadoras (toxina autotransportadora vacuolizante y toxina transportadora secretada). La expresión y combinación de estos factores puede variar entre cepas de UPEC lo que dicta los diferentes tipos de ITU. Sin embargo, además de la presencia o ausencia de los factores de virulencia, también es importante la expresión variable y la diversidad funcional de los mismos (Figura 3) (revisado en Soto, 2006; Wein *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2012).

Se han estudiado diversos genes que participan en la virulencia de UPEC, como son *fimH* (fimbria tipo1), *kpsMTII* (Antígeno capsular de grupo II), el operón *pap A, B, C, D, E, F, G, H, I* (fimbria P), *sfa* (fimbria S), *iucD* (aerobactina), *hly* (hemolisina),

usp (proteína específica uropatogénica), *cnf-1* (factor citotóxico necrotizante) y *afa* (adhesina afimbrial). Al igual que con los factores de virulencia de otros patotipos, algunos de estos genes están asociados entre ellos (revisado en Tiba *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009).

Principales factores de virulencia de UPEC

UPEC cuenta con los siguientes factores de virulencia (Ver figura 3):



el tracto urinario, para resistir las defensas inmunitarias del huésped y persistir. SPATEs: Serin-proteasas de enterobacterias (toxina autotransportadora vacuolizante y toxina secretada autotransportadora). (Tomado y modificado de Lüthje *et al.*, 2014.)

Flagelo. Para que UPEC se pueda desplazar por el tracto urinario, de vejiga a riñón, y la colonización de las vías urinarias sea eficaz debe expresar un flagelo. Dicho

flagelo está compuesto de diversas subunidades de flagelina codificada por el gen *fliC*.

Adhesinas. El paso inicial en la colonización de UPEC es la adherencia, esta capacidad es conferida por las adhesinas permitiéndole a UPEC la permanencia en el tracto urinario a pesar del arrastre causado por el flujo urinario. Las adhesinas de mayor importancia en UPEC son:

Fimbria tipo 1 (sensible a manosa). Presentes en más de un 80% de las cepas de UPEC, facilita la adhesión y colonización de la mucosa de vejiga. Gunther y cols demostraron que las cepas de *E. coli fim+* se presentan en forma de dos variantes: “on” que permite adherencia al uroepitelio y “off” y no coloniza la vejiga (revisado en Casellas, 2008). La fimbria tipo 1 es codificada en un operón, homólogo al operón de la fimbria P, integrado por nueve genes, de *fimA* a *fimH* (Figura 4). La adhesina de la fimbria tipo 1 es FimH, la cual está en el extremo de la fimbria y se

encarga de la unión a residuos de D-manosa encontrados en la uroplaquina la y IIIa de células uroteliales

(Figura 5) (revisado en Sokurenko *et al.*, 1994; Wein *et al.*, 2008; Soto,

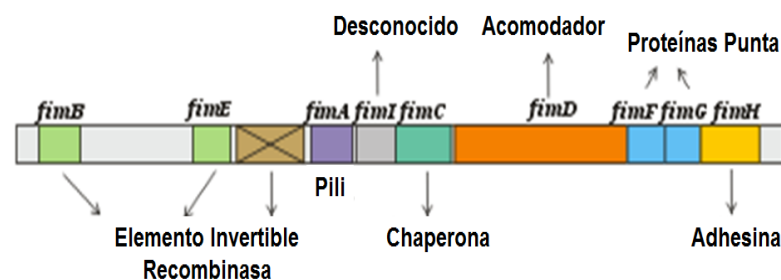


Figura 4. Operón de fimbria tipo 1 de *E. coli*. Organización del operón *fim*. FimH es la adhesina que se une a restos de D-manosa. FimA funje como la subunidad principal estructural. FimC y FimD son las subunidades responsables de ensamblaje. FimF y FimG son las subunidades minoritarias que conforman un apéndice flexible lineal. Tomado y modificado de MOH Key Laboratory of Systems Biology of Pathogens, Institute of Pathogen Biology <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/vfs.cgi?VFID=VF0220#VF0220>

2006). Dicha interacción conduce a una cascada de fosforilación necesaria para el estímulo de la apoptosis y el incremento de calcio intracelular. Además determina la adherencia no sólo a las células de la mucosa vesical sino a los mastocitos donde las bacterias quedan protegidas de los anticuerpos y antibacterianos, dando explicación a la existencia de ITU recurrentes (revisado en Casellas, 2008; Bien *et al.*, 2012).

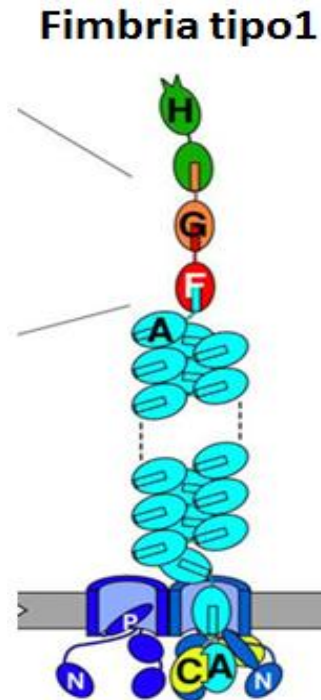


Figura 5. Conformación proteica de Fimbria tipo 1. Se muestra su conformación empezando por un tallo rígido helicoidal formado por subunidades de FimA, y por un apéndice corto formado por las subunidades menores FimF, FimG y la adhesina FimH. (Tomado y modificado de Thanassi *et al.*, 2012 y Chahales, P. and Thanass, D.G. 2015).

Fimbria P o Pap (pili asociado a pielonefritis-resistente a manosa). Representa el segundo factor de virulencia más importante de UPEC, que juega un papel importante en la patogénesis de las infecciones urinarias y en la pielonefritis ascendente en humanos. Dicha fimbria es específica a glicolípidos presentes en riñón humano participando en el desarrollo de la pielonefritis. Es formada por un conjunto de nueve proteínas codificadas por el operón *pap* el cual consta de nueve genes (del *papA* a *papI*). El complejo que forma la estructura fibrilar externa es codificado por tres genes *papE*, *papF* y *papG*, donde PapG es la adhesina. La

fimbria P presenta tres variantes moleculares de la *papG* (I, II y III) codificados por los correspondientes alelos (*papG* alelo I, *papG* alelo II y *papG* alelo III) que le confiere la especificidad a dicha adhesina. Las adhesinas de tipo II son las más comunes, implicadas en pielonefritis aguda, seguidas por las de tipo III, aislada de prostatitis aguda y causantes de las cistitis humana, y por último la tipo I, son las menos frecuentes y precisan de globotriaosilceramida como epítipo del receptor (Figuras 6 y 7) (revisado en Ruiz *et al.*, 2002; Lane *et al.*, 2007).

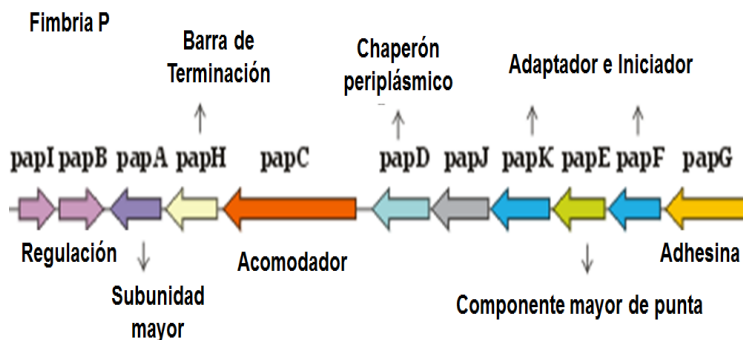


Figura 6. Operón fimbria P o Pap. Representación de la organización del operón *pap*. *papA*, codifica subunidad principal. La región reguladora *papB* y *papI*. Subunidades menores *papE* y *papF*. *papG* que codifica a la adhesina. Tomado y modificado de MOH Key Laboratory of Systems Biology of Pathogens, Institute of Pathogen Biology
<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/vfs.cgi?VFID=VF0220#VF0220>.

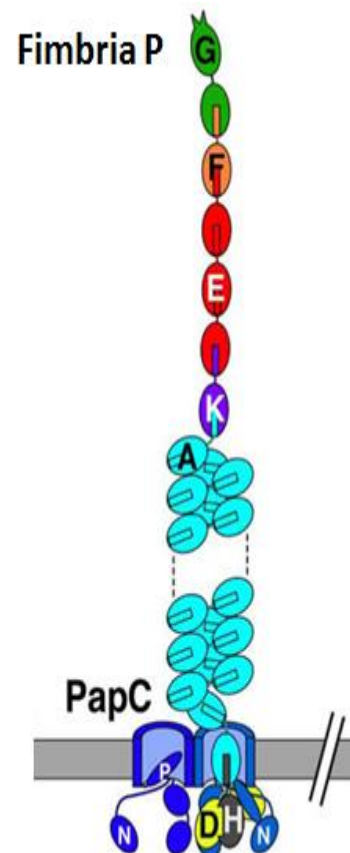


Figura 7. Conformación proteica de Fimbria P. Fimbria P conformada por una subunidad principal PapA, que forma un tallo rígido unido a un punta flexible conformada por las subunidades menores PapE, PapF y una adhesina formada por PapG (Tomado y modificado de Thanassi *et al.*, 2012 y Chahales, P. and Thanass, D.G. 2015).

Iha. Adhesina homologa a IrgA o adhesina receptora de sideróforo. Fue identificada originalmente en *E. coli* cepa O157:H7 como una adhesina homóloga de Irga, factor de virulencia de *V. cholerae*. Es codificada por el gen *iha*, encontrada frecuentemente en cepas de UPEC, y tiene una doble función: como captador de hierro y como adhesina. Se presenta en una amplia variedad de serotipos, tanto de cepas UPEC y EHEC. Su presencia en cepas de ExPEC es de importancia en la patogénesis de las infecciones urinarias. La proteína Iha tiene un tamaño de 67kDa en *E. coli* O157:H7 (revisado en Tarr *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2008; Chahales, P. and Thanassi, D.G., 2015).

Aerobactina (iucD). Sideróforo asociado con cepas UPEC, es sintetizado por el gen *iucD*. Se encuentra localizado a nivel cromosomal, aunque también en plásmidos (ColV). Permite la sobrevivencia de *E. coli* en medios escasos de hierro. Se relaciona con cepas causantes de cistitis y pielonefritis. Es el sistema de mayor eficiencia en la captación de hierro (revisado en Ruiz *et al.*, 2002; Wiles *et al.*, 2008).

Toxinas.

Las toxinas juegan un papel importante en el proceso de patogénesis de UPEC. Su efecto puede ser citotóxico o citolítico que desencadena una respuesta inflamatoria que explica en muchos casos la sintomatología que se presenta durante un cuadro de ITU. Algunas de las toxinas, principalmente, asociadas a UPEC son la hemolisina y el factor citotóxico necrotizante 1. Otras menos frecuentes son la

toxina autotransportadora vacuolizante y la toxina autotransportadora secretada (Figura 8).

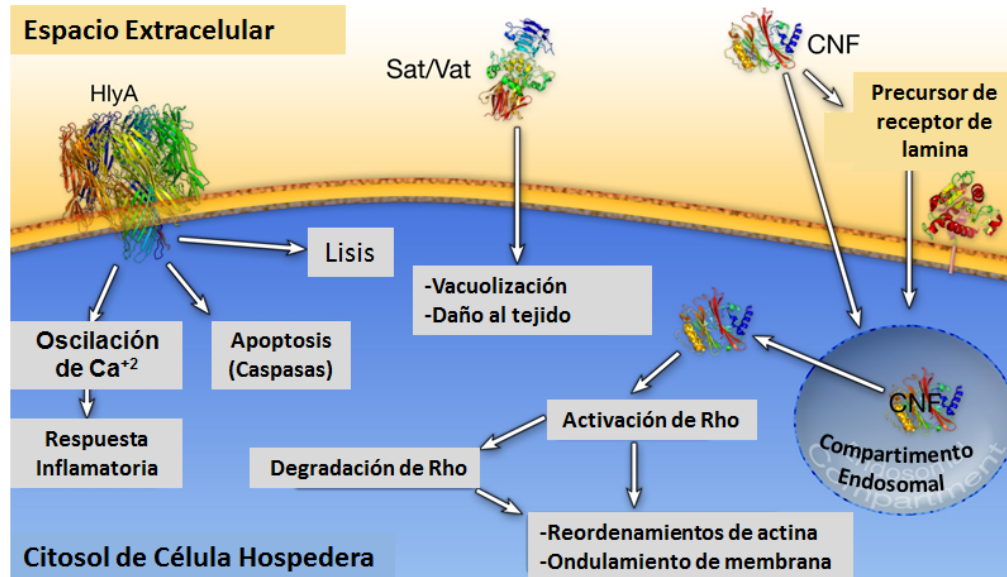


Figura 8. Toxinas asociadas a UPEC. Hemolisina (HlyA), Sat y VAT y CNF-1 (Tomado y modificado de Wiles *et. al.*, 2008)

Hemolisina. Es una toxina de la familia de proteínas RTX (Repeat in toxin). Codificada a nivel cromosómico o plasmídico. Su síntesis y secreción es codificada por el operón *hlyCABD*, siendo el gen estructural *hlyA* que codifica un polipéptido de 110-kDa dependiente de calcio. HlyA actúa sobre una variedad de células: glóbulos rojos, fibroblastos, granulocitos, linfocitos y macrófagos. La toxina es secretada por bacterias hemolíticas, es encontrada tanto en patotipos causantes de infecciones intestinales como extraintestinales. A una alta concentración, HlyA, genera poros en la membrana celular de eritrocitos y de las células hospederas nucleadas causando su lisis, y con ello le permite a UPEC no solo la obtención de hierro para la bacteria sino también le va a permitir atravesar barreras mucosas y

dañar células efectoras. A bajas concentraciones puede inducir la apoptosis de células hospederas blanco, incluyendo neutrófilos, linfocitos T y células renales, y puede promover la exfoliación de las células epiteliales de vejiga (revisado en Beutin, 1991, Bakás *et al.*, 2013, Bien *et al.*, 2012).

CNF-1. El factor necrotizante citotóxico tipo 1 es una toxina de cadena sencilla, de 113kDa. A nivel intracelular, CNF-1 cataliza la desaminación de proteínas GTPasas como Rho, dicho cambio de aminoácido provoca importantes alteraciones a nivel celular, generando exfoliación celular lo que mejora el acceso de la bacteria a tejidos subyacentes. *In vitro*, se ha demostrado que interviene en la fagocitosis de células polimorfonucleares y evoca la apoptosis de las células del epitelio a nivel de vejiga. *In vivo*, conduce a la exfoliación de células de vejiga permitiendo el acceso de la bacteria al tejido subyacente. El gen *cnf* es codificado a nivel cromosómico y plasmídico (revisado en Beutin, 1991; Bower *et al.*, 2005, Bien *et al.*, 2012).

Toxina autotransportadora secretada (Sat). Toxina proteolítica, de 107kDa, asociada a cepas de *E. coli* causante de pielonefritis. Es codificada por el gen *sat* el cual se ha localizado en la isla de patogenicidad PAI II de *E. coli* CFT073. Tiene efecto tóxico frente a células de origen renal y vesical, forma vacuolas en el citoplasma de dichas células. La actividad proteolítica afecta el citoesqueleto de las células epiteliales de vejiga produciendo una alteración morfológica. Se ha demostrado que causa pérdida de células epiteliales tubulares y vacuolización del tejido renal (revisado en Zárate *et al.*, 2008; Guyer *et al.*, 2002).

Toxina autotransportadora vacuolizante (Vat). Proteína de 148 kDa codificada por el gen *vat*. Vat induce la formación de vacuolas intracelulares, lo que desemboca en una citotoxicidad (revisado en Wiles *et al.*, 2008).

Grupos filogenéticos de *E. coli* relacionados a UPEC

La extensa subestructura genética dentro de la *E. coli* ha orillado a múltiples investigadores a desarrollar un método sencillo para clasificarla. En el 2000, se desarrolló un método sencillo de PCR múltiple descrito por Clermont y colegas que permite asignar a una *E. coli* a uno de los filogrupos A, B1, B2 o D; las diferencias entre *E. coli* patógenas y comensales se correlacionan con sus antecedentes filogenéticos, las cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales (ExPEC), incluyendo las infecciones urinarias y la sepsis, derivan principalmente del grupo B2 y en menor proporción del grupo D, mientras que las cepas de *E. coli* comensales derivan de los grupos A y aunque las cepas de *E. coli* de los grupos filogenéticos A o B1 conforman la flora comensal, y se consideran no patógenas, ocasionalmente han sido responsables de infecciones extraintestinales (Clermont *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2006).

La clasificación del grupo filogenético se lleva a cabo mediante el análisis de presencia o ausencia de los genes, *yjaA* y *chuA*, y un fragmento cromosomal TspE4.C2; y se han asociado a la presencia o ausencia de algunos factores de virulencia (Clermont *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 2011). Por ejemplo las cepas pertenecientes a los grupos A y B1 poseen menos genes de virulencia que las

cepas B2 y D, sin embargo, algunas de las cepas pertenecientes a los grupos menos virulentos han adquirido factores de virulencia asociados a cepas del grupo B2, indicando que la patogénesis difiere entre los distintos grupos filogenéticos, sin descartar que el grado de patogenicidad entre cepas del mismo grupo filogenético puede diferir entre ellas (Molina *et al.*, 2011; Millan *et al.*, 2014).

En el 2012 Clermont y colaboradores, tomando en cuenta el creciente número de datos de secuencias multi-locus y datos genómicos, desarrollaron y validaron un nuevo método basado en PCR que permite asignar a una cepa de *E. coli* en uno de los siete grupos filogenéticos que son A, C, B1, B2, D, E y F. Dicho método tiene como fin determinar la presencia o ausencia de los genes *yjaA*, *chuA*, *arpa*, *trpA* y un fragmento cromosomal TspE4.C2. El grupo filogenético C es asociado al filogrupo A, mientras que los grupos E y F están asociados al grupo filogenético D (Clermont *et al.*, 2012).

Resistencia a antibióticos en UPEC

Las bacterias, tienen una gran capacidad de adaptación, desarrollando mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de un blanco para un antibiótico. La realmente importante desde un punto de vista clínico es la resistencia adquirida y es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La primera puede ir seguida de la selección de las mutantes resistentes, pero la resistencia

transmisible esta mediada por plásmidos, transposones o integrones, islas de patogenicidad y bacteriófagos que pueden pasar de una bacteria a otra (revisado en Daza Pérez, 1998).

El aumento de la resistencia a los antimicrobianos en bacterias patógenas es motivo de gran preocupación, ya que puede variar en función de las situaciones geográficas y regionales. Es muy importante para asegurar el tratamiento adecuado basado en el conocimiento completo de los organismos que causan la infección del tracto urinario y sus perfiles de susceptibilidad antibiótica. Por lo tanto, es necesario hacer pruebas bacteriológicas también con referencia a bacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido responsables de la resistencia a los antibióticos beta-lactámicos, incluyendo las cefalosporinas de tercera generación, tales como cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima (revisado en Jadhav *et al.*, 2011).

UPEC ha desarrollado una especial resistencia a antibióticos como: ampicilina, piperacilina, fluoroquinolonas y trimetoprim con sulfametoxazol; pero a pesar de ello muestran, todavía y a reserva de algunas excepciones, sensibilidad a nitrofurantoina, ciprofloxacina y ácido nalidíxico. Con todo esto el tratamiento de las ITU's se vuelve más complejo y de mayor responsabilidad para conservar la integridad del paciente (revisado en Aguirre *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2011).

En 2012 Magiorakos y cols proponen una serie de definiciones de multidrogo-resistencia (MDR), extremadamente resistente (XDR) y pandrogo resistente (PDR), para cepas de bacterias patógenas que se encuentran frecuentemente en el

entorno de la atención médica. Mediante la utilización de estas definiciones se pretende la utilización de una terminología común para la clasificación de diferentes perfiles de resistencia bacteriana. Para establecer dichas definiciones establecieron categorías antimicrobianas que fuesen epidemiológicamente significativas y que tuviesen relevancia terapéutica según el organismo a tratar. Con respecto a UPEC, que pertenece a la familia de las *enterobacterias*, se establecieron 14 categorías.

Los criterios para definir a UPEC como: MDR, no debe ser susceptible a ≥ 1 agente en tres categorías de antimicrobianos; XDR no susceptible a ≥ 1 agente en todo excepto ≤ 2 categorías y PDR resistente a todos los agentes antimicrobianos.

En México, bajo los estatutos establecidos en el cuadro básico de medicamentos en México durante el 2016 según el Diario Oficial de la Federación (DOF) se maneja a antibióticos para primer nivel de atención a: amoxicilina- ácido clavulánico, ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina, metenamina y nitrofurantoina; y para el segundo y tercer nivel de atención se manejan antibióticos como: ácido nalidíxico, amikacina, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona y cefuraxima. Pese a que es amplio el catálogo de elección de antibióticos para el tratamiento de infección en vías urinarias únicamente la metenamina, indicada en ITU no complicada; nitrofurantoina (indicada en infecciones urinarias causadas por bacterias sensibles) y el ácido nalidíxico (indicado en casos donde el agente etiológico sea un gram negativo susceptible) son los que se marcan específicamente para el tratamiento de infección en vías urinarias, en este caso tenemos a un antibiótico de primera

elección (nitrofurantoina) y a un bacteriostático (metenamina), y uno de segunda elección (ácido nalidíxico) (Diario Oficial de la Federación, 2015).

Plásmidos en UPEC

Pese a las similitudes con otros patotipos de *E. coli*, se han identificado características genómicas propias de UPEC, identificándola como una clase única. UPEC ha desarrollado estrategias múltiples para la colonización del tracto urinario. Esta diversidad genómica ha sido adquirida a través de transferencia horizontal de genes, generando una amplia diversidad bacteriana. La adquisición de genes puede permitir la adaptación a la vida en un nicho especializado a través de factores específicos (revisado en Wiles *et al.*, 2008; Cusumano *et al.*, 2011).

Los plásmidos son replicones extracromosómicos autoreplicativos, no son esenciales para la viabilidad de la bacteria y son responsables en algunos casos del intercambio de material genético entre las poblaciones microbianas. De forma natural son capaces de difundir una variedad de características: metabolismo de sustancias complejas, codificación de factores de virulencia y resistencia a antibióticos (revisado en Frost *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2008).

El ADN plasmídico suele presentarse como una molécula circular de ADN de doble hebra cerrada covalentemente, esta molécula puede presentar algunas alteraciones por ruptura dando lugar a otro tipo de configuraciones plasmídicas: ADN plasmídico circular abierto, lineal. Los plásmidos superenrollados son el

material de mayor interés ya que es la forma nativa de este material extra-cromosomal. Es liberado de la célula hospedera por procesos alcalinos manteniendo intacta su estructura, generalmente su tamaño molecular oscila entre 200 y 300 X10⁶ g/mol. Cada configuración, que puede presentar un plásmido, migra a diferente velocidad en un gel de agarosa; en donde la forma de doble cadena covalentemente cerrada migra más rápido que la circular abierta y la que tarda más tiempo en migrar es la forma lineal. Las tres formas que presenta un plásmido pueden encontrarse en la misma célula dando paso a observar tres bandas plasmídicas o isoformas.

E. coli posee una gran variedad de plásmidos, incluyendo los asociados a factores de virulencia y resistencia a antibióticos. A pesar de ello, cada patotipo posee plásmidos característicos que codifican características de virulencia propias de cada uno de ellos, los cuales han ido evolucionando a partir de un plásmido molde adquiriendo propiedades y características esenciales y específicas de cada patotipo (revisado en Johnson *et al.*, 2008).

En UPEC, la virulencia es codificada cromosómicamente, pero también puede ser adquirida mediante plásmidos. En particular plásmidos ColV (asociado a adquisición de hierro) y Vir (asociado con una invasina). El plásmido ColV se ve asociado, no solo a la adquisición de hierro, sino también a la adherencia, resistencia a desinfectantes, crecimiento en orina y en condiciones de pH ácido, y la resistencia a bacteriófagos (revisado en Quackenbusht *et al.*, 1997).

Plásmidos como pUTI89, el cual posee varias características similares a las islas de patogenicidad de UPEC, han actuado como punto clave para la incorporación de genes de virulencia en genoma de UPEC, aumentando la capacidad de las cepas para invadir y colonizar vejiga (revisado en Cusumano *et al.*, 2011).

MARCO DE REFERENCIA

De acuerdo al SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica) en México, hasta el 2015, la infección en vías urinarias ocupa el tercer lugar en causa de morbilidad en pacientes en edad pediátrica como en adultos, afectando principalmente a pacientes femeninos entre 25 a 44 años. El principal patógeno causante del 75 al 90% de los casos de ITU son cepas de *Escherichia coli* uropatógena (SINAVE, http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/principales/nacional/grupo_edad.pdf).

Se ha clasificado en tres variantes serológicas a las cepas UPEC por la presencia de antígeno somático (O), capsular (K) y flagelar (H). En UPEC es más frecuente encontrar cepas con serogrupo O 1,2, 3, 4, 6, 7, 8, 14, 15, 16, 18, 21, 25, 75, 83. Con respecto al serotipo, *E. coli* uropatógena se relacionan principalmente con los serotipo: O1:H4, O1:H6, O1:H7, O1:H-, O2:H1,O2:H4, O4:H5, O6:H1, O7:H4, O7:H6, O7:H-, O18ac:H7, O18ac:H-, O22:H1, O25:H1, O75:H5 y O75:H- (Abe *et al.*, 2008; Sainz *et al.*, 2008; Horvarth *et al.*, 2012).

En un estudio realizado en Venezuela por Millán y colaboradores en el 2014 con cepas UPEC aisladas de pacientes con diagnóstico de ITU se mostró que el mayor número de cepas pertenecía principalmente al filogrupo A, seguido por el filogrupo B2 y minoritariamente el filogrupo D; no encontrando cepas pertenecientes al grupo B1. La relación entre características y el diagnóstico clínico, demostró que las cepas aisladas en pacientes con ITU no complicadas, se ubicaron mayoritariamente en el

filogrupo A. En el caso de las ITU complicadas, las cepas se distribuyeron casi equitativamente entre el grupo A, B2 y D (Millán *et al.*, 2014).

Actualmente se reconocen siete filogrupos, A, B1, B2, C, D, E, F, de *E. coli*. El desarrollo del método para la determinación del grupo filogenéticos de cepas de *E. coli* se describe detalladamente y ya ha sido validado. Más del 95% de *E. coli* aisladas se pueden asignar correctamente a un filogrupo (Clermont *et al.*, 2012).

En el 2014 Toval y colaboradores recolectaron, en hospitales de Alemania, un total de 265 aislamientos de *E. coli* a partir de pacientes ambulatorios y hospitalizados con un diagnóstico de infección en vías urinarias encontrando un predominio en el filogrupo B2 seguido del A y con una menor frecuencia a los grupos E y F.

En México, Miranda y colaboradores realizaron el análisis de 107 aislamientos de *E. coli* a partir de pacientes con ITU (Cincuenta cepas fueron recuperadas de la clínica número 61 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y 57 del hospital del ISSSTE en Chilpancingo, Guerrero, ubicados al centro y al suroeste de México, respectivamente) teniendo como resultado a los grupos B2 y A como los filogrupos más frecuentes. Presentando una diferencia de acuerdo a la localidad de recolección, las cepas obtenidas de la localidad suroeste muestran una prevalencia en los filogrupos A y B1 contrastando con las cepas obtenidas en la zona centro mostrando un predominio en los filogrupos B2 y F. Con respecto al filogrupo E no fue detectado (Miranda *et al.*, 2016).

En cuanto a la resistencia a antibióticos, en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes ambulatorios con diagnóstico clínico de infección de vías urinarias no complicadas se encontró una alta prevalencia de resistencia a los fármacos utilizados como "primera elección" en el tratamiento de las infecciones urinarias: ampicilina, cotrimoxazol y ciprofloxacino con 79%, 60%, y 24% de resistencia respectivamente). El 66% de las cepas aisladas de *E. coli* fueron resistentes a cotrimoxazol. La resistencia frente a las cefalosporinas de tercera generación también fue alta, 6% -8% de cepas de *E. coli*. Esto fue causado posiblemente por β -lactamasas cromosómicas, como el 30% de todos los aislamientos también fueron resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico (Molina *et al.*, 2011).

Oliveira y colaboradores reportan en el 2011 que el 59% de sus aislados, obtenidos a partir de muestras de pacientes en un laboratorio en Curitiba, Brasil; muestran resistencia a antimicrobianos como: ampicilina (51%), trimetoprim / sulfametoxazol (44%), ácido nalidíxico (21%), gentamicina (16%), ciprofloxacino (13%), cefalotina (4%), cefoxitima (1%) lo que concuerda con los estudios realizados por Farshad y colaboradores en el 2012 con cepas UPEC aisladas de niños, de una población de Irán, con ITU donde analizan la sensibilidad a los antimicrobianos: ampicilina (19,8%), TMP-SMX (24%), tetraciclina (29,2%), ácido nalidíxico (75,5%), cefixima (80,4%), gentamicina (84,6%), ciprofloxacina (91,4%), nitrofurantoína (96,8%), amikacina (96,8%) e imipenem (100%) (Oliveira *et al.*, 2011; Farshad *et al.*, 2012).

Un número aproximado de 39,02% de aislados de *E. coli* se ha encontrado que alberga plásmidos, los cuales en la mayoría de los casos son los responsables de la resistencia a antibióticos (Costa *et al.*, 2008).

En 2012, como resultado del análisis de 96 cepas, 76 cepas presentan al menos un plásmido encontrando en algunas cepas hasta 10 plásmidos de promedio 5.5 plásmidos en cada cepa. Los tamaños de estos aislados plasmídicos oscilaron entre 1 a 33 kb. Los plásmidos más frecuentes fueron aquellos con un peso molecular de entre 4-5 kb observándose este tipo de plásmidos en el 28.94% de las cepas. Los plásmidos menos frecuentes fueron aquellos de 11-12 kb, 21-22 kb, 26-27 kb y 29-30 kb, reportados en el 1.31% de las cepas (Farshad *et al.*, 2012)

ANTECEDENTES DIRECTOS

En el grupo de investigación perteneciente al laboratorio de “Biología molecular de enteropatógenos”, donde se llevó a cabo esta tesis, se han dirigido diferentes trabajos sobre la línea de investigación de UPEC que han encontrado como resultado que las ITU por *E. coli* uropatógena tiene una mayor incidencia en la población femenina con un 64% respecto de la población masculina, teniendo una mayor incidencia la población en el rango de edad de los 25 a los 65 años (Aroche, 2011; Martínez, 2012; Molina, 2011).

Aroche en el 2011, Martínez en el 2012 y Molina en el 2011 analizaron 372 cepas de UPEC obtenidas de urocultivos de pacientes con diagnóstico de ITU, provenientes de un hospital de Salud Pública de tercer nivel y dos laboratorios clínicos particulares de Puebla, encontrando que el serotipo más frecuente fue: por Molina y Aroche 2011, O25:H4 (16%), seguido de O75: H⁻, (8%), O1:H6 (5%), O1:H34 (4%) y O75:H45 (3%); y por Martínez en el 2012, O25:H4 (8%), seguido de O17:H18 y O6:H (2%) (Aroche, 2011; Martínez, 2012; Molina, 2011).

Además en el laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos se ha realizado determinación de multirresistencia a antibióticos, encontrando que del 71 al 78% de las cepas son multirresistente. En el cepario analizado por Aroche y Molina en 2011 se observó mayor frecuencia en la resistencia a ampicilina (47%), seguido de levofloxacino con un (38%), trimetropim-sulfametoxazol (33%), cefalotina (29%) y un 12% a nitrofurantoina. Con respecto al trabajo de Martínez 2012, se observó mayor resistencia a ampicilina (74%), en segundo lugar a trimetropim-

sulfametoxazol (66%) seguido de levofloxacino (49%) y por una diferencia de 1% encontramos a cefalotina (48%) y por ultimo con 14% a nitrofurantoina (Aroche, 2011; Martínez, 2012; Molina, 2011).

Aroche en el 2011, analizó la presencia de 3 genes en 114 cepas: *hlyA* (29.8%), *papGII* (37.7%) y *papGIII* (21.9%). Molina en el 2011, realizó la detección de dos genes, *fimH* (94%) y *fliC* (30%), a 113 cepas. Finalmente, Martínez en el 2012 analizó la presencia de los genes *vat* (38.1%) y *sat* (25.7%) en la región peptidasa y en la autotransportadora, e *iucD* (14.4%), a 125 cepas (ver anexo 1) (Aroche, 2011; Martínez 2012; Molina, 2011). Cabe mencionar que de la colección de los tres ceparios solo fueron tomadas 95 cepas para la realización de este estudio y en cada cepario se realizó la determinación de la presencia de genes de virulencia, *fimH*, *fliC*, *papGIII*, *hlyA*, *papGII*, *vat* y *sat* en la región peptidasa y en la autotransportadora, e *iucD* (Aroche, 2011; Martínez 2012; Molina, 2011).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Escherichia coli uropatógena (UPEC) es la causa más común de ITU adquirida en la población. UPEC es la responsable de un 70-90% de los casos y cerca de 150 millones de casos son diagnosticados anualmente. Estas cifras reflejan la magnitud del problema de salud pública al que nos enfrentamos, sin embargo, no reflejan la diversidad de las ITU en sus diferentes formas. El tratamiento, manejo y control de las ITU provocadas por UPEC se hace complejo debido a la heterogeneidad fenotípica y genotípica que presenta esta bacteria, sumando a esto los mecanismos de recombinación genética, adquisición de material extra cromosómico (plásmidos), hace un sistema complejo que será interesante investigar en cepas de UPEC aisladas de población mexicana..

JUSTIFICACIÓN

Escherichia coli es el agente etiológico que con mayor frecuencia causa infecciones de tracto urinario. Las cepas de *E. coli* uropatógena causantes de ITU contienen diversos factores de virulencia que favorecen su adherencia, la colonización, evasión del sistema inmune, sobrevivencia y daño del tracto urinario en sus diferentes niveles. Sumado a eso, el perfil de resistencia que muestran actualmente dichas cepas nos muestra un panorama poco alentador ante el adecuado manejo de dichas infecciones.

Al identificar y determinar los factores de virulencia más sobresalientes, clasificar el grupo filogenético al que pertenecen, determinar perfiles de resistencia e inducibilidad de plásmidos en presencia de antibióticos puede brindarnos un panorama más amplio sobre la patogénesis provocada por UPEC y con ello tomar determinadas medidas para el tratamiento, el mejor manejo y control de las ITU.

HIPÓTESIS

Las características filogenéticas se relacionan con los factores de virulencia y la multirresistencia a antibióticos que posee UPEC.

OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *E. coli* aisladas de infección de tracto urinario.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar y relacionar los datos previos de serotipificación de cepas de *E. coli* resistentes y sensibles con los serotipos asociados a patotipos de *E. coli*.
2. Determinar el resistotipo a una colección de cepas de *E. coli* resistentes aisladas de pacientes con infección de vías urinarias.
3. Determinar el grupo filogenético de cepas de *E. coli* aisladas de ITU.
4. Determinar la relación entre el grupo filogenético y la resistencia a antibióticos.
5. Determinar la presencia de factores de virulencia en cepas de *E. coli* causantes de ITU.
6. Determinar y analizar el perfil plasmídico en ausencia y presencia de ampicilina

DISEÑO DEL ESTUDIO

- Tipo de estudio:
 - Transversal, descriptivo y observacional.

- Universo de trabajo:
 - Cepas de *Escherichia coli* aisladas de urocultivo a partir de pacientes de diferente sexo y edad diagnosticados con infección de vías urinarias, provenientes de un laboratorio particular y de un hospital público de tercer nivel de la ciudad de Puebla .

- Tamaño de la muestra:
 - 95 cepas de *Escherichia coli* aisladas a partir de infección de tracto urinario.

- Criterios de Selección:
 - Cepas resistentes a antibióticos (81 cepas).
 - Cepas sensibles (14 cepas) como control.

- Criterios de inclusión
 - Cepas de *E. coli* aisladas a partir de pacientes ambulatorios con infección en vías urinarias procedentes de 2 laboratorios particulares

de Puebla (68 cepas) y 1 hospital de salud pública del edo. De Puebla (27 cepas).

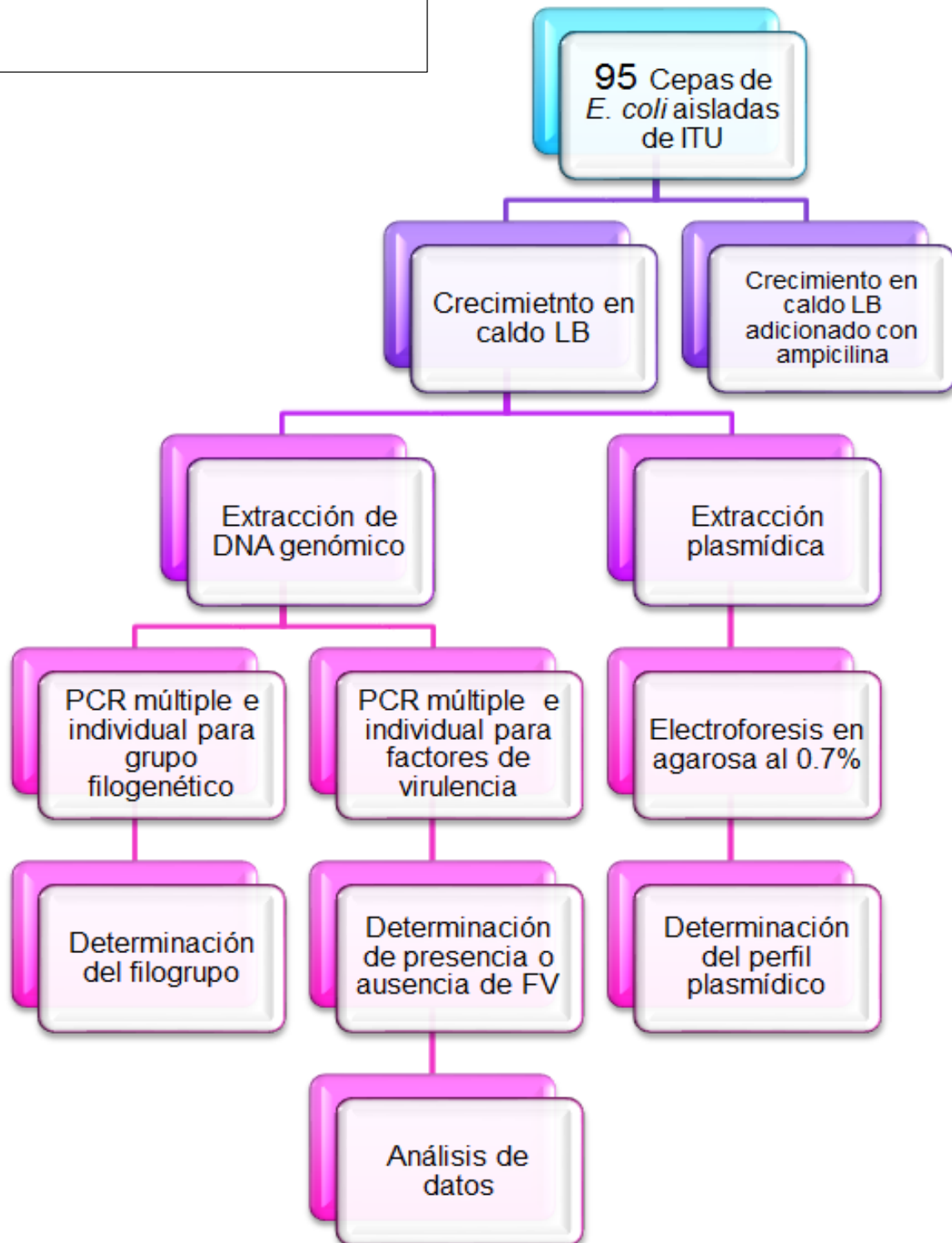
- Criterios de exclusión
 - Cepas procedentes de pacientes hospitalizados.

- Recursos humanos:
 - Directora de Tesis: D. C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández
 - Asesor interno de Tesis: M. C. Patricia Guadalupe Suárez Albores
 - Alumna: pQ.F.B. Dayanira Martínez Cruz

- Financiamientos:
 - Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos, dirigido por D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández.
 - Centro de Investigaciones de Ciencias Microbiológicas (ICUAP).
 - Vicerrectora de Investigación y Estudios de posgrado de la BUAP (Parcial).
 - Cuerpo Académico de Bioquímica y Genética Microbiana.

- Lugar de realización:
 - Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

ESQUEMA 1. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



MATERIAL Y MÉTODOS.

MATERIAL BIOLÓGICO

Cepas problema

En este trabajo se analizaron 95 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con ITU. Las cepas fueron obtenidas de dos laboratorios clínicos particulares y de un hospital público de tercer nivel de la ciudad de Puebla, el periodo de recolección de muestras fue de enero a julio del 2010.

Cepas control

Para la clasificación del grupo filogenético de nuestras cepas problema se utilizó como control positivo a las cepas descritas en la tabla 1, y para la determinación de factores de virulencia se usaron como control positivo las cepas indicadas en la tabla 2.

Tabla 1. Cepas usadas como control en la clasificación filogenética de cepas de *Escherichia coli*.

Cepa	Amplifica	Grupo filogenético
EHEC O157:H7 cepa EDL 933	<i>chuA</i>	D
<i>E. coli</i> K-12 cepa MC 4100	<i>yjaA</i>	A
EHEC O157:H7 cepa 86-24	<i>chuA</i> ,	D
UPEC cepa GAG1*	<i>chuA, yjaA, TSPE4.C2</i>	B2
C7204&	<i>arpA</i>	E
C77206&	<i>trpA</i>	C

*Donada por la Facultad de Medicina de la UNAM. &- Donada por el Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias y de la Comunidad, CICM-ICUAP. BUAP

Tabla 2. Características de cepas control de *E. coli* para la determinación de factores de virulencia.

Cepa	RESULTADO*											
	<i>cnf1</i>	<i>papA</i>	<i>papG</i>	<i>papG</i>	<i>papG</i>	<i>iucD</i>	<i>vat</i>	<i>Sat</i>	<i>hlyA</i>	<i>fliC</i>	<i>fimH</i>	<i>iha</i>
			alelo I	alelo II	alelo III							
CFT073	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
gAg1	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
059I	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
CR16	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+

MÉTODOS.

Condiciones de crecimiento.

Las cepas fueron resembradas en agar Mac Conkey, se incubaron a 37° por 24 horas, se realizó la identificación por morfología colonial, posteriormente se realizó una resiembra en caldo Luria Bertani (LB) y se incubó a 37°C, 18-24 horas para obtener el paquete celular de 3 mL y proceder a la extracción del ADN plasmídico o bien subcultivar en 5 mL de caldo LB incubar hasta una DO_{600nm} 0.4-0.5 para obtener un paquete de 0.5 mL para extracción de ADN cromosomal, y/o crioconservación de una alícuota del pre cultivo de las cepas con 15% de glicerol.

Extracción genómica

Se inocularon 20 μL de la cepa problema de *E. coli* en 3 mL de medio líquido LB durante toda la noche, posteriormente, se toman 75 μL de dicho cultivo y se incubó de 4 a 5 horas a 37°C hasta obtener una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ 0.4. Se tomaron 0.5 mL y se colocaron en un tubo eppendorf para centrifugar a 12000 rpm por 5 min, se decantó y se obtuvo el paquete celular, se le agrego 570 μL de buffer SET (sacarosa, EDTA-TRIS), se agitó en el vortex por 30 seg y se agregaron 30 μL de SDS al 20% invirtiendo el tubo por 20 seg. Nuevamente se mezcló en vortex por 20 seg, evitando hacer burbujas. Se incubó a 80°C por 5 min y se dejó enfriar. Se agregaron 2 μL de RNasa y se incubó a 37°C por 45 min. Se dejó enfriar y se adicionaron 200 μL de NaCl 5 M, se invirtió el tubo por 20 seg y se dejó reposar en hielo por 5 min. Se centrifugó a 12000 rpm y el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo, al que se le agregó 800 μL de isopropanol. Se mezcló por 1 min y se centrifugó a 12000 rpm por 20 min. Se decantó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con 800 μL de etanol al 70%. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 200 μL de Tris 10 mM a pH 8. (Ver anexo 2, Esquema 2).

Extracción plasmídica

La extracción de plásmidos se realizó por el método de “lisis alcalina”. Se inocularon 20 μL de la cepa en 5 mL de medio líquido LB y se incubaron de 12 a 16 horas a 37°C. Se empaquetaron 3.0 mL del pre cultivo a 12000 rpm por 5 min, se agregó 150 μL de buffer SET (sacarosa, EDTA-TRIS) más lisozima y RNasa, se invirtieron los tubos suavemente por 30 seg. Se dejaron incubando a 37°C por 15 min. Se

dejaron enfriar y se adiciono 300 μ L de solución II (NaOH 0.4 M más SDS al 2%) y se invirtieron el tubo por 20 seg. Se dejó reposar en hielo por 5 min. Se adicionó 225 μ L de acetato de potasio 5 M. Se dejó reposar en hielo por 15 min. Se centrifugó a 12000 rpm y el sobrenadante se pasó a otro tubo, al que se le agregó 400 μ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico. Se mezcló y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. El sobrenadante se pasó a otro tubo con cloroformo-alcohol isoamilico. Se mezcló y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo con alcohol absoluto y se mantuvo a -70°C por 20 min. Se mezcló y se centrifugó a 12000 rpm por 15 min. Se decantó el sobrenadante y se realizó 1 lavado con 800 μ L de etanol al 70%. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 70 μ L de agua tridestilada estéril. (Ver anexo 2. Esquema 3.)

Determinación de grupo filogenético

Se realizó la PCRm (Ver anexo 2. Esquema 4), que fue estandarizado por el equipo de trabajo (Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos) siguiendo las condiciones reportadas por Clermont *et.al.*, 2000; que tiene como objetivo la amplificación los genes *chuA* (279 pb), *yjaA* (211 pb) y el fragmento TSPE4.C2 (152 pb), se ajustó la concentración del ADN a 0.0135 μ g para todas las muestras. (Ver tabla 3). Posteriormente, para la determinación de la filogenia de cada cepa se analizó la presencia o ausencia de los tres productos de acuerdo al esquema de Clermont 2000 (Ver figura 9). Con la clasificación de Clermont *et. al.* en el 2012 se realizaron PCR's individuales para la determinar la presencia o ausencia de los productos genéticos *trpA*, en cepas del grupo A para confirmación del filogrupo C, amplificando el gen; y *arpa*, en cepas D para la reasignación al grupo E si amplifica

el gen, ver tabla 4 para la interpretación de PCR. Las condiciones de los PCR's individuales están descritas en la tabla 5.

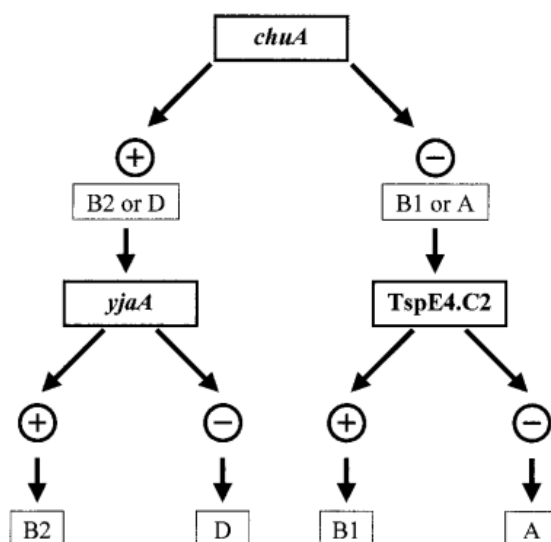


Figura 9. Árbol dicotómico para la interpretación de PCR múltiple y clasificación filogenética (Clermont et al., 2000).

Tabla 3. Determinación de grupo filogenético de cepas de *E. coli* aisladas de ITU. a) Mezcla y concentraciones de reactivos y b) Condiciones de termociclador

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen usado para la reacción
H2O			Varia según la muestra
Buffer	10X	1 X	2 uL
MgCl2		1.5 mM	1.2 uL
ChuaA.1	10mM	0.5 mM	1 uL
ChuaA.2	10mM	0.5 mM	1 uL
YjaA.1	10mM	0.5 mM	1 uL
YjaA.2	10mM	0.5 mM	1 uL
TspeE.1	10mM	0.5 mM	1 uL
TspeE.2	10mM	0.5 mM	1 uL
DNTPs	10mM	0.2 mM	0.4 uL
Taq Pol	5 u/uL	1 U/ul	0.2 uL
DNA	2.36µg/µL	0.0135 ng	Varia según la muestra
Volumen final			20 uL

	Temperatura	Tiempo	
1	94 °C	5'	29 Ciclos
2	94° C	30''	
3	59 °C	30''	
4	72 °C	30''	
6	72 °C	7'	

Tabla 4. Interpretación de PCR múltiple e individual y clasificación filogenética

Grupos filogenéticos	Amplifica			Nueva clasificación	Amplifica		
	chuA	yjaA	TSPE.4C2		trpA	chuA	arpA
A	-	+/-	-	C	+	-	-
B1	-	+/-	+	Mantiene su clasificación como B1			
B2	+	+	+/-	Mantiene su clasificación como B2			
D	+	-	+/-	D	-	+	-
				F	-	+	-
				E	-	+	+

*Amplifica gen *chuA* y el fragmento cromosomal TSPE.4C2. **Únicamente amplifica el gen *chuA*

Tabla 5. Condiciones y reactivos para los PCR's individuales para la determinación de filogenético Clermont 2012. a) Mezcla y concentraciones de reactivos y b) Condiciones de termociclador

a)

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen usado
H ₂ O			Varia según la muestra
Buffer	10 X	1 X	2 uL
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.2 uL
Oligonucleotido R	10 mM	0.5 mM	1 uL
Oligonucleotido F	10 mM	0.5 mM	1 uL
DNTPs	10 mM	0.2 mM	0.4 uL
Taq Pol	5 U/ul	1 U/ul	0.2 uL
DNA	Varia según la muestra	0.0135 ng	Varia según la muestra
Volumen final			20 uL

b)

	Temperatura	Tiempo	
1	94 °C	4'	
2	94 °C	5"	30 Ciclos
3	57 °C	20" (arpA-E)	
	61.9°	20" (trpA-C)	
4	72 °C	1"	
6	72 °C	5 min	

Detección de biomarcadores (FV)

Se llevó a cabo reacciones de PCR_M1 (*iucD*, *satA*, *fimH* y *fliC*), PCR_M2 (*papA*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, *vatA*, *vatP*, *iha*) y PCRM3 (*hlyA*, *satP*, *papA*) y por PCR individual (*cnf1*), de acuerdo a las condiciones establecidas en el grupo de trabajo, (Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos) (Ver esquema 3), para la determinación de la presencia de 14 genes de virulencia que codifican 9 factores de virulencia. (Ver tabla 6 y anexo 3).

Tabla 6. Amplificados por PCR múltiple para la determinación de factores de virulencia en cepas de *E. coli* aisladas de ITU.

Producto	Gen	Oligonucleótidos	Tamaño del amplicón
Hemolisina A	<i>hlyA</i>	hlyA -133F hlyA 1348R	1280 pb
Fimbria tipo P	<i>papGI</i>	pap G1/G3 F papGI -925R	692 pb
		<i>papGII</i>	papGII -113F papG2/G3 R
	<i>papGIII</i>		pap G1/G3 F papG2/G3 R
		<i>papA</i>	papA -45F papA 31R
	Toxina autotransportadora vacuolizante	<i>vatP</i>	vatP-86F vatP 226R
<i>vatA</i>			vatA 1076F vatA 1406R
Adhesina receptora de sideróforo	<i>iha</i>	iha EMSA L iha EMSA R	150 pb
Aerobactina	<i>iucD</i>	iucD -30F iucD 512R	512 pb
Toxina autotransportadora secretada	<i>satA</i>	satA 978F satA 1321R	384 pb
		<i>satP</i>	satP -82F satP 620R
Proteína de filamento flagelar	<i>fliC</i>	fliC 242F fliC 445R	304 pb
Fimbria tipo 1	<i>fimH</i>	fimH F fimH 186R	210 pb
Factor citotóxico necrotizante	<i>cnf</i>	CNF -70F CNF 60R	3176 pb

RESULTADOS

Las 95 cepas de *E. coli* que se usaron en este estudio fueron seleccionadas de un cepario de 372 cepas de *E. coli* recolectadas en el 2010, a partir de muestras de orina de pacientes cursando con ITU (urocultivo) de 3 ámbitos: un laboratorio de salud pública (125 cepas) y dos laboratorios clínicos particulares (114 y 133 cepas respectivamente) (Ver figura 10).

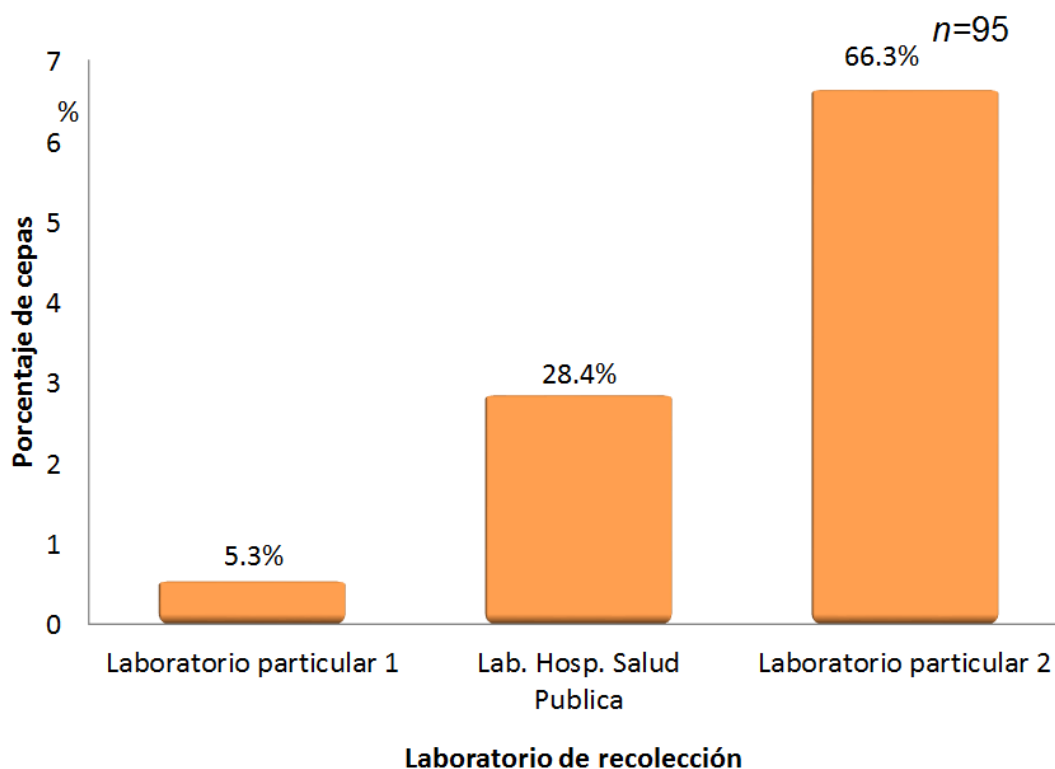


Figura 10. Porcentaje de cepas de *E. coli* recuperadas de pacientes con ITU por el lugar de recolección. El mayor porcentaje de cepas analizadas fue obtenido del laboratorio 2.

Dentro de las 95 cepas de *E. coli*, se seleccionaron 81 cepas resistentes y 14 cepas susceptibles como control.

En primer lugar se procedió a analizar los resultados previos de la serotipificación del grupo de las 95 cepas usadas en el presente estudio y relacionar los serogrupos y/o serotipos con los diferentes patotipos de *E. coli* reportados. La Figura 11 muestra que las cepas pertenecen a 35 serogrupos diferentes, siendo O25 el serogrupo más frecuente con el 18.9%.

Serogrupos

n=95

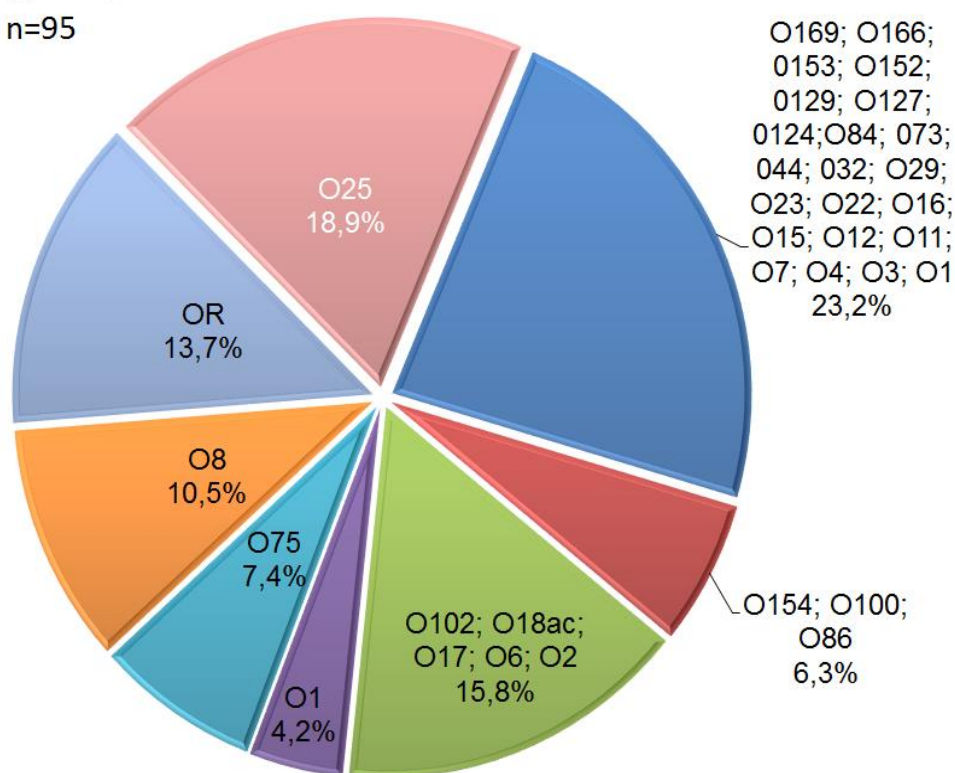


Figura 11. Distribución de serogrupos en una población de 95 cepas UPEC aisladas de ITU's. Se observa la distribución en porcentaje de las 95 cepas UPEC en los 35 diferentes serogrupos determinados por Molina, Martínez y Arroche en el 2010. En negrita los serotipo asociados a UPEC (Wiles y col., 2008)

Adicionalmente se relacionaron los serotipos a los que pertenecen cada una de las 95 cepas con los patotipos de *E. coli* reportados, encontrando que las cepas se asocian a los 2 patotipos de *E. coli*, DAEC con un 27.4% (26 cepas), ExEC con un

44.2% (42 cepas) y el 28.4% (27 cepas) no pertenece a ninguno de los dos patotipos reportados (Ver tabla 7). Además en la Tabla 7 se muestra que dentro del patotipo ExPEC predominan las cepas de la categoría UPEC (40 cepas) de las cuales 36 cepas son resistentes al menos a un antibiótico y 4 cepas son sensibles. Respecto al patotipo DAEC, predomina la categoría STEC (13 cepas), seguida de ETEC (3 cepas) y en menor proporción EPEC, EHEC y EIEC con dos, una y una cepa respectivamente (Ver anexo 4). En la tabla se muestran las cepas resistentes y sensibles en cada caso. (Ver tabla 7).

Tabla 7. Asociación del Serotipo de 95 cepas de *E. coli* aisladas de ITU con los patotipos y sus categorías.

Serotipo	# de cepas	%	# de cepas Sensibles	# de cepas resistentes	Patotipo	Subgrupos
O25:H4 (16); O22:H1 (1); 18ac:H7 (2); 18ac:H (3); O17:H18 (1); O16:H5 (1); O11:H18 (1); O7:H; O6:H1 (4); O4:H5 (7); O1:H6 (1); O75:H44 (1); O75:H (1); O73:H18 (1)	40	42.1	4	36	ExPEC (44.2%)	UPEC
O2:H6	2	2.1	1	1		MNEC
O154:H20 (2); O124:H11 (1); O102:H6 (3); O84:H (1); O23:H15 (1); O8:H19 (2); O8:H8 (1); O6:H10 (1); O2:H6 (1)	13	13.7	2	11	DAEC (27.4%)	STEC
O166:H7 (1); O15:H (1); O8:H11 (2); O8:H9(2)	6	6.3	-	6		ETEC
O44:H18 (1); O86:H18(2)	3	3.1	-	3		EAEC
O25:H1 (1); O127:H-(1)	2	2.1	1	1		EPEC
O153:H2	1	1.1	-	1		EHEC
O169:H9	1	1.1	-	1		EIEC
O152:H4 (1); O129:H4 (1); O100:H12 (1); O100:H4 (1); O32:H4 (1); O29:H10 (1); O25:H18 (1); O18ac:H14 (1); O12:H36 (1); O8:H7 (1); O8:H4 (2); O3:H16 (1); O1:H34 (1); OR:H34 (1); OR:H23 (1); OR:H7 (1); OR:H6 (1); OR:H (2); O?:H9 (2); O?:H6 (2); O?H4 (3)	27	28.4	6	21	NA* (28.4%)	
*NA: No asociado a ningún patotipo.	95	100	14	81		

En segundo lugar se determinó el resistotipo de cada una de las 81 cepas resistentes a partir de resultados previos de la determinación de los perfiles de susceptibilidad a 12 antibióticos pertenecientes a seis familias realizado en los trabajos de tesis de Molina, Martínez y Aroche en el periodo del 2010 al 2011 teniendo como resultado 50 resistotipos diferentes (Ver anexo 5) en donde resaltan aquellos patrones resistentes a 7 antibióticos (7 cepas), 8 antibióticos (una cepa) y 11 antibióticos (una cepa) (Ver tabla 8).

Tabla 8. Resistotipos de cepas de *E. coli* aisladas a partir de ITU con mayor resistencia a antibióticos.

Perfil de resistencia antibiótica												#cepas	# de antibióticos resistentes	#de familias resistentes
Aminoglucósidos			Beta-Lactámicos					Quinolonas	STX	CL	NF			
AK	GE	NET	AM	Cefalosporinas				2da Generación						
				1ra Generación	3ra Generación		4ra Generación	LEV						
				CF	CRO	CTX	FEP							
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	11	6
S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	1	8	4
S	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	7	7	5
R	S	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R		7	5
S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S		7	4
S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S		7	3
S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S		7	3
S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S		7	3
S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S		7	3

Observamos que 6 son los resistotipos más frecuentes, de los cuales son resistentes a 4 y 3 familias de antibióticos (uno y dos resistotipos diferentes respectivamente) en segundo lugar tenemos a aquellos resistentes a 2 familias (dos resistotipos) y en último lugar encontramos un resistotipo frecuente resistente a una sola familia de antibióticos (Ver tabla 9). Cabe mencionar que la resistencia a ampicilina y trimetropim/sulfametoxazol es el factor común en la mayoría de los resistotipos predominantes.

Tabla 9. Resistotipos más frecuentes de cepas de *E. coli* aisladas de ITU.

Perfil de resistencia antibiótica												
Aminoglucósidos			Beta-Lactámicos					Quinolonas 2da Generación	STX	CL	NF	# Cepas
AK	GE	NET	AM	Cefalosporinas			LEV					
				1ra Generación	3ra Generación	4ta Generación						
				CF	CRO	CTX		FEP				
S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	7
S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	4
S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	4
S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	4
S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	4
S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	4

Usando los mismos datos de susceptibilidad y resistencia antibiótica a 12 antibióticos, obtenidos en el trabajo de Molina, Martínez y Arroche en el periodo del 2010 al 2011, se graficó el porcentaje de resistencia a cada antibiótico observando una mayor resistencia a ampicilina (60% de las cepas), cefalotina (53.7%), levofloxacin (48.4%) y trimetropim-sulfametoxazol 48.3% (Ver figura 12).

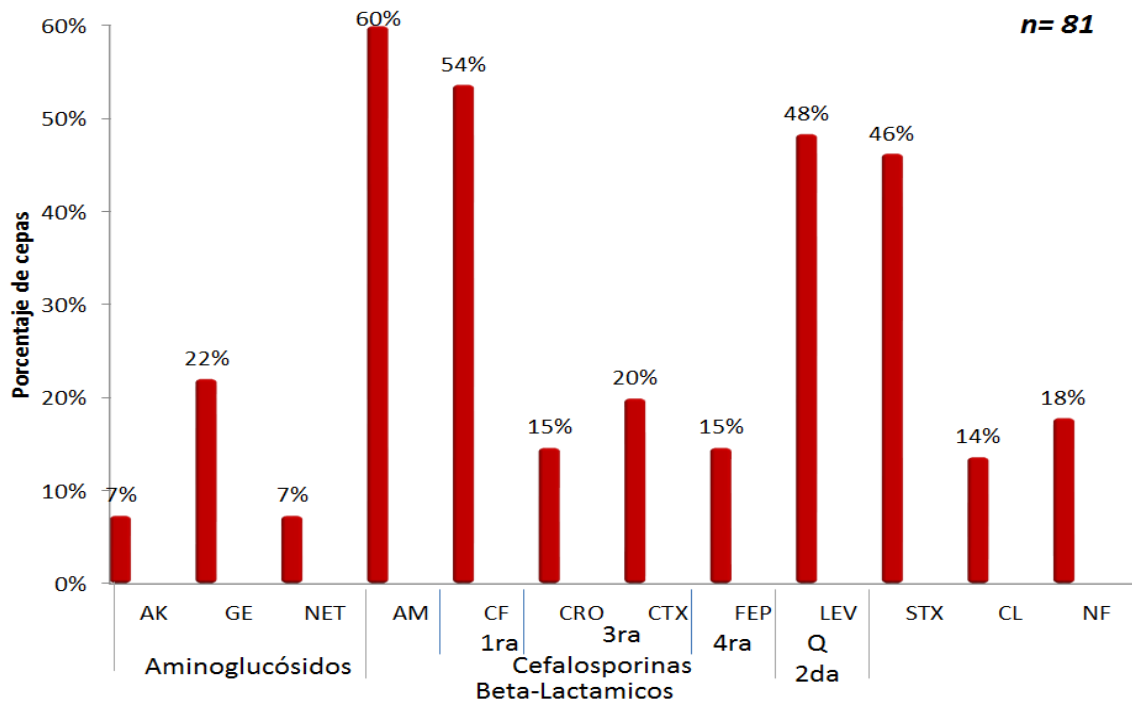


Figura 12. Resistencia de cepas UPEC a diferentes antibióticos. AK= Amikacina, GE= Gentamicina, NET= Netilmicina, AM= Ampicilina, CF= Cefalotina, CRO= Ceftriaxona, CTX= Cefotaxima, FEP= Cefepime, LEV= Levofloxacin, STX= Trimetropim/Sulfametoxazol, CL= Cloranfenicol, NF= Nitrofurantoina.

Se tomó como referencia, la clasificación que propone Magiorakos et. al., 2012, para la clasificación de las cepas de E coli usadas en este estudio en sensibles (S), no multidrogo-resistentes (No MDR), multidrogo-resistentes (MDR) y extremadamente-drogo-resistente (XDR) en el caso de enterobacterias. El 14.7% de las cepas son sensibles a todos los antibióticos utilizados, esto es un resultado que esperábamos ya que lo consideramos en la preselección de las cepas. Respecto al análisis de las cepas resistentes, el 32.6% son No MDR, mientras que el 46.3% de las cepas son MDR y finalmente el 6.3% son XDR. (Ver figura 13).

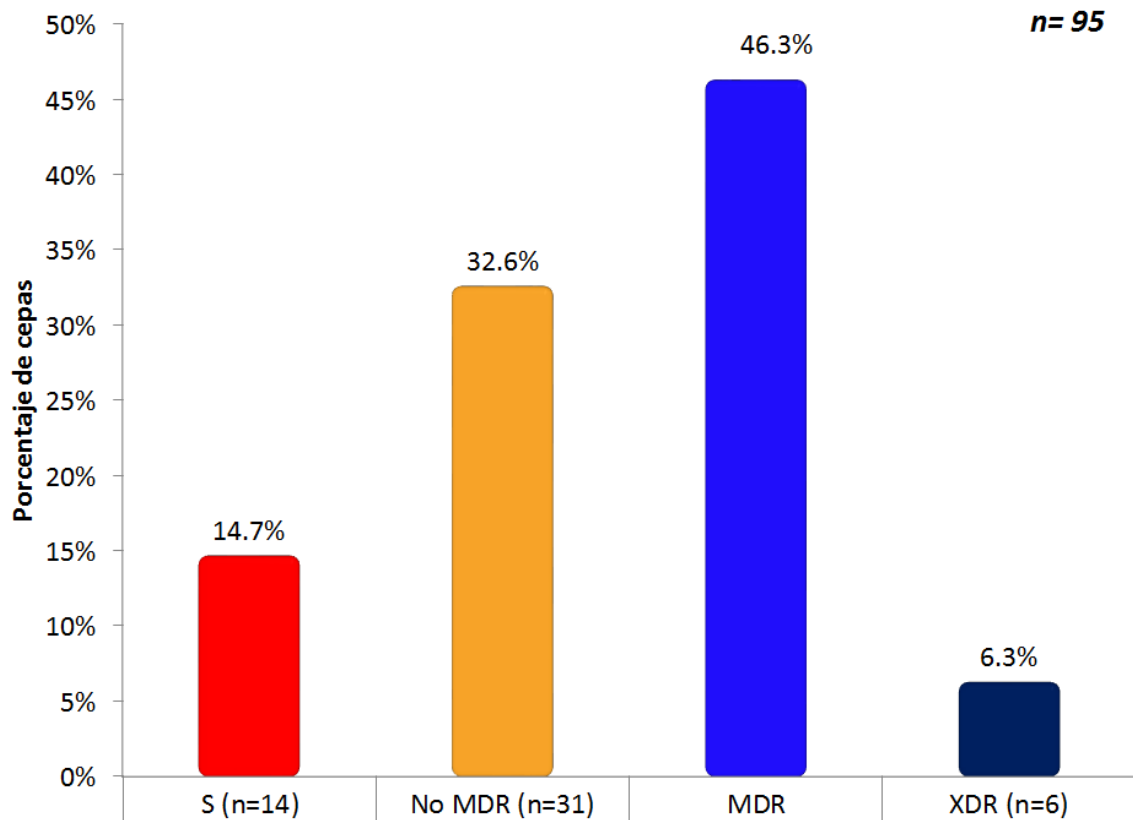


Figura 13. Porcentaje de cepas sensibles (S), no multidrogo resistentes (No MDR), multidrogo resistentes (MDR) y extremadamente-drogo resistente (XDR). Se observan claramente en el grafico que las cepas de estudio de concentran en mayor porcentaje en el grupo de MDR. De manera preocupante podemos ver un 6.3% de cepas XDR, es decir, resistentes a todo el esquema de antibióticos utilizados en este trabajo.

Para llevar a cabo la determinación de grupo filogenético y de los factores de virulencia, primero se procedió a la extracción del ADN genómico de cada una de las 95 cepas mediante el método descrito en material y métodos. Para que se pudiera considerar como una extracción de material genómico de buena calidad para la realización de los PCR's se determinó la pureza de cada extracción mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (figura 14) y por la determinación de la densidad óptica (D.O.) a 260 nm en el espectrofotómetro (DO_{260nm}). La lectura de DO_{260nm} es importante para estandarizar la concentración a la que se usa el material genético en la reacción de PCR.

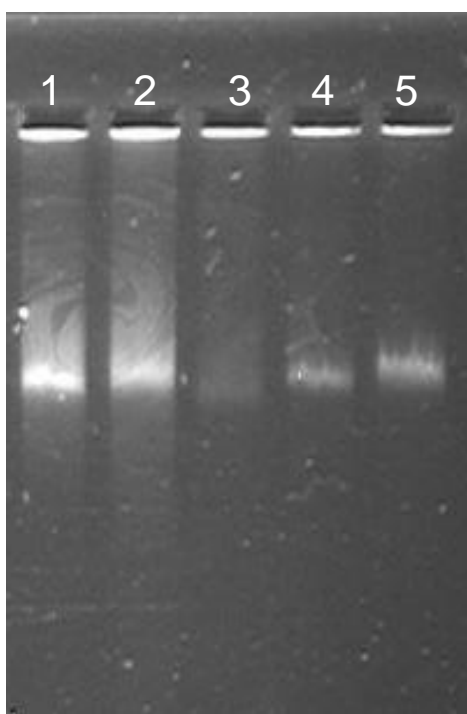


Figura 14. ADN genómico como templado de la reacción de PCR para la determinación del grupo filogenético y factores de virulencia. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa, al 0.7%, de extracción de ADN cromosomal de cepas UPEC aisladas de ITU. Carril 1. CR21, Carril 2. CR196, Carril 3. 02I, Carril 4. 06H, Carril 5. 07H.

Para la determinación de los grupos filogenéticos, se utilizó el ADN genómico como templado para el PCR múltiple y así identificar la presencia y/o ausencia de dos genes, *chuA* (279 pb), *yjaA* (211 pb), y del fragmento cromosomal TSPE4.C2 (152 pb) según lo establecido bajo el protocolo de Clermont y colaboradores en el 2000. En estos ensayos se usó como control positivo la cepa gAg1 y como control negativo la mezcla para el PCR sin ADN (Figura 15). Se realizaron de manera adicional e individual dos PCR's como complemento de este ensayo con el fin de determinar cepas pertenecientes a los grupos filogenéticos E que amplifican el gen *arpA* (301 pb) y C que amplifican el gen *trpA* (219 pb) (Figura 16). En el anexo 6 se muestra una tabla que indica cada una de las cepas a las que se les realizó PCR individual para la reasignación de grupo filogenético bajo los criterios establecidos por Clermont y colaboradores en 2012.

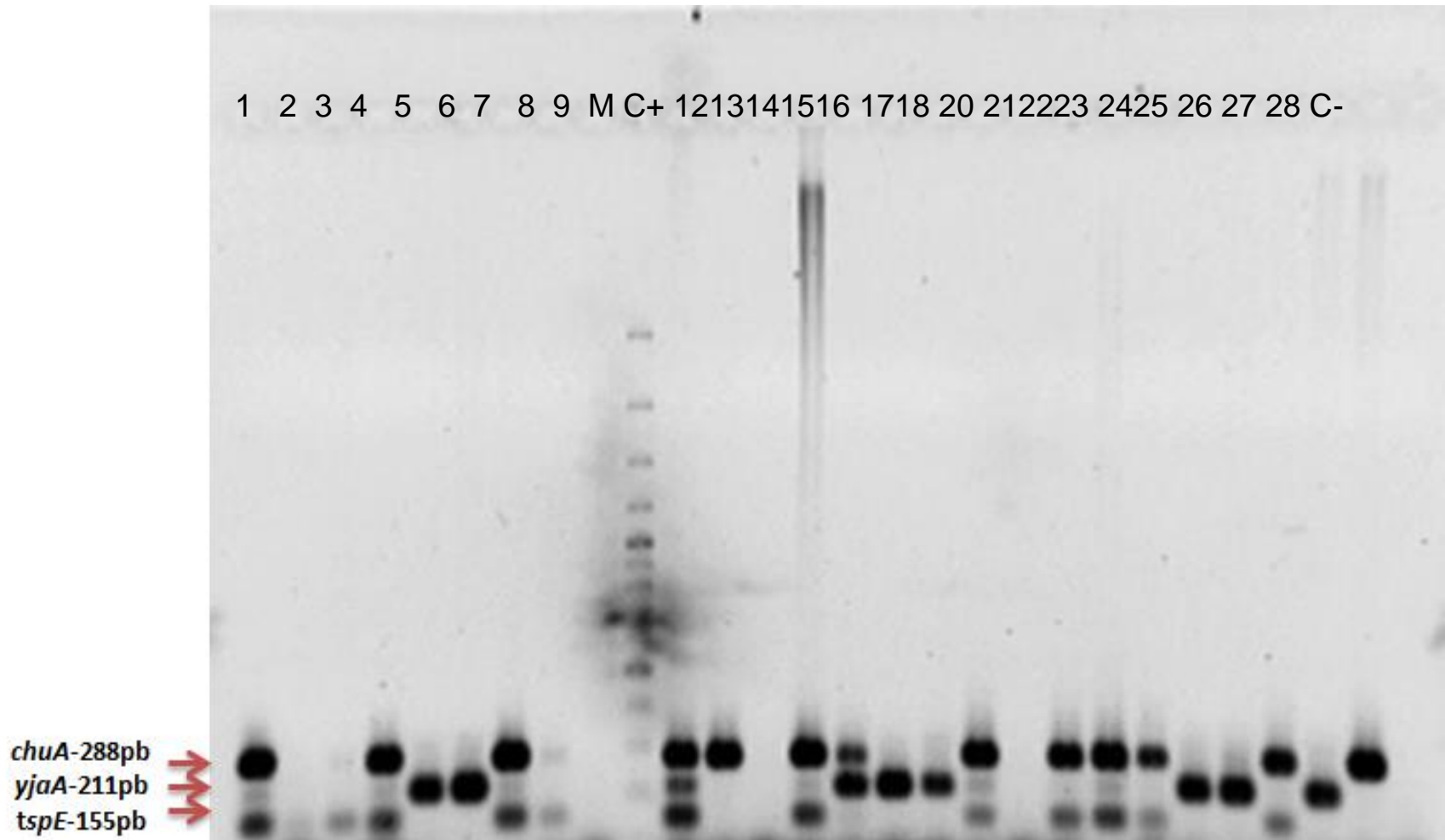


Figura 15. Determinación de grupos filogenéticos a cepas de *Escherichia coli* por el método descrito por Clermont en el 2000. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR múltiple para genes *chuA*, *yjaA* y fragmento TspE4.C2 en cepas de *E. coli* aisladas de ITU. C+: control positivo (gAg1). C-: Control negativo. M: marcador 100 pb plus Grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D.

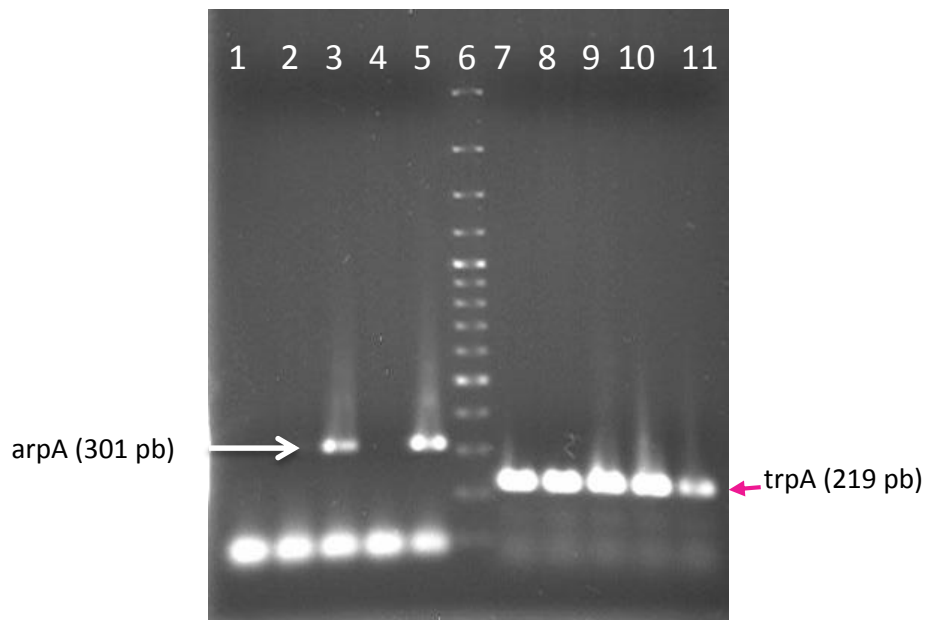


Figura 16. Determinación de grupos filogenéticos C y E a cepas de *E. coli*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR individual para genes *arpa* (grupo C) y *trpA* (filogrupos E) en cepas de *E. coli* aisladas de ITU. Carril 5: control positivo (C7204) y Carril 10: control positivo (C77206). Carril 1: Control negativo. Carril 6: marcador moléculas 100 pb plus ADN Ladder. La determinación de los grupos filogenéticos se realizó con base a Clermont *et. al.*, 2012.

Los resultados de este análisis revelan que la mayor incidencia recae en el grupo filogenético B2 con el 44.2% y con 23.2% el grupo F. Los grupos filogenéticos de menor incidencia fueron el filogrupos A y B1 con el 3.2% y por último el grupo E (2.1%) (Figura 17, panel A). En conjunto se realizó el análisis de sensibilidad y resistencia con respecto al grupo filogenético obteniendo que el 50% de las cepas sensibles se localiza en el filogrupos B2, en segundo lugar de susceptibilidad tenemos al grupo filogenético C con el 28.6%; mientras que en los filogrupos A, B1 y D no poseen cepas sensibles. Los filogrupos que presentan el mayor porcentaje de cepas resistentes son: B2 (43.2%) y el F (24.7%) (Ver figura 17, panel B).

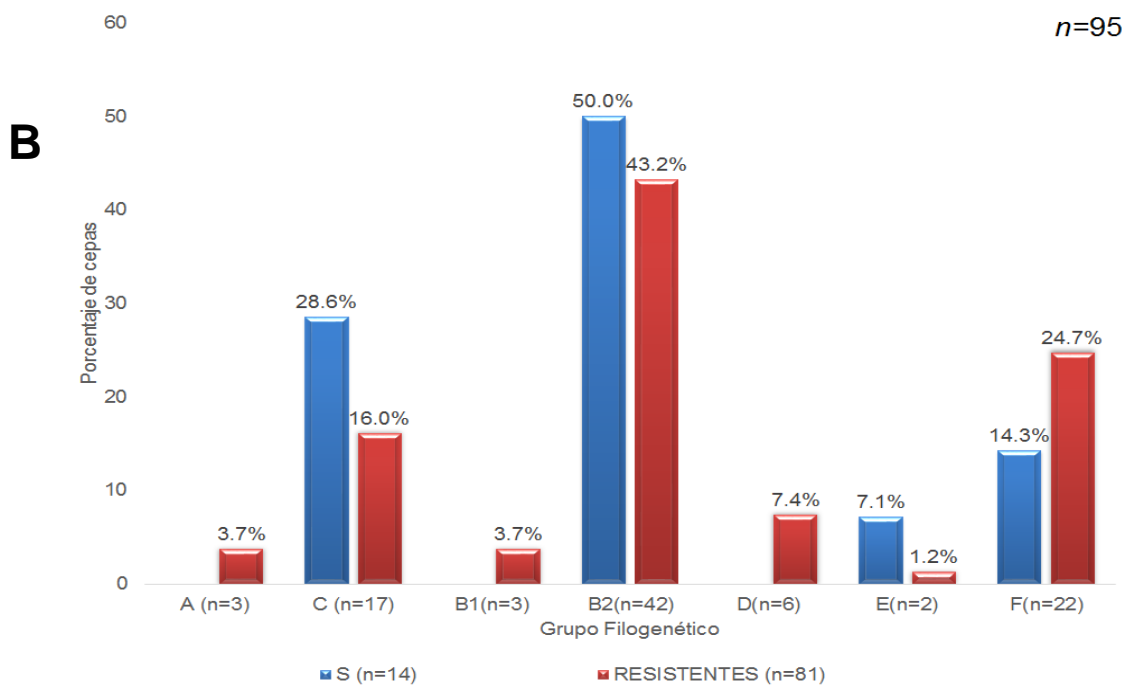
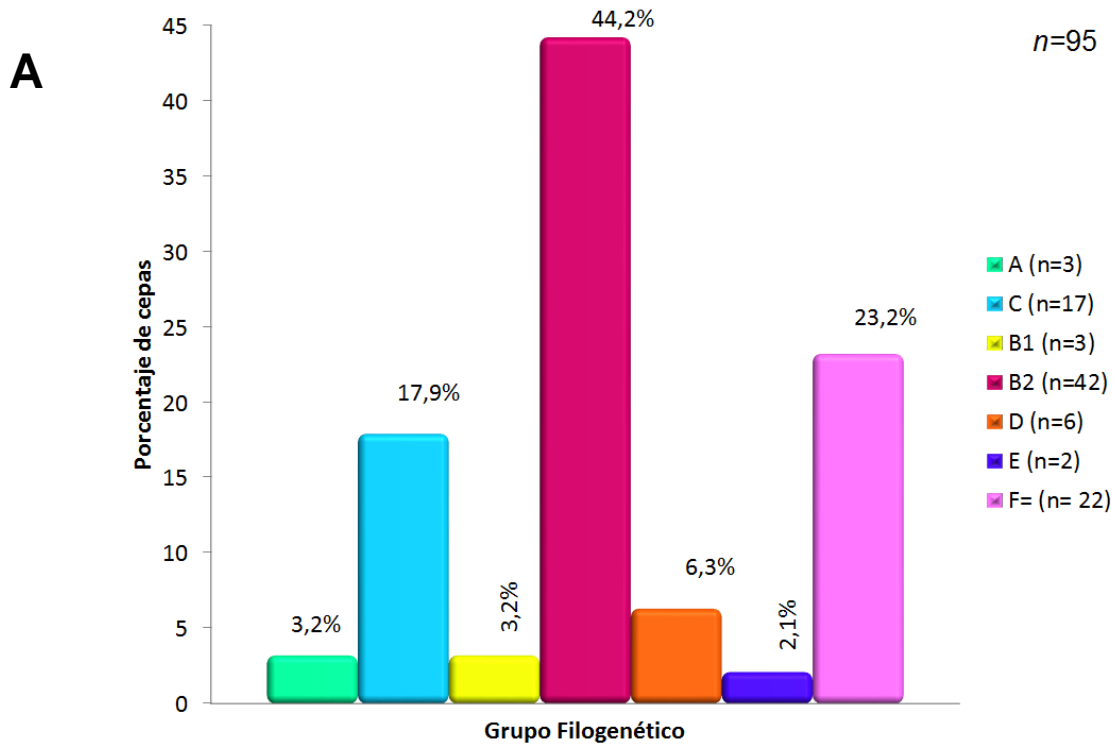


Figura 17. A) Distribución de grupos filogenéticos de UPEC. La clasificación filogenética de 95 cepas de *E. coli* se basó en presencia o ausencia de los dos genes de interés (*chuA* y *yjaA*) y del fragmento cromosomal TSPE4.C: Grupo A (puede o no estar presente *yjaA*), C (presencia o ausencia de *yjaA* y *trpA*), B1 (presencia de TSPE4.C2 y/o *yjaA*), grupo B2 (presencia de *chuA*, *yjaA* y/o TSPE4.C2), el filogruppo D (presencia de *chuA* y/o TSPE4.C2), E (la presencia de *chuA*, TSPE.4C2 y *arpA*) y el grupo F (presencia de *chuA*). **B) Distribución de resistencia y Susceptibilidad por grupo filogenético de cepas de *E.coli* aisladas de ITU.**

Además, analizamos la asociación de los grupos filogenéticos de las cepas con la clasificación de tipos de resistencia (esquema de Magiorakos). Este análisis indica que el mayor porcentaje de cepas MDR pertenecen al grupo filogenético B2 con un 17.9%, seguido por el filogrupo F con un 13.7% y en tercer lugar tenemos al grupo C (7.4%). Las cepas del grupo filogenético B2 se encuentran distribuidas en las cuatro categorías de la clasificación de Magiorakos y cabe destacar que el porcentaje más alto está representado por aquellas que pertenecen a las No MDR y MDR. Además la proporción entre las cepas NO MDR (16.8%) es muy similar a aquella de la MDR (17.9%). Las cepas sensibles caen dentro de los grupos filogenéticos B2, C F y E. Como podemos observar las cepas XDR se encuentran

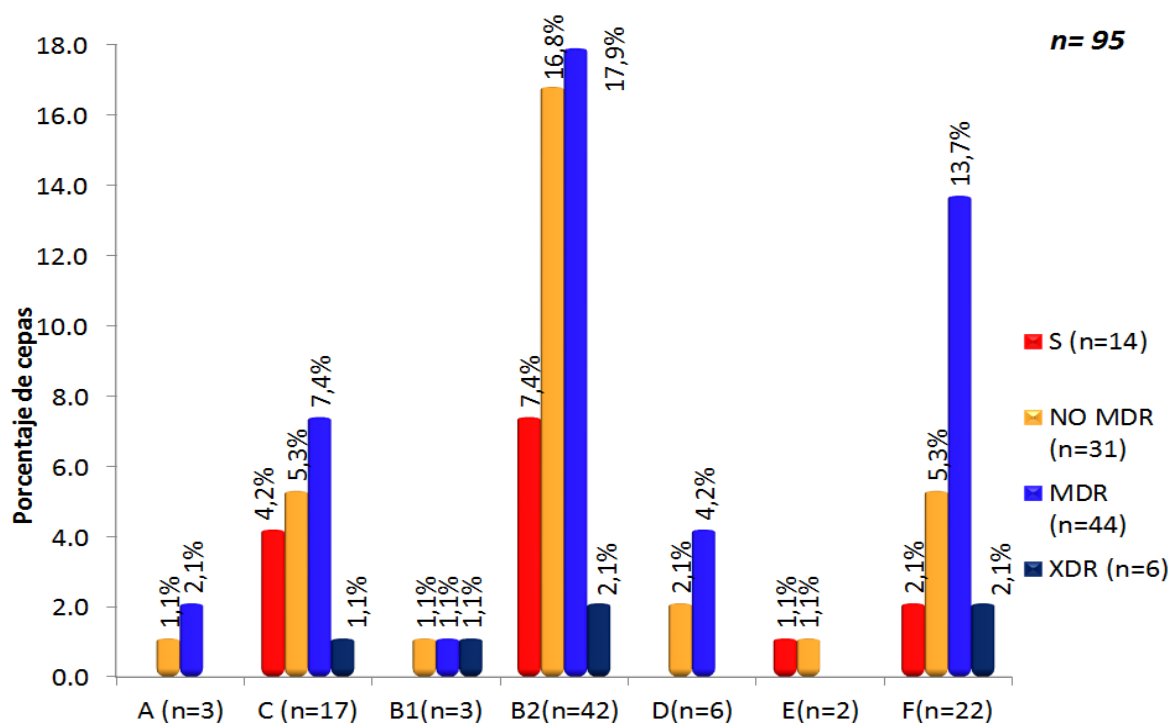


Figura 18. Relación entre grupos filogenéticos y tipos de resistencia antibiótica de *E. coli* aisladas de ITU. Se muestra el porcentaje de cepas de cada grupo filogenético con respecto al análisis de los perfiles de resistencia. **S. sensibles, no MDR. No multidrogo resistente, MDR. Multidrogo-resistente y XDR. Extremadamente resistente.**

en los filogrupos patógenos B2 y F, con 2.1% cada uno, y con 1.1% de las cepas de la misma clasificación en grupos comensales, B1 y C (Ver figura 18).

Así mismo, se graficaron los resultados de la determinación del grupo filogenético respecto al lugar de procedencia de las cepas (figura 19, panel A) teniendo como resultado que en el laboratorio particular 1 solo se obtuvieron cepas características de los filogrupos B2 (2.1%) y F (3.2%), en cambio en el laboratorio particular 2, donde los principales filogrupos son B2 (33.7%), F (14.7%) y C (9.5%); y en el laboratorio de hospital de salud pública, grupos filogenéticos principales B5 y C (8.4%) y F (5.3%); se obtuvieron cepas características de los 7 filogrupos estudiados en este trabajo. Adicionalmente se relacionó la susceptibilidad o resistencia a antibióticos encontrando que de los tres laboratorios, en el laboratorio 1 no hubo cepas sensibles. Los grupos filogenéticos A, B1, D y E (3.1%, 3.1, 6.3% y 2.0% respectivamente) fueron cepas aisladas del laboratorio 2 y el laboratorio de hospital de salud pública, en ambos lugares el mayor porcentaje de las cepas (13.5%) no presentan susceptibilidad a antibióticos a excepción del grupo filogenético E (1.0%) que presenta susceptibilidad. Los aislados del laboratorio 1 se clasificaron como filogrupos B2 (2.1%) y F (3.1%) (Ver figura 19, B).

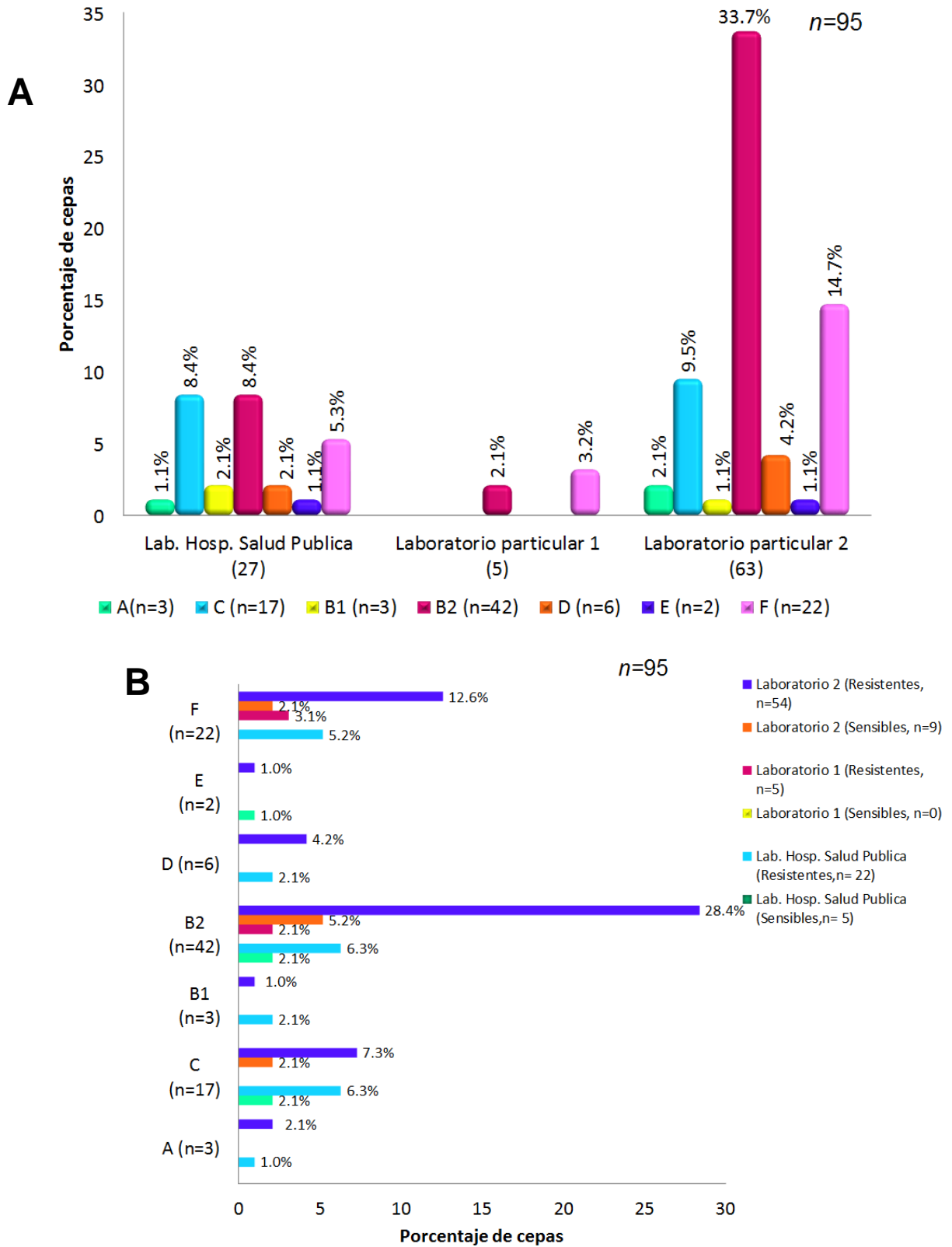


Figura 19. A) Distribución de filogenia por lugar de procedencia. B) Distribución de grupos filogenéticos de UPEC por lugar de procedencia y resistencia o sensibilidad a antibióticos.

El análisis de la relación entre la resistencia a cada antibiótico respecto al grupo filogenético indica un predominio de cepas del grupo filogenético B2 que son resistentes todos los antibióticos excepto a AK y NET y en segundo lugar aparece el grupo filogenético F (Ver figura 20). Como ya se indicó en resultados previos, la mayor resistencia se presenta al grupo de los beta-lactámicos AM y CF, seguido de la resistencia a trimetropim-sulfametoxazol.

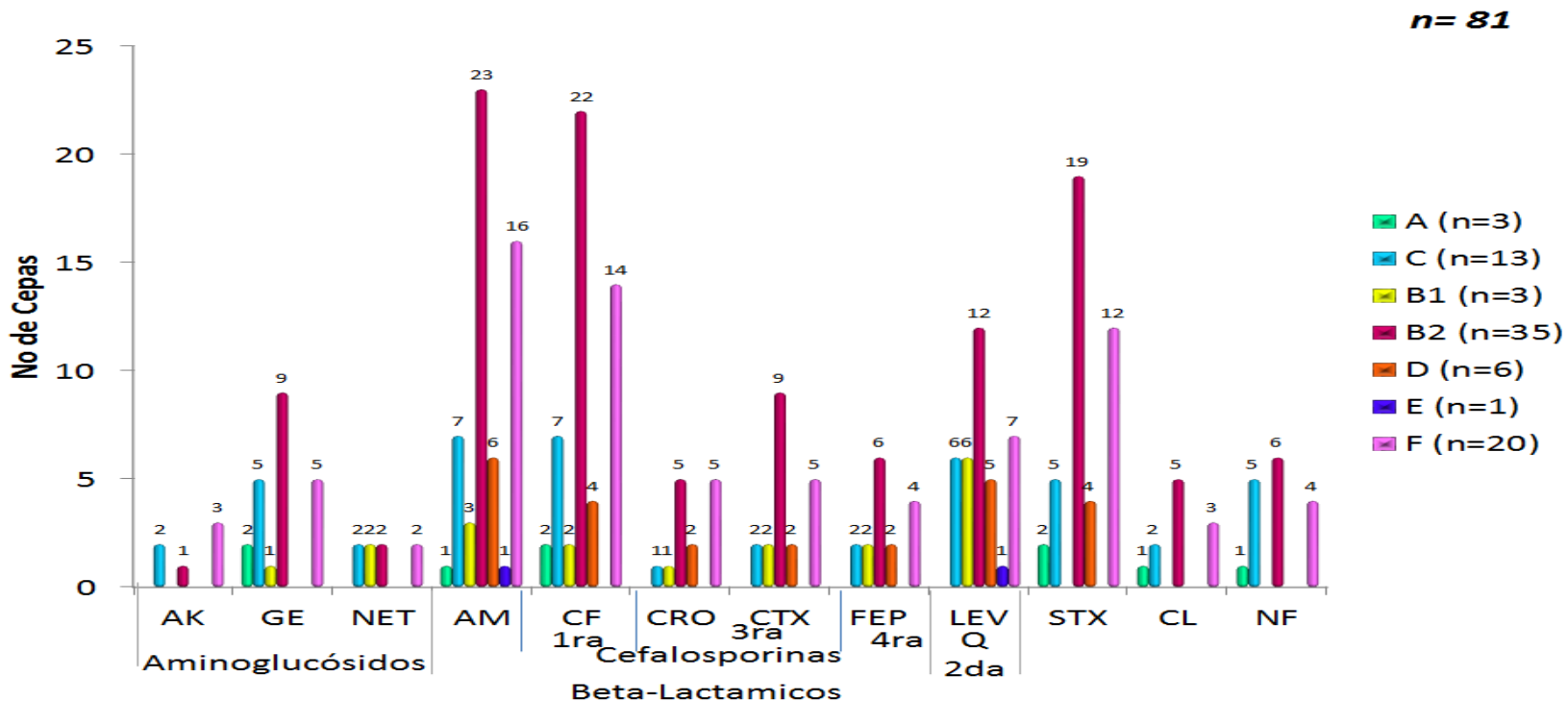


Figura 20. Relación entre perfil de resistencia a 12 antibióticos (6 familias) y los grupos filogenéticos de cepas de *E. coli* aisladas de ITU (n=81). Se grafica el porcentaje de cepas resistentes a cada antibiótico y se señala con barras en colores su pertenencia a cada grupo filogenético. AK= Amikacina, GE= Gentamicina, NET= Netilmicina, AM= Ampicilina, CF= Cefalotina, CRO= Ceftriaxona, CTX= Cefotaxima, FEP= Cefepime, LEV= Levofloxacina, STX= Trimetropim/Sulfametoxazol, CL= Cloranfenicol, NF= Nitrofurantoina,

Como parte del trabajo para la determinación de la presencia o ausencia de genes que codifican a 9 diferentes factores de virulencia de UPEC, se realizó la estandarización de dos PCRm utilizando templados de ADN de cepas control (ver tabla 2). Primero se llevaron a cabo PCR individuales para los genes *papA*, *papGIII*, *papGII*, *papGI*, *vatA*, *vatP*, *iha*, *hlyA*, *satP* y *papA* (Figura 21).

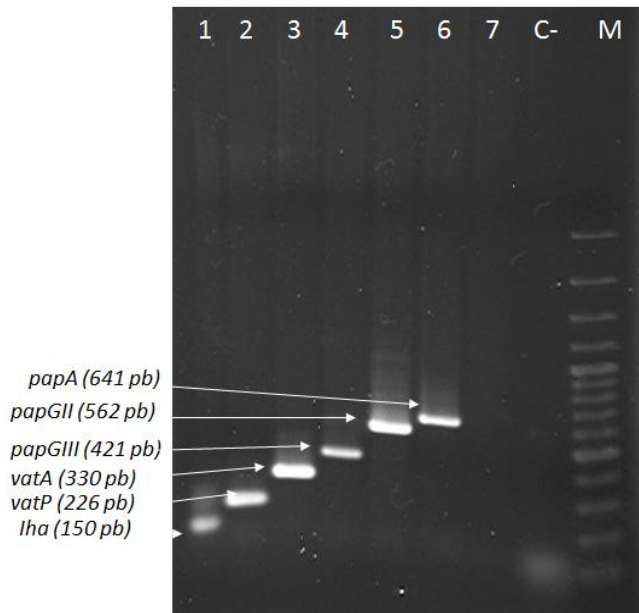


Figura 21. PCR individual para genes de virulencia: *iha*, *vatP*, *vatA*, *papA*, *papGI*, *papGII* y *papGIII*. Gel representativo del PCR individual para la amplificación de los genes de virulencia de UPEC: Carril 1: *iha* (150 pb), templado CR16. Carril 2: *vatP* (226 pb), templado 059I. Carril 3: *vatA* (330 pb), templado 059I. Carril 4: *papGIII* (421 pb), templado CR16. Carril 5: *papGII* (562 pb) templado CFT073. Carril 6: *papA* (641 pb), templado CFT073. Carril 7: -. C-: Control negativo. M: marcado molecular 100 pb plus ADN Ladder.

Posteriormente se procedió a la estandarización de las condiciones para el PCRm2, se realizaron diferentes pruebas usando gradiente de temperatura de alineamiento, decidiendo tomar en cuenta para este trabajo una T_m de 61.4° ya que fue en la que se presentó una mejor definición de las bandas de los productos genéticos de interés, además de que no se encontraron fragmentos de amplificación inespecífica a esta temperatura (Figura 22, A). Posteriormente se procedió a la realización de los PCR´s múltiple 3 (*papA*, *papGIII*, *papGII*, *papGI*, *vatA*, *vatP*, *iha*) (ver figura 22, B) y múltiple 3 (*hlyA*, *satP* y *papA*) (ver figura 23).

Cabe mencionar que a pesar de realizar diversas pruebas, tanto de PCR individual como en PCRM, el gen *papGI* no pudo ser amplificado usando cualquier ADN templado de las cepas control. Dentro del laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos se realizó la estandarización, por parte de miembros del laboratorio, del PCR múltiple 1 para determinar los genes *fimH*, *fliC*, *satA* e *iucD* y del PCR individual para el gen *cnf1*.

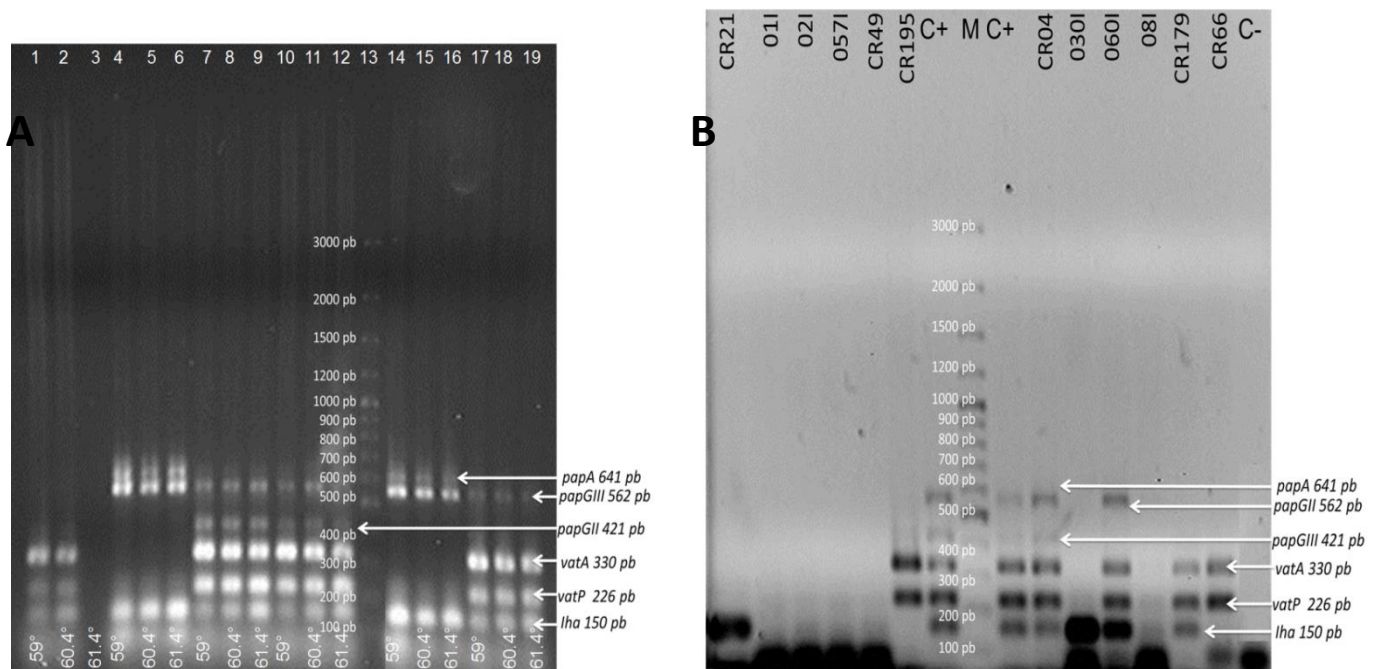


Figura 22. Estandarización de PCR múltiple 2 para la determinación de factores de virulencia. A) Estandarización del PCRM para amplificar los genes de virulencia *iha*, *vatP*, *vatA*, *papA*, *papGI*, *papGII* y *papGIII*. Gel representativo de los resultados de la estandarización del método por PCR múltiple para la amplificación de los genes de virulencia de UPEC: *iha* (150 pb), *vatP* (226 pb), *vatA* (330 pb), *papGIII* (421 pb), *papGII* (562 pb) *papGI* (692 pb) y *papA* (641 pb); a 3 diferentes temperaturas (59.0°, 60.4° y 61.4°). Carril 1, 2 y 3: Mezcla de templados de las cepas CFT073 (*papA*, *papGII*, *vat*, *iha*) 0591 (*papGII*, *vat* e *iha*) y CR16 (*papGII*, *papGIII* e *iha*). Carril 4, 5 y 6: Mezcla de los templados CFT073 Y CR16. Carril 7, 8 y 9: Mezcla de los templados: CFT073 Y 0591. Carril 10, 11 y 12: Mezcla de templados CR16 y 0591. Carril 13: Marcador molecular 100pb PlusADN Ladder; Carril 14, 15 y 16: cepa CR16. Carril 17, 18 y 19: Cepa 0591. **B) Identificación de factores de virulencia en cepas UPEC O25.** Gel representativo de PCR múltiple en cepas problema. C+: Control positivo mezcla de templado CFT073 + CR16; M; marcador molecular 100pb PlusADN Ladder; C-; control negativo. Cabe mencionar que la temperatura que se eligió para el trabajo fue 61.4°

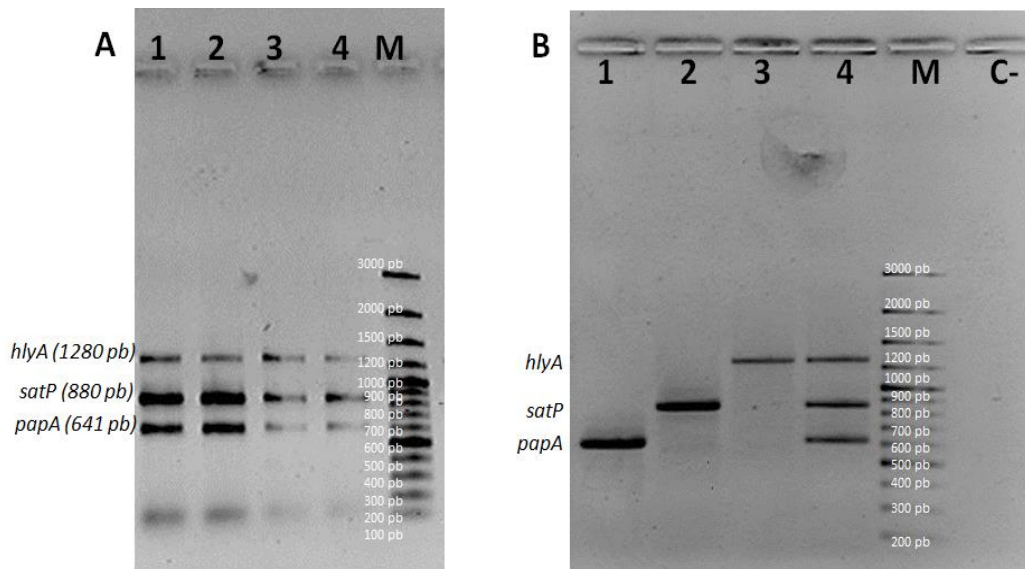


Figura 23. Estandarización de PCR múltiple 3 para la determinación de factores de virulencia. A) Estandarización del PCRm para *papA*, *satP* y *hlyA*. Gel representativo de los resultados de la estandarización del PCR múltiple para la amplificación de tres genes: *papA* (641 pb), *satP* (880 pb) y *hlyA* (1280 pb); a 4 diferentes temperaturas. Carril 1. 57.7°; carril 2. 59.9°; carril 3. 60.4° y carril 4. 61.4° (correspondiente a cada temperatura): Templado de la cepa gAg1. M: Marcador molecular 100pb PlusADN Ladder. **B) Fotografía correspondiente al gel de agarosa al 1.0% de los PCR individuales y el PCRm.** PCR individual: Carril 1: *papA* (641 pb); Carril 2: *satP* (880 pb); Carril 3: *hlyA* (1280 pb). Carril 4: PCR múltiple para los tres genes. M: marcador molecular 100pb PlusADN Ladder; C-: control negativo. El templado usado fue gAg1 y la temperatura de alineación fue 61.4°.

Después de la estandarización de los PCR múltiples y el PCR individual se procedió a llevar a cabo los ensayos con las 95 cepas de *E. coli* aisladas de ITU para determinar la presencia o ausencia de los 13 fragmentos genéticos (figura 24) que codifican para un total de 9 factores de virulencia de UPEC. Como resultado se encontró que el gen más frecuente es *fimH* presente en el 74.7% de los aislado, seguido de *iucD* 72.6% y en menor porcentaje son *papA*, *paGIII*, *papGII* y *cnf1*, con 5.3%, 5,3%, 4.2% y 6.3% respectivamente. (Figura 25). En el caso de los genes *sat* y *vat*, el gen completo es muy grande (3,900 pb y 4,131 pb respectivamente), por lo que se amplificaron dos fragmentos: la región peptidasa (*vatP* y *satP* respectivamente) y la región autotransportadora (*vatA* y *satA*) para considerar al

gen completo, es decir, que el gen posea la información que requiere la proteína para su actividad enzimática y de secreción. El mismo caso presenta para el gen *pap*, para el cual se tomó dos amplificado para considerar al gen completo, con la diferencia de que para considerar completo al gen debía de estar presente *papA* (que es la subunidad mayor) y uno de los tres alelos de la adhesina (*papGI*, *papGII* o *papGIII*). Por este motivo de 14 genes se pasó a considerar 9 factores de virulencia, debido a las asociaciones que se realizaron par *vat*, *sat* y *pap*. Con respecto a los 9 factores de virulencia se observó que los que se presentan con una mayor frecuencia son: *fimH* (74.7%), *iucD* (72.6%) e *iha* (53.7%), y los menos frecuentes son *cnf-1* (6.3%), *papA* y *papGIII* (5.3%) y *papGII* (4.2%) (Figura 26).

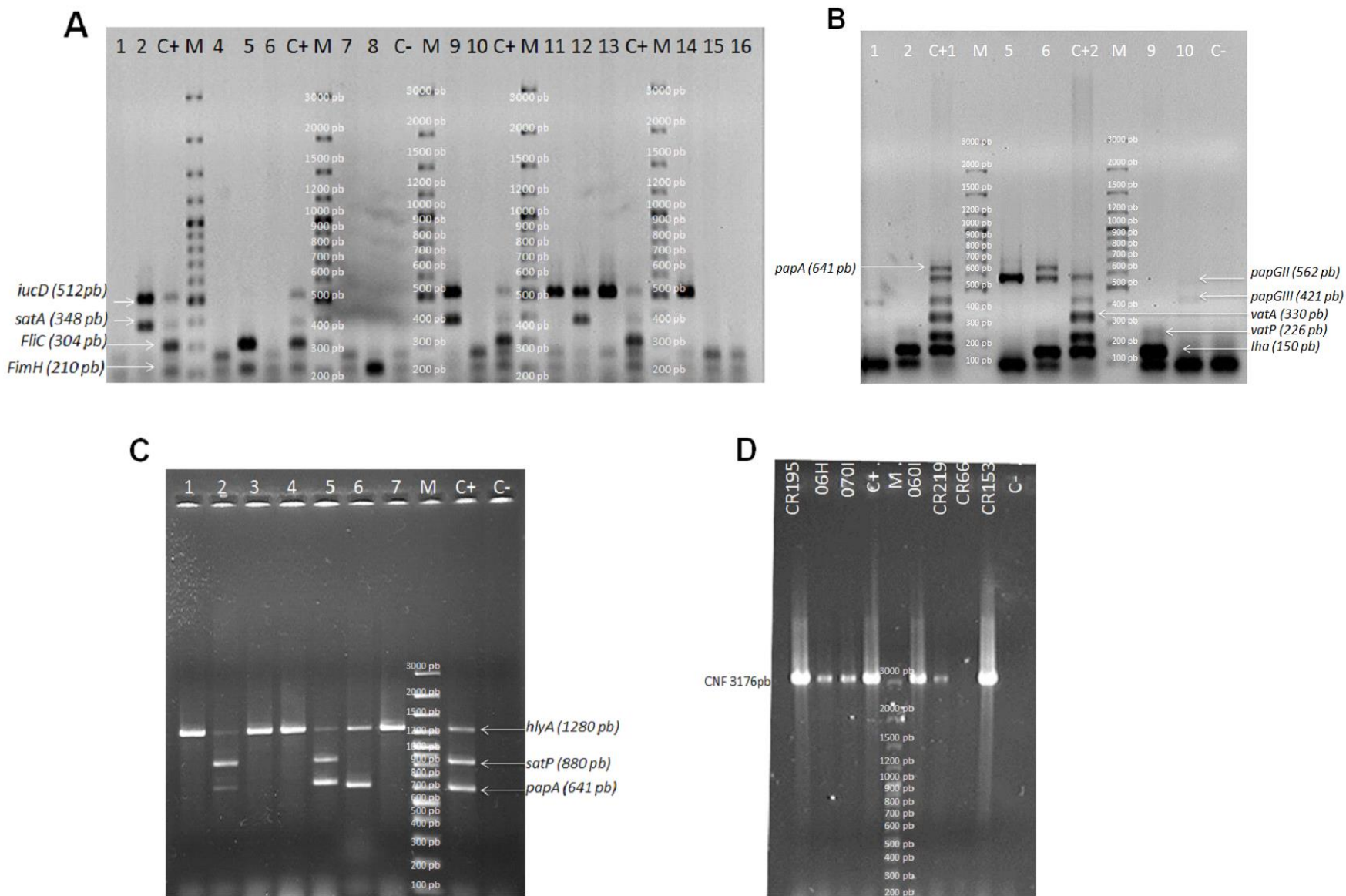


Figura 24. Geles representativos de los productos de los diferentes PCR's con cepas de *E. coli* aisladas de ITU. A) Gel representativo de los resultados del PCRm 1: *fim* (210 pb), *fliC* (304 pb), *satA* (384) e *iucD* (512 pb); para algunas muestras problema, control positivo: gAg1. **B)** Gel representativo de resultados del PCRm 2: *iha* (150 pb), *vatP* (226 pb), *vatA* (330 pb), *papGIII* (421 pb), *papGII* (562 pb) *papGI* (692 pb) y *papA* (641 pb); para cepas problema, control positivo, CFT073. **C)** Gel representativos de resultados del PCRm 3: *papA* (641 pb), *satP* (880 pb) y *hlyA* (1280 pb), control positivo gAg1. **D)** Gel representativo de los resultados para el PCR individual para *cnf* (3176 pb), control positivo: gAg1.

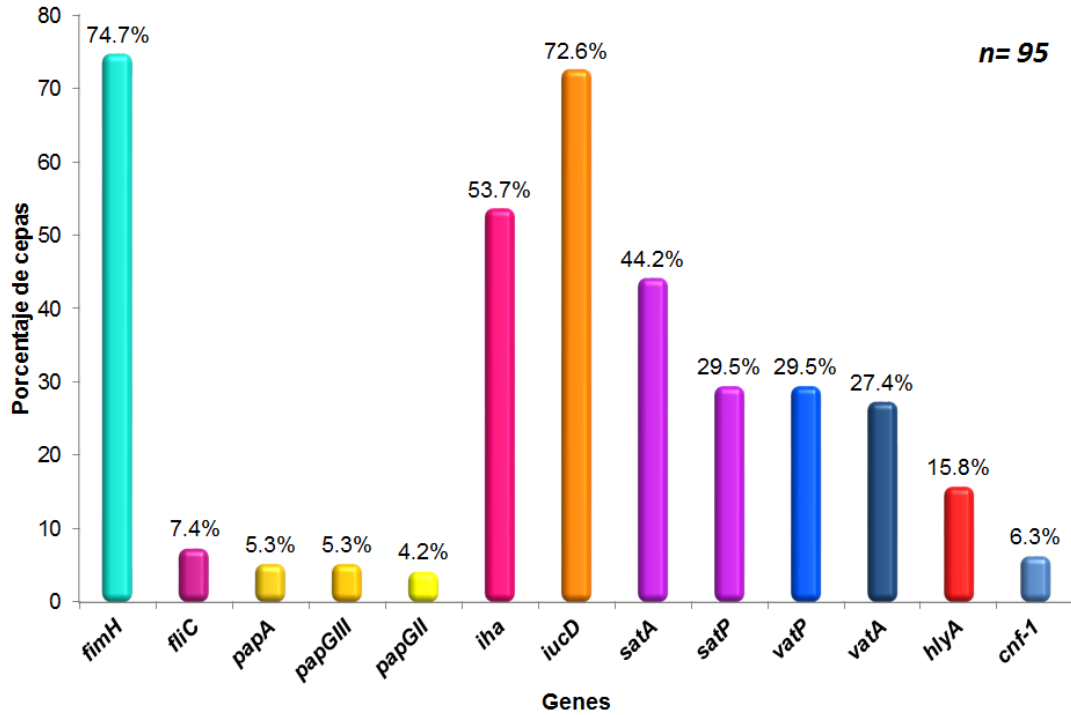


Figura 25. Porcentaje de genes de virulencia en cepas de *E. coli* aisladas de ITU. Se muestra el porcentaje en el que se presentaron los 14 genes en las 95 cepas de UPEC. *fimH* (fimbria tipo 1), *fliC* (adhesina flagelar), *papA* (subunidad estructural principal de fimbria P), *papGI*, *papGII* o *papGIII* (alelos de adhesina del pili P), *iha* (adhesina homologa a IrgA), *iucD* (aerobactina), *sat* (toxina autotrasportadora secretada), *vat* (toxina autotrasportadora vacuolizante), *hlyA* (hemolisina A) y *cnf-1* (factor citotóxico necrotizante).

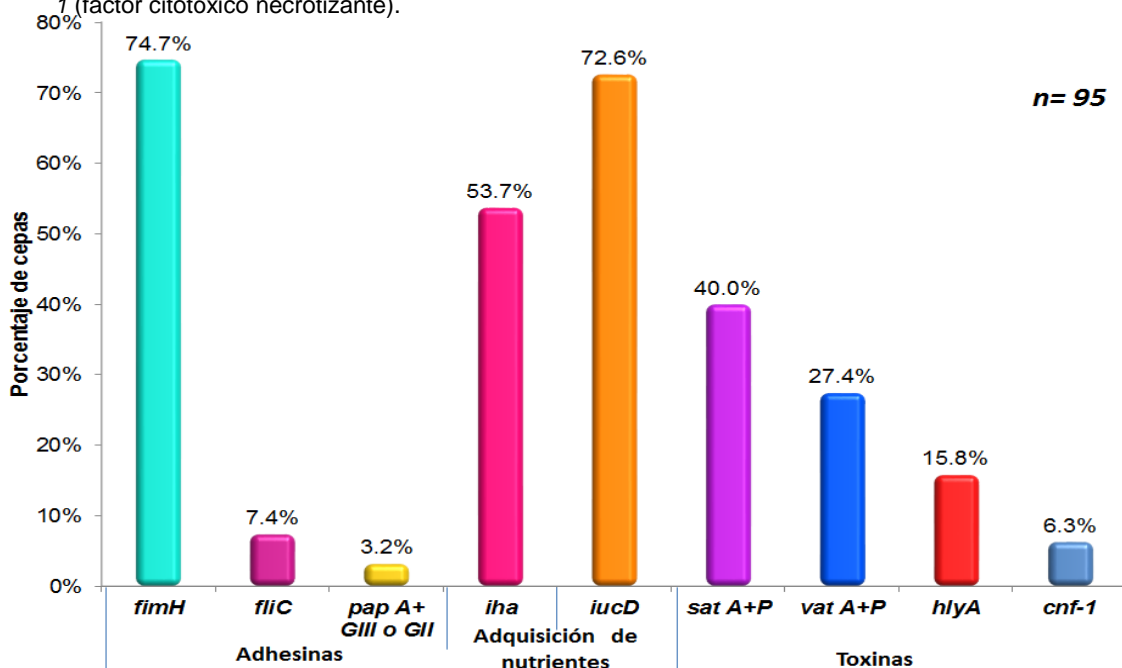


Figura 26. Porcentaje de factores de virulencia en 95 cepas de *E. coli* aisladas de ITU. Se muestra el porcentaje de cada uno de los 9 factores de virulencia de UPEC. *fimH* (fimbria tipo 1), *fliC* (adhesina flagelar), *papA* (subunidad estructural principal de fimbria P en combinación con alguna alelo de adhesina del pili P: *papGI*, *papGII* o *papGIII*), *iha* (adhesina homologa a IrgA), *iucD* (aerobactina), *sat* (toxina autotrasportadora secretada: A. región autotrasportadora + P. región peptidasa), *vat* (toxina autotrasportadora vacuolizante: A. región autotrasportadora + P. región peptidasa), *hlyA* (hemolisina A) y *cnf-1* (factor citotóxico necrotizante).

Para conocer si existe alguna relación entre las características relacionadas a la virulencia de UPEC se llevaron a cabo las comparaciones pertinentes entre las variables ya analizadas.

En primer lugar se realizó la comparación entre la filogenia y los factores de virulencia. A partir de este análisis se observó que las cepas del grupo filogenético B2, el grupo predominante, alberga el mayor número de factores de virulencia. En la figura 25 se puede observar la distribución de los factores de virulencia respecto al grupo filogenético de las 95 cepas de *E. coli* analizadas en este estudio. El filogrupo B2 posee los 9 factores de virulencia, el siguiente filogrupo que presenta un mayor número de FV, 8 de los 9 factores, es el F. Los filogrupos que presentan un menor de los FV son el C y D con 6 FV, A con cuatro y B1 con 2 FV (Ver figura 27).

De forma complementaria se realizó el análisis comparativo entre grupo filogenético, factores de virulencia y la resistencia o susceptibilidad al panel de antibióticos utilizados. (Ver figura 28). Es más que claro que en el grupo filogenético B2 se concentran el mayor número de cepas con FV así como la MDR al grupo de antibióticos utilizados en este trabajo, el grupo F posee las mismas características, un mayor número de FV y de cepas MDR. Ambos grupos filogenéticos (B2 y F) pertenecen a cepas patógenas las cuales poseen un mayor número de FV, a comparación de las cepas de los grupos filogenéticos comensales, pero deberían presentar una mayor susceptibilidad a antibióticos, lo cual no sucede en este caso puesto que de las cepas que pertenecen al filogrupo B2 y F son las que concentran el mayor número de cepas MDR y XDR.

n= 95

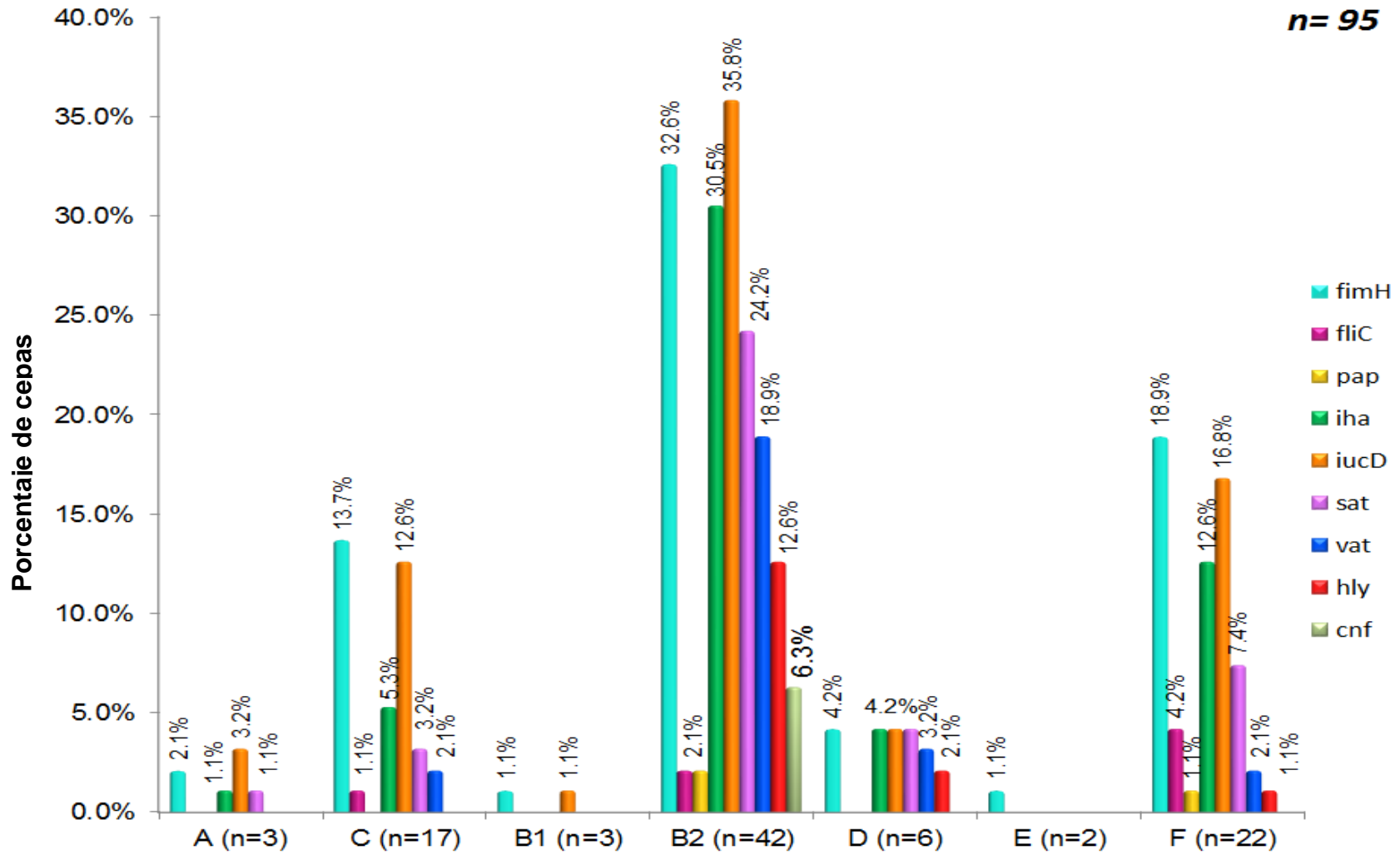


Figura 27. Relación entre grupo filogenético y factores de virulencia en cepas de E. coli aisladas de ITU. Se asoció a los cuatro grupos filogenéticos a la presencia de los 9 factores de virulencia que se analizaron.

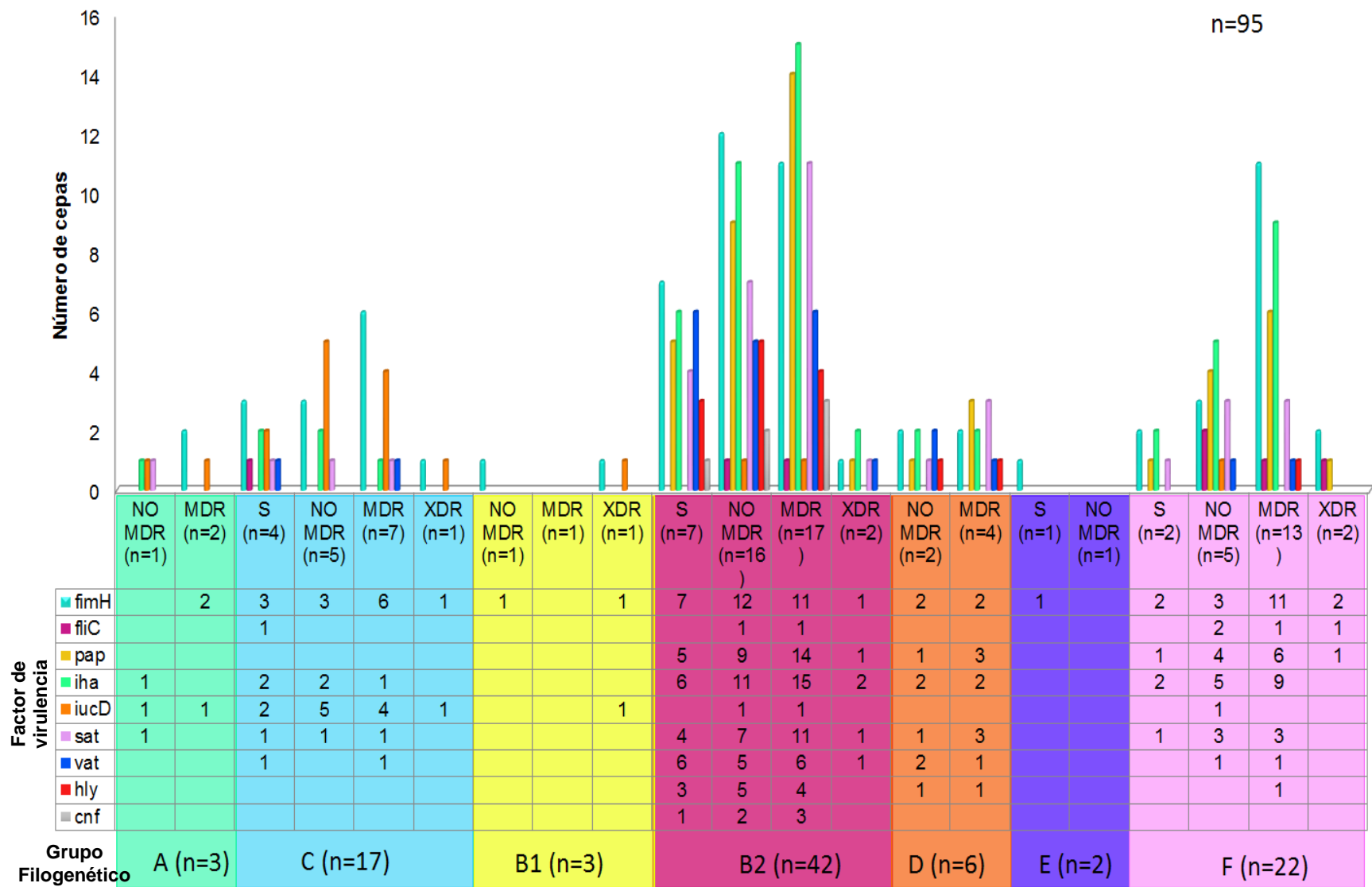


Figura 28. Asociación entre la Filogenia – Perfil de resistencia a antibióticos – Factores de virulencia.

Para el cumplimiento de otro de los objetivos de este trabajo, se llevó a cabo la extracción del material plasmídico de cada cepa y posteriormente mediante electroforesis en gel de agarosa se realizó la determinación del perfil plasmídico (número de bandas plasmídicas y tamaño relativo de cada una de estas) (Ver figura 29). De las 95 cepas estudiadas el 10% (9 cepas) no presentó plásmidos (Ver figura 30).

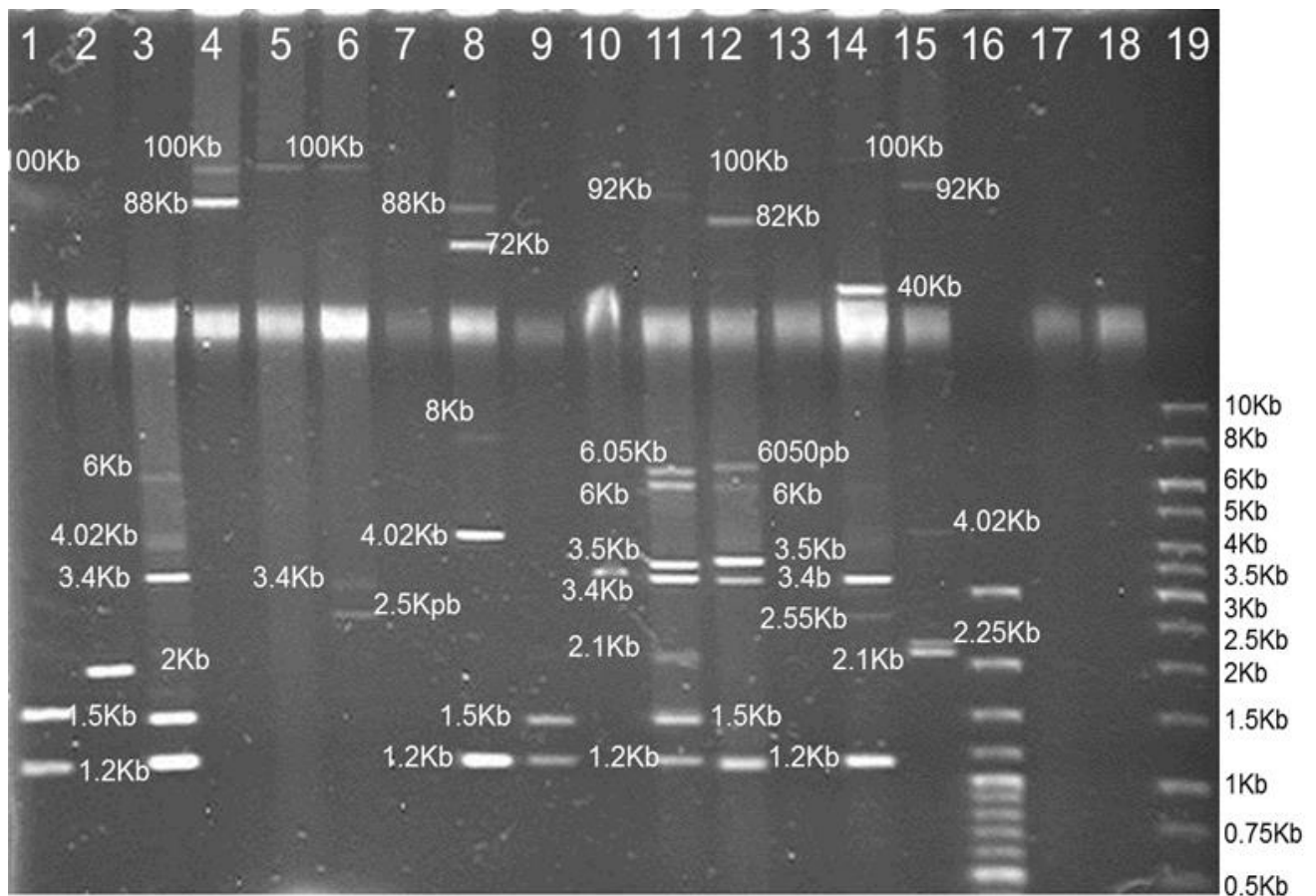


Figura 29. Resultado del corrimiento electroforético de extracción de plásmidos en gel de agarosa al 0.7% de cepas de *E. coli* aisladas de ITU. Perfil plasmídico de algunas cepas problema. Carril 1. CR04, carril 2. CR33, carril 3. CR50, carril 4. CR59, carril 5. CR98, carril 6. CR141, carril 7. CR185, carril 8. CR185, carril 9. CR222, carril.11 CR237, carril 12. 030I, carril 13. Carril 13. 070I, carril 14. 07H, carril 15. EDL (92 kb), carril 16. 100 pb plus, carril 17. 30, carril 18. 40, carril 19. 1 kb plus.

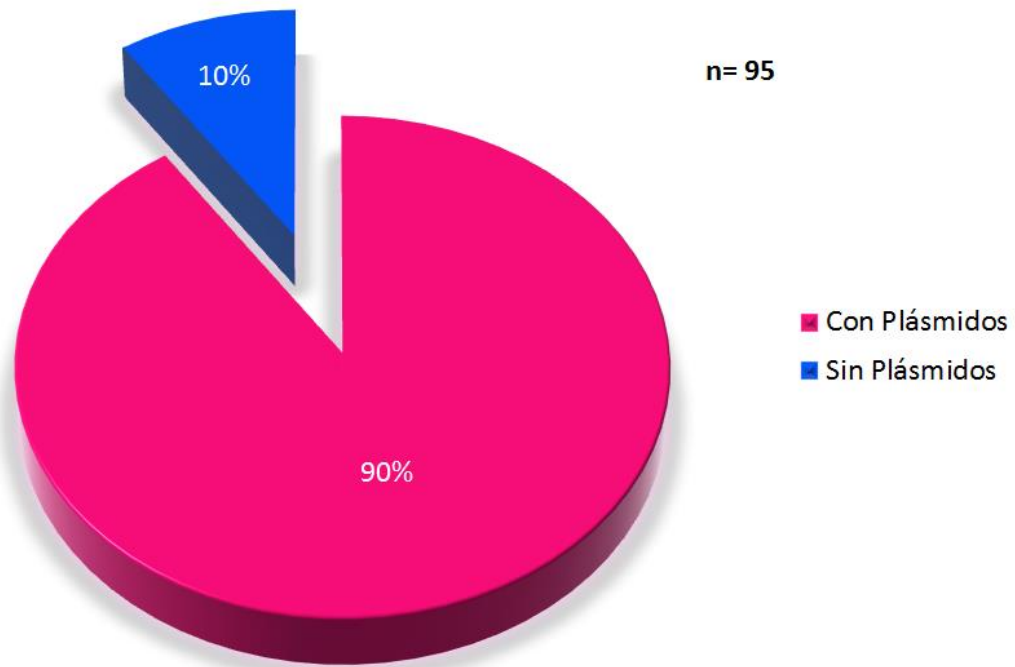


Figura 30. Presencia de plásmidos en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con ITU. De las 95 cepas 10% (9) no presentaron plásmidos y 90% (86) presentaron bandas plasmídicas.

Para las determinaciones del tamaño de las bandas plasmídicas se recurrió al uso de controles como los marcadores 1 kb plus ladder (Fermentas) y el 100 pb plus ladder (Fermentas) y para las bandas plasmídicas de mayor tamaño se usó la extracción plasmídica de EDL 933 cepa prototipo de EHEC que posee un plásmido caracterizado de 92 kb. Como resultado se obtuvieron cepas que presentan desde una hasta trece bandas plasmídicas. El número de bandas plasmídicas que se presentó con mayor frecuencia en las cepas fue de 1-3 bandas plasmídicas (52%): 27% de las cepas presentaron una sola banda plasmídica, 14% de cepas presentan dos bandas plasmídicas y 11% presentan tres bandas plasmídicas. El número de bandas plasmídicas con menor frecuencia fueron 11 y 13, con tan solo el 1% (1 cepa) de las cepas de cada uno alberga este número de bandas extra-cromosomales. (Ver

figura 31). Con respecto al tamaño de las bandas plasmídicas, las más pequeñas fueron de 1 kb y las más grandes poseen un tamaño de >100 kb, siendo más frecuentes las bandas plasmídicas de >1 a <4.0 kb y las bandas ≥ 100 kb. (Ver figura 32).

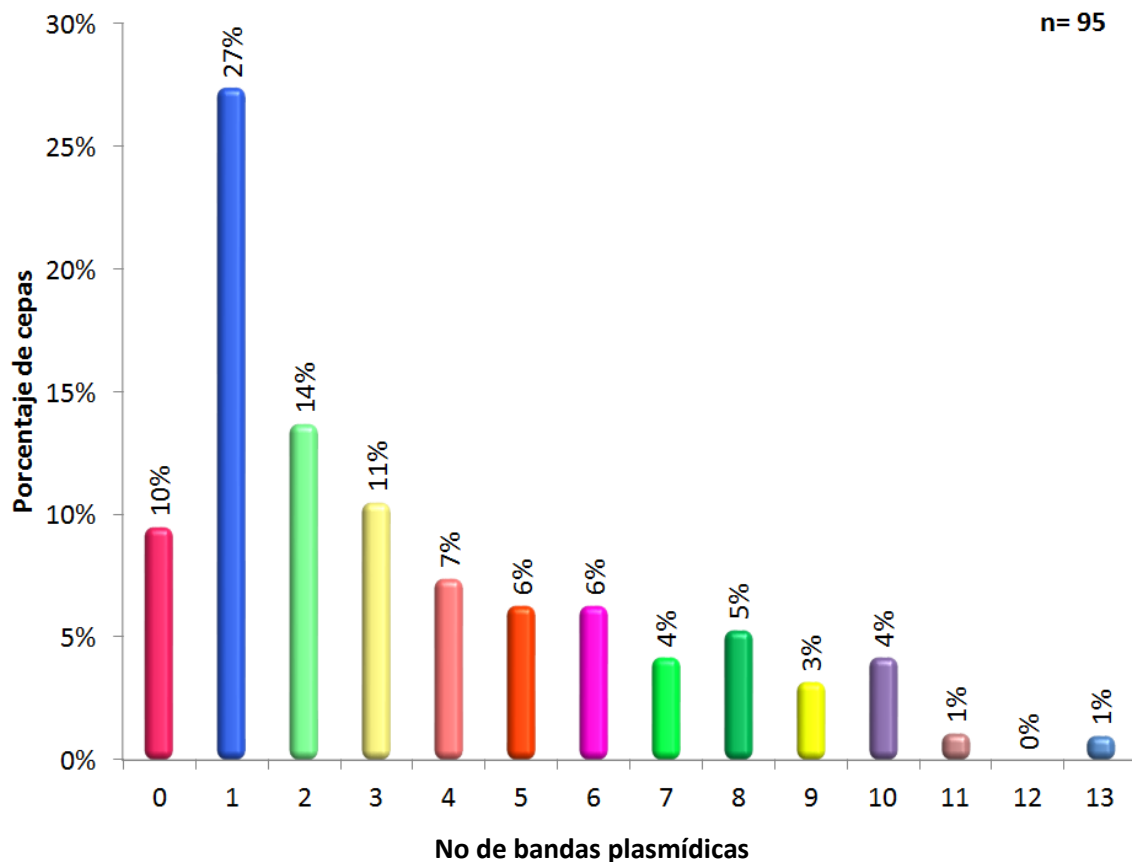


Figura 31. Porcentaje de cepas de *E. coli* respecto a su contenido de bandas plasmídicas.

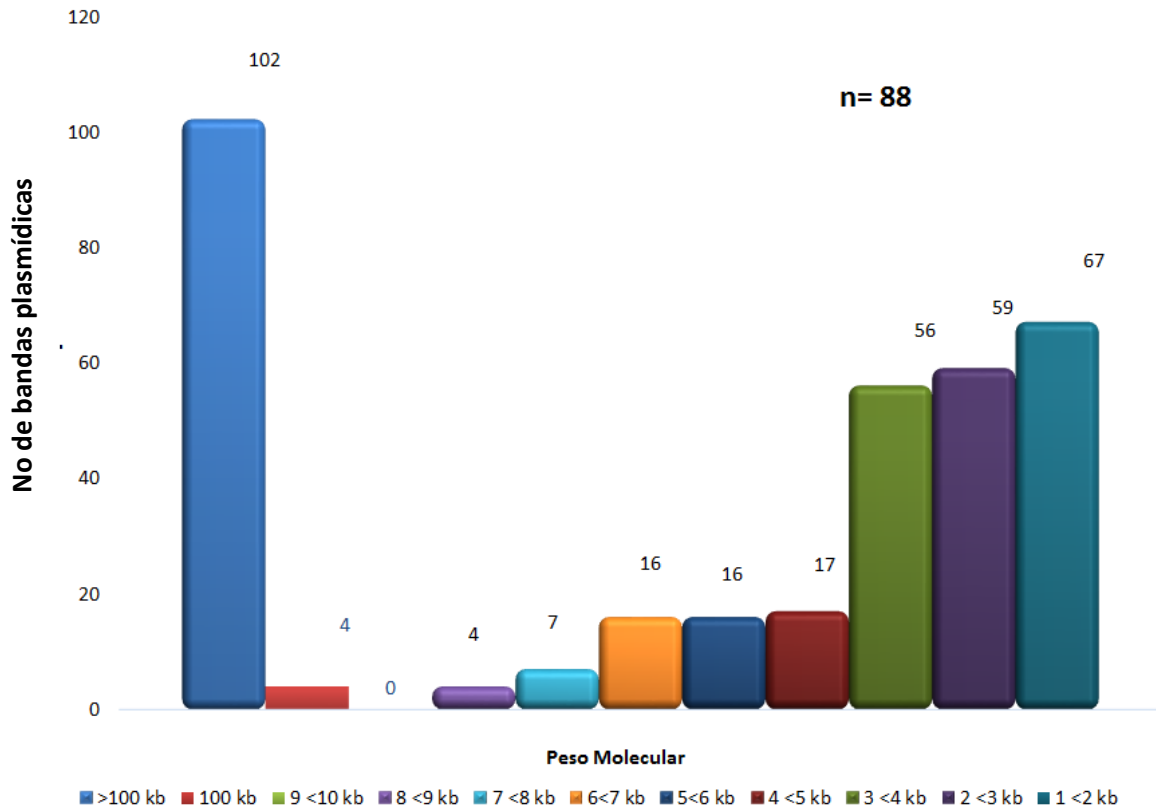


Figura 32. Número de bandas plasmídicas por peso molecular en un total de 95 cepas de *E. coli* aislada de ITU.

Por último, se realizó el análisis del número de bandas plasmídicas (0 a 13 bandas plasmídicas) por grupo filogenético al que pertenecen las cepas (Ver figura 33). Además, se analizó el número de bandas plasmídicas en cada cepa con base al grupo filogenético y su clasificación de susceptibilidad antibiótica (Ver figura 34). En el primer análisis se observa claramente como las cepas del grupo filogenético B2 poseen una variedad extensa en el número de bandas plasmídicas que va de 1 a 11 bandas plasmídicas, predominando las cepas con una banda plasmídica. Con respecto a las cepas de los demás grupos filogenéticos el comportamiento en el

número de bandas plasmídicas es similar al B2 respecto al rango de bandas plasmídicas excepto para el filogrupos B1 cuyas cepas o no tienen plásmidos o tienen 3 o 5 bandas plasmídicas. En segundo lugar tenemos a las cepas del filogrupos F, que es el único grupo en el cual una de sus cepas posee 13 bandas plasmídicas, en el que se observa una disminuida variedad en la distribución en el número de bandas plasmídicas con respecto al filogrupos B2 pero mayor a la de los otros grupos filogenéticos. El filogrupos con menor número de bandas plasmídicas es el filogrupos E, con 2 cepas que poseen un solo plásmido.

Con respecto al segundo análisis se puede observar que del grupo filogenético B2 el número de cepas que poseen bandas plasmídicas se concentran en la categoría de No MDR y MDR, de la misma forma se comportan las cepas del filogrupos C, concentrando el mayor número de cepas con bandas plasmídicas en MDR y No MDR. Con respecto al grupo F esta condición se aplica únicamente en cepas MDR.

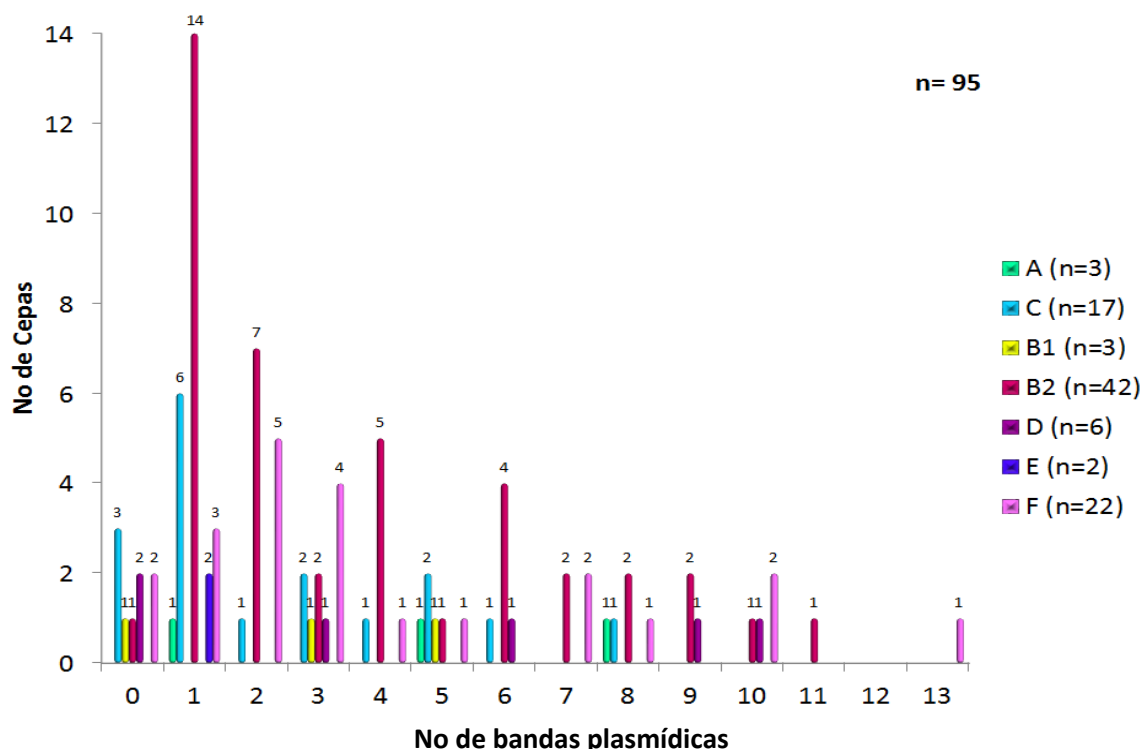


Figura 33. Número de bandas plasmídicas con respecto al grupo filogenético de cepas de *E. coli* aislada a partir de ITU.

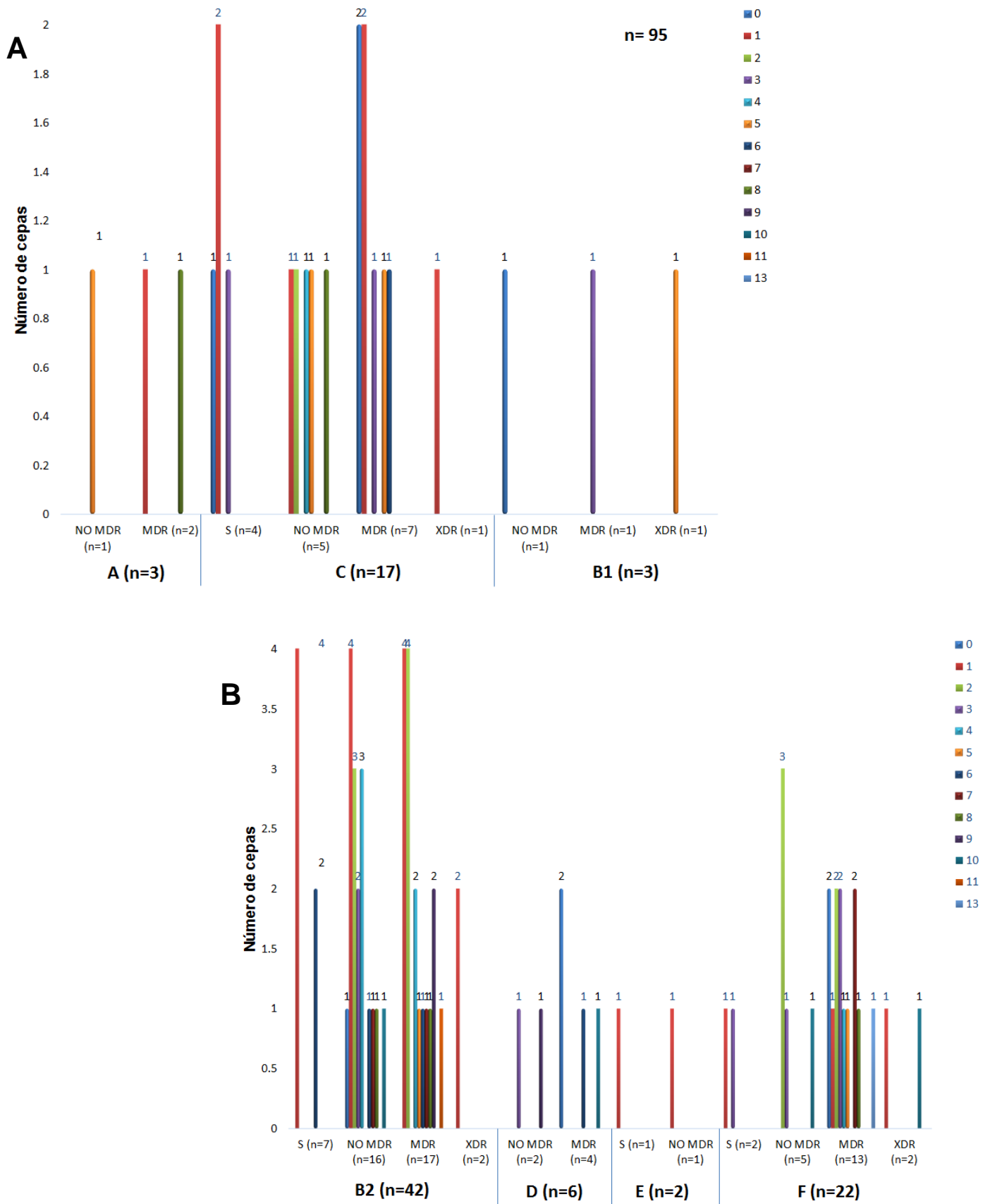


Figura 34. Número de cepas con respecto al número de bandas plasmídicas, grupo filogenético y perfil de sensibilidad y resistencia de *E. coli* aislada a partir de ITU. A) filogrupos A, C y B1. B) grupos B2, D, E y F.

Al asociar todos los resultados, reportados hasta ahora en este trabajo, podemos observar que de las 95 cepas analizadas únicamente 4 cepas no poseen ningún factor de virulencia, pero poseen MDR (tres de las cepas) y al menos un plásmido, estas cepas pertenecen a serotipos UPEC, STEC y una no está asociada a ningún patotipo. 91 de las cepas poseen al menos un factor de virulencia y como máximo encontramos 8 de los 9 factores de virulencia analizados en este trabajo. El 26.4% de las cepas poseen dos factores de virulencia, seguido del 20.9% con cuatro factores. Con un menor porcentaje se detectaron 6 (7.7%), 7 (1.1%) y 8 (1.1%) factores de virulencia. De las 7 cepas que poseen 6 de los 9 factores de virulencia seis pertenecen al filogrupo B2 y una al F, cuatro de las seis pertenecen al patotipo EXPEC y presentan sensibilidad, no MDR y MDR y al menos poseen un plásmido. Con respecto a las 2 cepas con 7 y 8 FV, una para cada uno, ambas pertenecen al filogrupo B2 y pertenecen a serogrupos asociados a UPEC. La cepa que posee 7 FV es la 0611, es serogrupo O6:H1 y presenta no MDR, posee 7 bandas plasmídicas; la cepa CR153 es una O25:H4, principal serogrupo asociado a UPEC, es MDR y posee 7 plasmídicas. (Ver anexo 7).

Con el objetivo de determinar si los plásmidos de algunas cepas de *E. coli* eran inducibles bajo la presencia de ampicilina. Se realizó extracción plasmídica de seis cepas AM^R. Como resultado se puede observar que 5 de las 6 cepas de *E. coli* probadas presentan un incremento en el número de bandas plasmídicas que va de 1 a 3 bandas. En la cepa CR175, por el contrario pierde bandas plasmídicas durante su crecimiento con AM (figura 35).

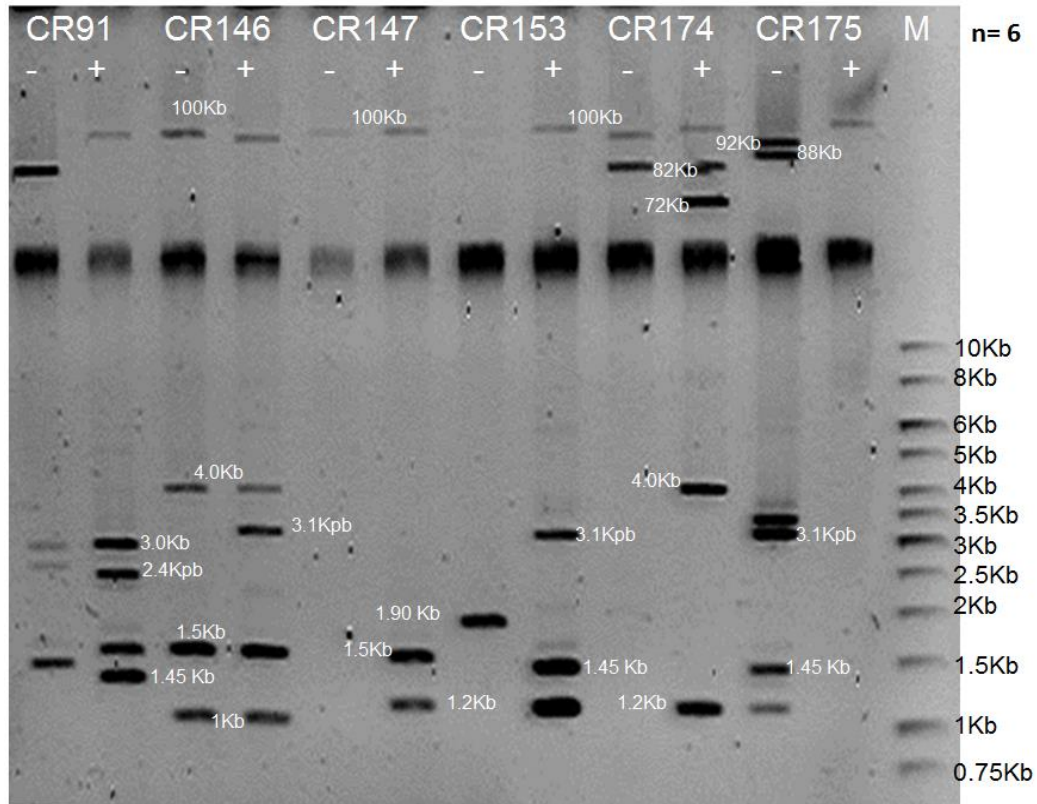


Figura 35. Foto de corrimiento electroforético de extracción de plásmidos en medio LB con y sin AM, gel de agarosa al 0.7% de las cepas UPEC aisladas de ITU. Comparación de perfiles plasmídicos de UPEC cultivados en medio con y sin antibiótico. Gel representativo de los resultados de la extracción del plásmido con 57 cepas de UPEC resistentes a ampicilina cultivadas en caldo LB con y sin antibiótico. M1.- Gene Ruler Escala de ADN de 1 kb, M2.- Gene Ruler 100pb Plus Escalera de ADN. -: Cepas cultivadas sin antibiótico ampicilina +; cepas cultivadas con antibiótico ampicilina.

El 6.3% ($n = 6$) de las cepas utilizadas para este micro-ensayo de las 95 cepas *E. coli* mostraron cambios en su perfil de plásmido. Seis de seis cepas cambian su número de bandas plasmídicas de dos a tres bandas y estas son, en promedio, de un tamaño de 3 kb a 5 kb.

DISCUSIÓN

Escherichia coli uropatógena es el principal agente etiológico en las infecciones de tracto urinario afectando, en el 2015 en México, principalmente a la población femenina de entre 25 a 44 años según datos del SINAVE (http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/principales/nacional/grupo_edad.pdf), nuestro estudio usando 95 cepas aisladas de tres áreas diferentes (un hospital y dos laboratorios particulares de análisis clínico) revela que la principal población afectada es la femenina mayor a los 65 años (27.4%) seguida de la población de entre 25 a 44 años (22.1%). Esto hace un total de 86.3% de nuestra población con por ITU es femenina y el 10.5% masculina.

Es importante recalcar que *E. coli* uropatógena está presente de manera transitoria en la microbiota intestinal, cuando este tipo de cepas logran llegar y colonizar el peritoneo, pueden subir a uretra y colonizar el tracto urinario, esto se pudo demostrar con el trabajo de Sainz y cols en el 2008 en un hospital psiquiátrico en la ciudad de México donde, pese a no aislar a partir de urocultivos a *E. coli*, si se logra a partir de coprocultivos y el resultado del serogrupo arrojó que el 44% de los aislados pertenecen a serogrupos asociados a UPEC. En el periodo del 2010 alumnos del laboratorio de biología molecular de enteropatógenos se dieron a la tarea de recolectar y formar un cepario de 372 cepas de *Escherichia coli* aisladas a partir de pacientes con infección urinaria en dos servicios particulares y uno público en el estado de Puebla. De dicho cepario se seleccionaron 95 cepas bajo el

criterio de 14 cepas sensibles a antibióticos y 81 resistentes al menos a un antibiótico. Este estudio mostro que la mayoría de las cepas aisladas de infección de tracto urinario pertenecen a los principales serogrupos que caracterizan al patotipo de las cepas ExPEC subgrupo de UPEC, lo cual concuerda con la revisión de Horvarth y cols y con los estudios realizados por Abe y cols en Brasil 2008; y a los de Miranda y cols en México 2017 coincidimos en que el mayor porcentaje de cepas aisladas de ITU pertenecen a serogrupos asociados a cepas UPEC, difiriendo en las cepas no tipificables en donde Abe reporta el 10.2% de sus cepas, Miranda el 25.2% y en este estudio el 28.4% del total de los aislados no tipificables. Respecto a los serogrupos que no han sido asociados a ningún patotipo de *E. coli*, sugiere que estas cepas pueden pertenecer a nuevos serogrupos de UPEC que no se han sido reportados en otros trabajos y que son propios de la población mexicana ya que las cepas de *E. coli* no tipificables poseen genes clásicos de UPEC.

Es importante destacar que en el presente estudio la mayoría de las cepas analizadas pertenecen al filogrupo B2 y F y a su vez pertenecen a serotipos característicos del patotipo ExPEC subgrupo UPEC o bien a serotipos no asociados a ningún subgrupo reportado. Además, las cepas de estos dos grupos presentan un gran porcentaje de resistencia y factores de virulencia (en un máximo de 8 factores de virulencia de los 9 analizados).

Diversos estudios, en diversos países, han utilizado como referencia el trabajo que Clermont y cols han realizado, el cual consiste en la clasificación

filogenética de cepas de *Escherichia coli* por medio de un PCR triple (2000) o un PCR cuádruplex (2012). Pocos son los trabajos realizados en México bajo el esquema de trabajo del PCR triple, y aun muchos menos son los realizados bajo el PCR cuádruplex. La filogenia que caracteriza a las cepas de ExPEC son los grupos B2, D, E y F principalmente mientras que las cepas de *E. coli* comensales pertenecen a los filogrupos A, C y B1. Los resultados que se obtuvieron en este estudio revelan que la mayoría de las cepas pertenecen al filogrupo B2 (44.2%), lo cual concuerda con lo reportado en la bibliografía en donde se reporta a este grupo filogenético como principal causante de ITU (Clermont *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2008; Molina *et al.*, 2011; Toval *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2016). En segundo lugar encontramos al grupo F (23.2%) lo que coincide con lo reportado por Miranda y cols en una de dos poblaciones de su estudio. Enseguida tenemos a las cepas del grupo C (17.9%) y de los filogrupos D (6.3%), A y B (3.2% cada uno). Finalmente encontramos al grupo E (2.1%). Tanto en los trabajos de Toval y cols y Miranda y cols, reportan como primer filogrupo encontrado al B2 seguido del A, lo cual no concuerda con nuestros resultados en los que reportamos en segundo lugar al filogrupo F. Lo reportado en el estudio de Miranda y cols reporta predominio en filogrupos B2 y F solo en un sector de su población mientras que el grupo E no fue identificado, en este estudio si fue posible identificarlo pero en un porcentaje muy bajo, 2.1% .

La resistencia a antibióticos es un problema que día a día se va acrecentando debido a diversos factores, como por ejemplo la transferencia horizontal de material genético. Debido a esto, se ha convertido en una parte importante clasificar apropiadamente las cepas con base a su perfil de susceptibilidad. Magiorakos y cols en el 2012 proponen un esquema simple que pretende catalogar a las bacterias patógenas más frecuentemente encontradas en el medio clínico, entre ellas las enterobacterias y por supuesto *Escherichia coli*, en diferentes categorías de resistencia con la finalidad de unificar y eficientar la terminología. Dicha propuesta consta en catalogar a las cepas como: sensibles, no multidrogo-resistentes, multidrogo-resistentes, extremadamente resistente y pandrogo-resistentes en función del número de agentes antimicrobianos y del número de familias de antibióticos a los que la bacteria es sensible o resistente. Su estudio es muy amplio y engloba 17 categorías antimicrobianas para su clasificación, nosotros tomamos en cuenta 11 categorías antimicrobianas para establecer nuestra categorización del perfil de resistencia y susceptibilidad debido a que utilizamos 12 antibióticos y 6 familias diferentes de estos, lo cual no le resta mérito a nuestro trabajo ya que trabajos previos al de Magiorakos establecen su clasificación partiendo de menos categorías, como Falagas y cols en 2006 y 2008 o McGowan en 2006 donde establece los criterios de multidrogo-resistencia y pandrogo-resistencia con categorías de 11 y 9 antimicrobianos diferentes cada caso. En este trabajo pudimos encontrar que el 46.3% de las cepas son multidrogo-resistentes y en un menor porcentaje tenemos a cepas extremadamente resistentes (6.3%). Esto indica que las cepas tienen un

gran potencial de convertirse en un problema serio para el tratamiento de las ITU es decir caerían dentro de las categoría alta (ya que no determinamos la resistencia a carbapenémicos) para las cuales habría una baja disponibilidad de antibióticos para tratar a estos pacientes por ejemplo los carbapenémicos (BOLETIN OMS, 2017).

En estudios más recientes como el de Miranda y cols, 2016, demuestran que, al igual que en este trabajo, se encontró una mayor resistencia ampicilina (99%) y a trimetropim/sulfametoaxol (75%). En este estudio encontramos el 60% y el 46% de resistencia estos antibióticos respectivamente. Dehbanipour y cols, 2016 en Irán, determinaron un alto porcentaje en la resistencia a ampicilina y a trimetropim/sulfametoaxol (con más del 50% de sus aislados) e igual que en este trabajo reportan a la amikacina y a la netilmicina con un alto porcentaje de sensibilidad (89.1% y 85.9% respectivamente), en este trabajo encontramos el 93% de sensibilidad a estos dos antibióticos, lo que nos da una pauta a considerarlos como una mejor opción en el tratamiento contra las ITU's.

La relación filogenia y resistencia a antibióticos realizado en este trabajo nos muestra diversas variantes: en primer lugar se observa el claro e indiscutible predominio que los filogrupos B2 y F respecto al porcentaje de cepas resistentes (43.2% y 24.7% respectivamente), sin embargo el grupo B2 y C presentan el mayor porcentaje de cepas sensibles a todo el esquema de antibióticos usados en este trabajo (50% y 28.6% respectivamente). Los grupos filogenéticos que no presentan cepas sensibles son dos grupos

representativos de cepas comensales A y B1, y un filogrupo de cepas patógenas, D.

Se realizó un análisis más profundo, utilizando la clasificación de Magiorakos, y se observó que los filogrupos B2 y F poseen, sobre los demás grupos filogenético, el mayor porcentaje de cepas MDR (17.9%) seguid del filogrupo F (13.7%), además de que se concentran, en ambos grupos, la mayoría de las cepas XDR. De igual manera, en los grupos filogenéticos B2 y F se concentran el mayor número de cepas resistentes a ampicilina, cefalotina, trimetropim/ sulfametoxyzazol y levofloxacin, dichos antibióticos presentan el menor porcentaje de sensibilidad reportado en este trabajo; y son los filogrupos que presentan resistencia, al menos de una cepa, a los 12 antibióticos utilizados en este análisis. Resulta interesante el hecho de que las cepas patógenas presenten un alto porcentaje de resistencia a antibióticos ya que, de acuerdo a lo reportado en la bibliografía, las cepas patógenas (B2, D, E Y F) deberían presentar mayor sensibilidad que las cepas comensales (A, B1 y C), lo cual se aplica en cepas pertenecientes a los filogrupos A y B1 pero no en a las del grupo C, de los grupos patógenos dicha condición se aplica a cepas B2 y E, pero no con las cepas D y F.

Los patrones de resistencia o “resistotipos” o “fenotipos de resistencia” son de importancia a nivel mundial debido a que existen diferencias entre el patrón de susceptibilidad de una bacteria a otro, basta analizar los resultados de este trabajo en donde se identifican 50 resistotipos diferentes en solo tres poblaciones diferentes, conocer los patrones de resistencia de UPEC más

comunes dentro de una comunidad pueden eficientar el tratamiento empírico de una ITU (Dehbanipour, *et .al.*, 2016). La importancia de la determinación de estos patrones, radica de igual manera para el control y la vigilancia de la resistencia en cada localidad.

Los factores de virulencia asociados a UPEC y analizados en el presente trabajo son adhesinas (fimbria P y fimbria tipo 1), sideróforos (aerobactina) y toxinas (sat, vat, hlyA, CNF). En este estudio encontramos que el primer factor de virulencia encontrado en las 95 cepas aisladas de ITU es la adhesina de la fimbria tipo 1 (74.7%), lo que concuerda con estudios como los de Johnson y cols en 2005 (95%), Tiba y cols en 2008 (97.5%), Abe y cols en 2008 (93.8%) y los de Miranda y cols en 2016 (86%); seguido de la aerobactina (72.6%) y en tercer lugar la adhesina homóloga de IrgA o adhesina receptora de sideróforo (53.7%); en un menor porcentaje encontramos a la adhesina flagelar (7.4%), fimbria tipo P o pap (3.2%) y por último la toxina CNF (6.3%). En comparación con otros trabajos como los de Tiba y cols en 2008 (pap 0.62%, hlyA 25.3% y cnf-1 18.5%), Oliveira y cols en 20011 (pap 25%, hlyA 5% y cnf-1 18%) y Miranda y cols en 2016 (hlyA 16.8% y cnf-1 17.8%); se puede observar que, al igual que en este trabajo, hlyA, cnf-1 y pap son los factores de virulencia que se presentan en menor frecuencia. En trabajos como los de Johnson y cols en 2005 y el de Abe y cols en 2008 estos tres factores de virulencia (cnf-1, pap y hlyA) cobran mayor importancia presentándose en un mayor porcentaje de las cepas analizadas en cada trabajo (papA 56% y cnf-1 54%; pap 45.8% y cnf-1 23.6%

respectivamente). En el caso de otros factores de virulencia como *iha*, Johnson y cols en 2005 reportan el 33% de sus aislados como positivos a este FV mientras que Abe y cols en 2008 lo reportan con un 40.4%; *sat*, Miranda y cols en 2016 reportan el 26.2% , lo que no coincide con lo reportado en este trabajo donde 40% de las cepas analizadas es positiva a dicho factor de virulencia; en el caso de *iucD*, Tiba y cols en 2008 lo reportan en el 25.9% de sus aislados mientras que en nuestro análisis tenemos el 72.6%. El hecho de que nuestras cepas expresen principalmente genes asociados a adherencia (*fimH*, *iha*) y a la captación de hierro (*iucD*, *iha*) nos indica la alta capacidad que tienen nuestras cepas de adherirse a los receptores de superficie de las células de la vejiga, facilitando la colonización en la etapa inicial de la infección, y la adquisición de nutrientes para sobrevivir en el tracto urinario. La baja incidencia de cepas que presentan *fliC* y *pap* nos indica que solo algunas de nuestras cepas tienen la capacidad de desplazarse por el tracto urinario o bien que han encontrado otros mecanismos de desplazamiento. De las 95 aislados analizados solo 1 cepa fue positivo a 8 de los 9 factores de virulencia, dicha cepa pertenece al patotipo ExPEC subgrupo UPEC serotipo O25:H4, es filogrupo B2 y también presenta multidrogo-resistencia. Por lo que dicha cepa presenta un alto potencial de virulencia.

En comparación con otros trabajos, como el de Johnson y cols en 2005, donde reportan al 95% de sus aislados como *fimH* positivo

De manera complementaria se realizó el análisis de la relación entre factores de virulencia y grupo filogenético, donde podemos observar que en los grupos filogenéticos B2 y F es donde se concentran el mayor porcentaje de factores de virulencia. Las cepas de *E. coli* comensales representadas por los grupos A, C y B1 no presentan *cnf-1*, *hlyA* y *pap*, característicos de cepas patógenas, en similitud tenemos a las cepas del grupo E, grupo patógeno, que no presentan ninguno de estos factores característicos de UPEC, puesto que según su serotipo están asociadas a cepas de STEC, en este grupo solo se logró detectar del gen *fimH* que codifica a la adhesina de la fimbria tipo I.

Los genes *cnf*, *pap* y *hlyA* están asociados a la misma isla de patogenicidad, corroborándolo con nuestros resultados. De las 6 cepas positivas al gen *cnf* dos son positivas a los tres genes (*cnf*, *pap* y *hlyA*), las cuatro restantes son positivas a *hlyA* y *cnf*. Estos tres genes también son asociados a otro tipo de genes como *fliC*, *sfa* y *afa*, los cuales son codificados en la misma PAI. (Tiba *et, al.*, 2008).

El grupo B2 concentra cepas que poseen el mayor número de factores de virulencia y abarcan las 3 categorías de resistencia, lo que coincide con lo reportado con Miranda y cols en 2016 que reporta un mayor porcentaje de genes de virulencia en el filogrupo B2; en segundo lugar tenemos al filogrupo F, el cual también presenta un porcentaje significativo de factores de virulencia distribuidos y además abarca las 3 categorías de resistencia. Los grupos filogenéticos que poseen un menor número de FV son E, que

únicamente presenta fimH, B1, fimH e iucD positivo, y en tercer lugar esta A, que posee fimH, iha, iucD y sat, y únicamente B1 presenta cepas XDR. De acuerdo con la bibliografía las cepas patógenas, B2 y F, deberían poseer un mayor porcentaje de factores de virulencia y mayor sensibilidad a los antibióticos, y las cepas comensales, A, B1; un menor número de factores de virulencia y un mayor porcentaje de resistencia lo cual no se cumple en el estudio que realizamos donde las cepas B2 y F poseen no solo el mayor porcentaje de FV sino también los perfiles de resistencia son mayores que en los grupos A y B1.

Con todos nuestros resultados hasta el momento no podemos restar importancia al fenómeno de transferencia de material genético, específicamente plásmidos, los cuales encontramos en el 90% de nuestras cepas y de éstas al menos poseen un plásmido encontrando que el número máximo de bandas plasmídicas que puede albergar una cepa, al menos en nuestro cepario, es de 13. El tamaño promedio que encontramos fue de 3.5 kb y en una mayor proporción encontramos bandas plasmídicas de más de 100 kb. Los plásmidos grandes, mayores a 88 kb están asociados a resistencia a antibióticos factores de virulencia y a islas de patogenicidad (Lanza *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

- Se encontraron 50 resistotipos diferentes de las 95 cepas de *E. coli* aisladas de ITU analizadas.
- La mayor resistencia se presentó a antibióticos usados como primera elección en el tratamiento empírico de ITU, incluyendo levofloxacina prescrita para pacientes hospitalizados.
- El 42% de las cepas de *E. coli* aisladas de ITU pertenecen a serotipos UPEC. El 2% a MNEC y del 1 al 14% son DAEC.
- El principal filogrupos encontrados es B2 (44.2%), seguido de grupo F (23.2%), C (17.9%), D (6.3%) independientemente de su perfil de resistencia y/o sensibilidad.
- Los filogrupos B2 y F presentan el mayor número de cepas resistentes a todos los antibióticos utilizados.
- La mayoría de las cepas son MDR en un 46.3%, seguida de las NMDR (32.6%) y XDR (6.3%).
- En los filogrupos B2 y F se encuentran la mayoría de las cepas MDR.
- El 96% de las cepas tienen al menos un factor de virulencia, el número de factores va de 1 a 8. El promedio más alto de factores de virulencia es 2 (26.4%).
- Los principales factores de virulencia encontrados son los involucrados en la adherencia y en la captación de hierro. la fimbria tipo 1 (74.7%), la aerobactina (72.6%) y el receptor de hierro, Iha (53.7%).
- Las cepas B2 albergan el mayor porcentaje de factores de virulencia.

- El 90% de las cepas albergan plásmidos. Cada cepa posee de 1-13 bandas plasmídicas con un promedio de 3.8 bandas.
- Se observó una modificación en el perfil plasmídico en presencia de ampicilina y algunos plásmidos son inducible por ampicilina.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, C. M., Salvador, F. A., Falsetti, I. N., Vieira, M. A., Blanco, J., Blanco, J. E., ... & Gomes, T. A.** (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(3), 397-406.
- Aguirre, A., Plascencia, H., Rivera, M., Guerrero, B., & Murillo, N.** (2007). Resistencia de *Escherichia coli* en infecciones de vías urinarias en pacientes pediátricos del Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología, REVISTA*. 27(3), 83-87.
- Alós, J. I.** (2005). Epidemiología y etiología de la infección urinaria comunitaria. Sensibilidad antimicrobiana de los principales patógenos y significado clínico de la resistencia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23, 3-8.
- Aroche, F.** (2011). Determinación del serotipo, perfil de resistencia y presencia del gen *fliC* y *fimH* en cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC). Tesis de grado. Licenciatura en Biología. Escuela de Biología. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Bakás, L., Maté, S., Vázquez, R. & Herlax, V.** (2013). Mecanismo de acción de la toxina alfa hemolisina de *Escherichia coli*. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 47(2), 353-361.
- Beutin, L.** (1991). The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Medical microbiology and immunology*, 180(4), 167-182.
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P.** (2012). Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *International Journal of Nephrology*, 2012, 681473. <http://doi.org/10.1155/2012/681473>
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., ... & Alonso M.P.** (2002). Enterobacterias: Características generales. Género *Escherichia*. Es: Manual de Microbiología Veterinaria. Vadillo S., Píriz Mateos S & E, editores McGraw-Hill Interamericana, Madrid. 301-325
- Bower, J. M., Eto, D. S., & Mulvey, M. A.** (2005). Covert Operations of Uropathogenic *Escherichia coli* within the Urinary Tract. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 6(1), 18–31.

- Brzuszkiewicz E., Bruggemann H., Liesegang H., Emmerth M., Olschlager T., Nagy G., Albermann K., Wagner Ch., Buchrieser C., Emody L., Gottschalk G., Hacker J., and Dobrindt U.** (2006). How to become uropathogen: Comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias*, 103 (34), 12.879 - 884.
- Casellas, M.** (2008). Etiología (etiopatogenias) de las infecciones urinarias. Anuario fundación Dr J.R. Villavicencio.
- Chahales, P. & Thanassi, D. G.** (2015). Structure, Function, and Assembly of Adhesive Organelles by Uropathogenic Bacteria. *Microbiology Spectrum*, 3(5), 10.1128/microbiolspec.UTI-0018-2013.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E.** (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental Microb*, 66(10), 4555-58
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M.** (2012). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental microbiology reports*, 5(1), 58-65.
- Costa, M. M. D., Drescher, G., Maboni, F., Weber, S., Botton, S. D. A., Vainstein, M. H., ... & Vargas, A. C. D.** (2008). Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract of swine in southern of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(4), 741-743.
- Croxen M. & Finlay B.** (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 26-38.
- Cusumano, C. K., Pinkner, J. S., Han, Z., Greene, S. E., Ford, B. A., Crowley, J. R., ... & Hultgren, S. J.** (2011). Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors. *Science translational medicine*, 3(109), 109ra115-109ra115.
- Daza Pérez R.M.** (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 22(3): 57-67.
- Dehbanipour R, Rastaghi S, Sedighi M, Maleki N, Faghri J.** (2016). High prevalence of multidrug-resistance uropathogenic *Escherichia coli* strains, Isfahan, Iran. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*. 2016; 7(1):22-26. doi:10.4103/0976-9668.175020.

Diario Oficial de la Federación. Edición 2015, del cuadro Básico y Catalogo de Medicamentos.

Ver:http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5424007&fecha=29/01/2016

Echevarría, J., Sarmiento, E., & Osore, F. (2006). Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *Acta médica peruana*, 23(1), 26-31.

Falagas, M. E., Koletsi, P. K., & Bliziotis, I. A. (2006). The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of medical microbiology*, 55(12), 1619-1629.

Falagas, M.E., & Karageorgopoulos, D.E. (2008). Resistencia pandrug (PDR), resistencia a los fármacos (XDR), y la resistencia a múltiples fármacos (MDR) entre los bacilos Gram-negativos: necesidad de una armonización internacional en la terminología. *Clinical Infectious Diseases*, 46 (7), 1121-1122.

Farshad, S., Ranijbar, R., Japoni, A., Hosseini, M., Anvarinejad, M., & Mohammadzadegan, R. (2012). Microbial susceptibility, virulence factors, and plasmid profiles of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children in Jahrom, Iran. *Archives of Iranian Medicine (AIM)*, 15(5).

Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 722-732.

Guyer, D. M., Radulovic, S., Jones, F. E., & Mobley, H. L. (2002). Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli* is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infection and immunity*, 70(8), 4539-46.

Hernandez, J. A., Castro, N. & Ruíz, M. (2014). Caracterización fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* multirresistente productoras de B-lactamasas de espectro extendido. *Foro de estudios sobre Guerrero, Salud*, 1(2), 648-652.

Hiergeist, A. & Gessner, A. (2016). Clinical implications of the microbiome in urinary tract diseases. *Current Opinion in Urology*.

Horvath, D. J., Dabdoub, S. M., Li, B., VanderBrink, B. A., & Justice, S. S. (2012). New paradigms of urinary tract infections: Implications for patient management. *Indian Journal of Urology*, 28(2), 154.

- Infección Urinaria En El Adulto: Actualización. Boletín INFAC.** (2011). 19(9). 52-9. Disponible en:
http://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/cevime_infac/eu_miez/adjuntos/Infac_v19_n9.pdf
- Jadhav, S., Hussain, A., Devi, S., Kumar, A., Parveen, S., Gandham, N., Wieler, L., Ewers, C., & Ahmed, N.** (2011). Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. PLoS one, 10 (1371): 018-063.
- Jafari A., Aslani M. & Bouzari S.** 2012. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. Iranian journal of microbiology, 4 (3), 102-117.
- Johnson, J. R., Jelacic, S., Schoening, L. M., Clabots, C., Shaikh, N., Mobley, H. L., & Tarr, P. I.** (2005). The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. Infection and immunity, 73(2), 965-971.
- Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Gajewski, A., Soto, S., Horcajada, J. P., de Anta, M., & Vila, J.** (2005). Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. Journal of Infectious Diseases, 191(1), 46-50.
- Johnson, J. R., Johnston, B., Kuskowski, M. A., Nougayrede, J. P., & Oswald, E.** (2008). Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. Journal of clinical microbiology, 46(12), 3906-11.
- Johnson, J.R.** (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clinical microbiology review, 4(1), 80-128.
- Lane, M. & Mobley, H.** (2007). Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. Kidney international, 72(1), 19-25.
- Lanza, V. F., de Toro, M., Garcillán-Barcia, M. P., Mora, A., Blanco, J., Coque, T. M., & de la Cruz, F.** (2014). Plasmid flux in *Escherichia coli* ST131 sublineages, analyzed by plasmid constellation network (PLACNET), a new method for plasmid reconstruction from whole genome sequences. PLoS genetics, 10(12), e1004766.
- Lüthje, P., & Brauner, A.** (2014). Chapter Seven-Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. Advances in microbial physiology, 65, 337-372.

- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & Paterson, 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.
- Martínez, J.** (2012). Determinación del serotipo y presencia de genes de virulencia en cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC) multirresistente. Tesis de grado. Licenciatura en Químico Farmacobiólogo. Facultad de Ciencias Químicas. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Martínez, V. I., Medrano, A., Saldaña, Z., Girón, J. A., & Puente, J. L.** (2012). Transcriptional regulation of the *ecp* operon by EcpR, IHF, and H-NS in attaching and effacing *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 194(18), 5020-33.
- McGowan, J. E.** (2006). Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *The American journal of medicine*, 119(6), S29-S36.
- MOH Key Laboratory of Systems Biology of Pathogens, Institute of Pathogen Biology, CAMS&PUMC, Beijing, China All Rights Reserved. Copyright © 2003-2016.** Disponible en: <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/vfs.cgi?Genus=Escherichia&Species=UPEC&Keyword=Iron%20uptake>
- Millan, Y., Hernández, E., Millán, B., & Araque, M.** (2014). Distribution of phylogenetic groups and virulence factors in CTX-M-15 β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients in the community of Merida, Venezuela]. *Revista Argentina de microbiología*, 46(3), 175-181.
- Miranda, L. I., Ruíz, M., Molina, J., Parra-Rojas, I., González, E. & Castro, N.** (2016). 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*
- Molina, T.** (2011). Serotificación, perfil de resistencia antimicrobiano y presencia de los genes *pap* y *hlyA* en *E. coli* uropatógena (UPEC). Tesis de grado. Licenciatura en Biomedicina. Facultad de Medicina. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Molina-López, J., Aparicio-Ozores, G., Ribas-Aparicio, R. M., Gavilanes-Parra, S., Chávez-Berrocal, M. E., Hernández-Castro, R., & Manjarrez-Hernández, H. Á.** (2011). Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 5(12), 840-849.
- Moreno, E., Prats, G., Planells, I., Planes, A. M., Pérez, T., & Andreu, A.** (2006). Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 24(8), 483-89.
- Moreno, E., Prats, G., Sabaté, M., Pérez, T., Johnson, J. R., & Andreu, A.** (2006). Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(2), 204-211
- Murray P., Rosenthal K., Pfaüer M.** (2007). *Microbiología Médica*. Elsevier. 5ta Edición.
- Oliveira, F., Paludo, K. S., Arend, L. N., Farah, S. M., Pedrosa, F. O., Souza, E. M., ... & Fadel-Picheth, C.** (2011). Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Genet Mol Res*, 10(4), 4114-25.
- Organización Mundial de la Salud (OMS).** (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: World Health Organization.
- Páramo, F., Tovar, A., & Rendón, M. E.** (2015). Resistencia antimicrobiana en pacientes con infección de vías urinarias hospitalizados en el servicio de Medicina Interna del Nuevo Sanatorio Durango, de enero a diciembre de 2013. *Medicina Interna de México*, 31(1).
- Pigrau C.** (2013). *Infección del tracto urinario*. Editorial Ergon. 1ra Edición.
- Quackenbush, R. L., & Falkow, S.** (1979). Relationship between colicin V activity and virulence in *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 24(2), 562.
- Rendón M, Reyes A, Rosas J & Rodríguez F.** (2012). Infecciones de vías urinarias. Patrón de resistencia *in vivo* de *E. coli* y *E.coli* ESBL a quinolonas, trimetoprima-sulfametoxazol y nitrofurantoina. *Medicina Interna de México*, 28 (5), 434-439.

- Rudick, C. N., Billips, B. K., Pavlov, V. I., Yaggie, R. E., Schaeffer, A. J., & Klumpp, D. J.** (2010). Host-pathogen interactions mediating pain of urinary tract infection. *Journal of Infectious Diseases*, 201(8), 1240-1249.
- Ruiz J., Simon, k., Horcajada, J. P., Velasco, M., Barranco, M., Roig, G., Moreno, A., Martínez, J. A., Jiménez, T., Mensa, J., and Vila, J.** (2002). Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *Journal of clinical microbiology*, 40(12), 4445-4449.
- Sainz E., Reyes M., Vicente P., Serapio A., Zárata, Navarro A., Eslava C.** (2008). Resistencia a antimicrobianos de cepas de *E. coli* de diversos serotipos aisladas de pacientes de un Hospital Psiquiátrico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 39 (4), 18-25.
- SINAVE/DGE/Salud.** Información epidemiológica de morbilidad. Anuario 2015. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/principales/nacional/grupo_edad.pdf
- Sokurenko, E. V., Courtney, H. S., Ohman, D. E., Klemm, P., & Hasty, D. L.** (1994). FimH family of type 1 fimbrial adhesins: functional heterogeneity due to minor sequence variations among fimH genes. *Journal of bacteriology*, 176(3), 748-755.
- Soto, S. M.** (2006). Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(8):479-80.
- Stamm, WE, & Norrby, SR.** (2001). Urinary tract infections: Disease Panorama and Challenges. *The Journal of Infectious Diseases*, 183 (Sup. 1), S1-S4.
- Tarr, P. I., Bilge, S. S., Vary, J. C., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Ward, T. R., ... & Besser, T. E.** (2000). Iha: a novel *Escherichia coli* O157: H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infection and immunity*, 68(3), 1400-07.
- Thanassi, D. G., Bliska, J. B., & Christie, P. J.** (2012). Surface Organelles Assembled by Secretion Systems of Gram-Negative Bacteria: Diversity in Structure and Function. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(6), 1046–1082.
- Tiba, M. R., Yano, T., & Leite, D. D. S.** (2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with

cystitis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 50(5), 255-260.

Torres M. & Mattera A. (2008). Infección urinaria. Temas de Bacteriología y Viriología Médica. 3ª edición. Montevideo: Universidad de las Republica. Departamento de Bacteriología y Virología. Instituto de Higiene. Oficina del libro FEFMUR. P. 189-196.

Toval, F., Köhler, C. D., Vogel, U., Wagenlehner, F., Mellmann, A., Fruth, A., ... & Dobrindt, U. (2014). Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. Journal of clinical microbiology, 52(2), 407-418.

Wein, Kavoussi, Novick, Partin & Peters.Campbell-Walsh. (2008). Urología. Editorial Panamericana. 9a edición. Tomo I. Pág. 223-283.

Wiles T. J., R. R. Kulesus, & M. A. Mulvey. 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Experimental and molecular pathology, 85(1), 11-19.

Zárate, M. P., Navarro, A., & Eslava, C. (2008). Resistencia a antimicrobianos de cepas de *E. coli* de diversos serotipos aisladas de pacientes de un Hospital Psiquiátrico. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 39(4), 18-25.

Zhao, L., Gao, S., Huan, H., Xu, X., Zhu, X., Yang, W., ... & Liu, X. (2009). Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. Microbiology, 155(5), 1634-1644.